

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Universités Frères Mentouri -Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie Animale



N° d'ordre :179/DS/2017

N° de série :11/BioA/2017

Thèse

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Science
En Biologie Cellulaire et Moléculaire /Option: Toxicologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée Par: KARA ALI Wahiba

Thème

Effet des extraits de la plante médicinale *Ruta montana*
(الفيجل) sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine et
sur la multi-drug résistances (MDR) des cellules
cancéreuses ovarien (A2780)

Jury d'évaluation :

Président de jury: Mr. NECIB Y. Prof. Univ. Frères Mentouri –Constantine

Directeur de thèse: Mme. ABIDLI N. Prof. ENS. Kouba–Alger

Examineurs: Mr. ABDENNOUR C. Prof. Univ. Badji Mokhtar–Annaba

Mme. DAHAMNA S. Prof. Univ. Ferhat-Abbas– Sétif

Mr. BENREBAI M. MCA.Univ. Frères Mentouri –Constantine.

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

J'exprime mes profonds remerciements à mon encadreur Madame ABIDLI Nacira, professeur à l'Ecole National supérieur, Kouba, Alger pour son attention, sa simplicité, sa sympathie et sa générosité scientifique. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de toute ma gratitude pour son soutien permanent.

Je remercie Monsieur NACIB Youcef, Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Frères Mentouri de Constantine, pour son aide et avoir accepté d'être président du jury de mon thèse.

Je tiens à remercier Monsieur ABDENNOUR Cherif, Professeur à l'Université Badji Mokhtar, Annaba, d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je remercie Madame DAHAMNA Saliha, professeur à l'Université Ferhat-Abbas-Sétif, d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur BENREBAI Mouad, Maître de Conférence, à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Frères Mentouri de Constantine, d'avoir accepté d'examiner cet humble travail.

Je remercie tous les membres du laboratoire de biochimie au Centre hospitalo-universitaire Dr Benbadis Constantine, pour me permettre de finaliser cette thèse.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire d'Anatom Pathologique de l'hôpital Abd Elhafid Boudjemaa de Constantine pour leur aide concernant la réalisation des coupes histologiques.

Je n'oublierai pas d'adresser mes vifs remerciements à Monsieur Fabio Altieri professeur à l'Université Sapeinza, Roma, Italie, pour sa contribution et son aide concernant la réalisation des cultures cellulaires.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A mes très chers parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études. Qu'Allah leurs prête Santé.

A mon cher mari Nabil qui a su m'épauler, m'encourager toujours à aller plus loin. Ta patience m'a toujours égayé même dans les moments les plus durs. Sans toi je ne serai pas arrivée jusque là,

A ma petite fille Roumaïssa, tu nous as apporté un bonheur sans faille depuis ta Naissance. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

*A mes sœurs: Mounira et Nadia et mes frères: Rafik et Farid
Que Dieu les bénisses*

A toute ma famille

A tous mes amies et collègues

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION.....	1
-------------------	---

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. La résistance à la chimiothérapie anticancéreuse	3
I.1. Généralités	3
I.2. Les différentes formes de chimiorésistance.....	4
I.2.1. La chimiorésistance intrinsèque.....	4
I.2.2. La chimiorésistance extrinsèque.....	4
I.3. Les mécanismes de résistance à la chimiothérapie.....	4
I.4. La chimiorésistance liée aux protéines de transport.....	7
I.4. 1. Les transporteurs ABC.....	7
I.4.1.1. Aspect structural des transporteurs ABC.....	8
I.4.1.2. Aspect fonctionnel des transporteurs ABC.....	9
I.4.2. Les principaux transporteurs ABC impliqués dans le phénotype MDR.....	10
I.4.2.1. La glycoprotéine P.....	11
I.4.2.2. La protéine MRP1.....	11
I.4.2.3. La protéine ABCG2.....	12
I.5. La réversion de la multidrug resistance	13
II. Stress oxydant, radicaux libres et antioxydant	16
II.1. Définition de stress oxydant.....	16
II. 2. Les espèces réactives de l’oxygène et les radicaux libres.....	16
II.2.1. Les radicaux libres.....	16
II.2.2. Dérivés oxygénés non radicalaires.....	17
II. 3. Les sources des ERO.....	18
II. 3.1. Sources exogènes	18
II. 3.2. Sources endogènes.....	18
II. 4. Le rôle des ERO dans la physiologie cellulaire.....	19
II.5. Principales cibles des ERO.....	19
II.5.1. Les lipides.....	19
II.5.2. Les protéines.....	20
II.5.3. L’ADN.....	20
II.6. Pathologie ciblée des radicaux libres.....	21
II.7. Systèmes de défenses antioxydants.....	21

II.7.1. Les systèmes antioxydants endogènes.....	22
II.7.1. 1. Les antioxydants endogènes enzymatiques.....	22
II.7.1.2. Les antioxydants endogènes non enzymatiques.....	24
II.7.2. Les systèmes antioxydants exogènes.....	25
III. La cardiotoxicité de la doxorubicine.....	26
III.1. Propriétés générale de la doxorubicine.....	27
III.1.1. Définition et origine	27
III.1.2. Structure chimique de la doxorubicine.....	28
III.2. Pharmacocinétique de la doxorubicine.....	29
III.2.1. L'absorption.....	29
III.2.2. La distribution.....	29
III.2.3. Le métabolisme.....	29
III.2. 4. L'élimination.....	30
III.3. Pharmacodynamie de la doxorubicine (mécanisme d'action antitumorale).....	30
III.3.1. Intercalation dans la molécule d'ADN.....	31
III.3.2. Inhibition de la topoisomérase II.....	32
III.3. 3. Production des radicaux libres.....	32
III.4. Mécanisme de cardiotoxicité de la doxorubicine.....	33
III.4.1. Production de radicaux libres.....	34
III.4.1.1. La voie enzymatique.....	35
III.4.1.2. La voie dépendante des ions ferriques.....	36
III.4.2. Perturbation de l'homéostasie calcique.....	37
III.4.3. Modification de l'expression de certains gènes dans les cardiomyocytes.....	37
III.4. 4. Induction de la mort cellulaire programmée.....	37
III.4.5. La production de métabolites toxiques.....	37
III.4.6. Liaison avec les phospholipides	38
III.5. Les signes d'évaluation des lésions cardiaques induites par la doxorubicine.....	38
III.5.1. Les marqueurs biologiques de la cardiotoxicité de la doxorubicine.....	38
III.5. 2. Les anomalies histologiques cardiaques induites par la doxorubicine	39
III. 6. Stratégie de prévention contre la cardiotoxicité de la doxorubicine	40
IV. Les flavonoïdes.....	42
IV. 1. Généralité et historique.....	42
IV. 2. Structure et classification	42
IV. 3. Distribution et localisation	45
IV. 4. Pharmacocinétique des flavonoïdes.....	45
IV.4.1. Absorption.....	45
IV.4.2. Métabolisme distribution et élimination.....	45
IV.5. Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes.....	46
IV.5.1. Effet scavenger sur les radicaux libres et propriétés antioxydantes.....	46
IV.5.2. Propriétés anticancéreuses	48

IV.5.3. Autres propriétés thérapeutiques des flavonoïdes.....	48
V. La plante médicinale <i>Ruta montana</i>	50
V.1. Description botanique de la plante.....	50
V. 2. Classification systématique.....	51
V. 3. Appellation de la plante.....	52
V.4. Répartition géographique.....	52
V.5. Travaux phytochimiques antérieurs et propriétés biologiques.....	52
V.6. Usage thérapeutique traditionnel de la plante.....	54

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	56
I.1. Matériel biologique.....	56
I.1.1. Matériel végétal.....	56
I.1.2. Matériel animale.....	56
I.1.3. Les lignées cellulaires.....	56
I.1.4. Le médicament anticancéreux : la doxorubicine.....	57
I.2. Réactifs chimiques et équipements.....	57
II. Méthodes	57
II.1. Préparation et étude des extraits de la plante médicinale <i>R. montana</i>	57
II.1.1. préparation des extraits	57
II.1.2. Les rendement des extraits de <i>R. montana</i>	60
II.1.3. Caractérisation phytochimique de la plante.....	60
II. 1.3.1. Recherche des tanins.....	60
II. 1.3.2. Recherche des saponosides	60
II. 1.3.3. Recherche des flavonoïdes	61
II.1.3.4. Recherche des composés réducteurs	61
II.1.3.5. Recherche des coumarines.....	61
II. 1. 3. 6. Recherche des alcaloïdes	61
II.1.4. Etude quantitative.....	61
II. 1.4. 1. Dosage des flavonoïdes.....	61
II.1. 4.2. Dosage des polyphénols totaux.....	62
II.1.5. Etude qualitative (Chromatographie sur Couche Mince).....	63
II.1. 5.1. Principe.....	63
II.1. 5.2. Protocole de CCM sur gel de silice.....	64
II.1.5.3. Révélation.....	64
II.1.6. Estimation <i>in vitro</i> de l'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical libre DPPH'.....	65

II.1.6.1. Principe de l'essai.....	65
II.1.6.2. Réalisation de l'essai	65
II.1.6. 3. Expression des résultats.....	66
II.2. Etude de l'effet préventif de l'extrait acétate d'éthyle (EAERM) de <i>R. montana</i> sur la cardiotoxicité de la doxorubicine.....	67
II.2.1. Traitement des animaux.....	67
II.2.2. Le sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques.....	67
II.2.2.1. Préparation du sérum et de l'homogénats	67
II.2.2.2. Préparation des échantillons pour les coupes histologiques.....	68
II.2.3. Dosages biochimique <i>in vivo</i> (activité de CKMB, ASAT, ALAT et LDH)	68
II.2.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la CKMB.....	68
II.2.3.2.Evaluation de l'activité enzymatique de l'ASAT et l'ALAT.....	69
II.2.3.3.Evaluation de l'activité enzymatique de LDH.....	70
II.2.4. Effet de EAERM sur le taux des biomarqueurs de stress oxydant dans le tissu Cardiaque.....	71
II.2.4.1. Dosage du Malonyldialdéhyde (MDA).....	71
II.2.4.2. Dosage du glutathion (GSH).....	72
II.2.5.Effet de l'EAERM sur l'activité des enzymes antioxydants cardiaque.....	73
II.2.5.1. Dosage de la catalase.....	73
II.2.5.2. Dosage du Glutathion- S-transférase (GST).....	74
II.2.6. L'étude histologique.....	74
II.2.6. 1. La fixation des échantillons.....	75
II.2.6. 2. La Déshydratation et l'éclaircissement des échantillons.....	75
II.2.6. 3. L'inclusion des échantillons.....	75
II.2.6.4. La réalisation des coupes histopathologique.....	75
II.2.6.5. La coloration.....	75
II.3. Effet des extraits de la plante <i>R.montana</i> sur la réversion de la résistance multiple à la DOX des lignées cellulaires A2780 DX3.....	77
II.3.1. préparation des concentrations des extraits.....	77
II.3.2. Les lignées cellulaires et le milieu de culture.....	77
II.3.3. Le test MTT pour la réversion de la résistance multiple a la DOX par les extraits de <i>R.montana</i>	77
II.4. Analyse statistique.....	79

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits de la plante médicinale	
<i>R.montana</i>	80
I.1.Rendement des extraits.....	80
I.2. Les tests phytochimiques	82
I.3.Etude quantitative	83
I.3.1. Dosage des flavonoïdes.....	84
I.3.2. Dosage des polyphénols totaux.....	85
I.4.Résultats de l'étude qualitative -Chromatographie sur couche mince-.....	86
I.4.1. Composés identifiés dans l'extrait éther de pétrole	86
I.4.2. Composés identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle.....	89
I.4.3. Composés identifiés dans l'extrait butanolique.....	91
I.5. Détermination de l'activité antioxydante des extraits de <i>R. montana</i> par la méthode de DPPH'.....	94
II. Etude de l'effet préventif de l'EAERM sur la cardiotoxicité de la doxorubicine	97
II. 1. Le dosage plasmatique des enzymes CKMB, LDH, ALAT et ASAT	97
II.1. 1. Dosage de l'activité de CKMB.....	97
II.1.2. Dosage de l'activité de LDH.....	98
II.1.3. Dosage de l'activité de l'ALAT.....	100
II.1. 4. Dosage de l'activité de l'ASAT.....	101
II.2. Effet de l'EAERM sur le taux des biomarqueurs de stress oxydant dans le tissu cardiaque....	102
II.2.1. Variation des concentrations en molonydialdéhyde (MDA).....	102
II.2.2. Variation des taux cardiaque en glutathion réduit (GSH).....	103
II.3. Effet de l'EAERM sur l'activité des enzymes antioxydants cardiaque.....	104
II.3.1. Dosage de l'activité enzymatique du catalase.....	104
II.3.2. Dosage de l'activité enzymatique du Glutathion- S-transférase (GST).....	105
II. 4. L'analyse histopathologique.....	106
III. Effet des extraits de la plante <i>R.montana</i> sur la réversion de la résistance multiple à la DOX des lignées cellulaires A2780 DX3	118
CONCLUSIONS ET ERSPECTIVES	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	126
RESUME EN FRANÇAIS	
RESUME EN ARABE	
RESUME EN ANGLAIS	

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP Binding Cassette
ABTS	2,2-0-azino-bis (3- ethylbenzoline-6-sulphonique)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ALAT	Alanine aminotransférase
ANP	Atrial natriuretic peptide
Apaf-1	Apoptosis activating factor-1
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BEM	Biopsie endomyocardique
BNP	Brain natriuretic peptide
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CD	Cardiomyocytes déformées
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzene
CKMB	Créatine phosphokinase
CV	congestion de sang vasculaire
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DONR	Dérivés Oxygénés non Radicalaires
DOX	Doxorubicine
DPPH•	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
DTNB	Acide 5,5-dithio2-nitrobenzoïque
EAERM	Extrait acétate d'éthyle <i>Ruta montana</i>
EBRM	Extrait butanolique <i>Ruta montana</i>
ECG	Echographie cardiaque

EEPRM	Extrait éther de pétrole <i>Ruta montana</i>
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMRM	Extrait méthanolique de <i>R.montana</i>
EN	Endocarde
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FDA	Food and Drug Administration
FEVG	Fraction d'éjection du ventricule gauche
FL-O	Flavonoxy
Fl-OH	Flavonoïdes
FR	Facteur de réversion
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfure oxydé
GST	glutathion S-transférase
G-6-P	Glucose 6-p
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphate déshydrogénase
ClO[•]	hypochlorite
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
4-hydroxynonenal	4-HNE
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50 %
IP	Intra péritonéale
KDa	Kilodalton
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low density lipoprotein
MDA	Malonaldialdéhyde
MDH	Malate déshydrogénase
MDR	<i>multidrug resistance</i>
MRP	<i>Multidrug resistance related protein</i>
MRP1	Multidrug Resistance Protein 1

MTT	(3[4,5- diméthylthiazol-2yl] -bromure de diphenyltétrazolium
MXR	Mitoxantrone Resistance-associated gene
N	Noyaux allongés
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NBDs	Nucleotide Binding Domains
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NO•	Radical oxyde nitrique
NOS	NO synthétase
O₂•⁻	Anion superoxyde
OH•	Radical hydroxyle
OI	œdème interstitiel OI
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P-gp	glycoprotéine-P
PKCs	Protéines Kinase C
PI	pourcentage d'inhibition
P.O	per OS
Rf	Rapport frontal
RLO	Radicaux Libres Oxygénés
RO•	Radical alkoxyde
ROO•	Radical peroxyde
ROOH	Hydroperoxyde
SH	Groupement sulfhydrile
Se-Cys	Séléno-cystéine
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Thiobarbiturique (TBA)
TC	Tissu conjonctif
TCA	Acide trichloroacétique
TMDs	Trans Membrane Domains

TNB

Thionitrobenzoïque

Tyr

Tyrosine

VC

vacuolisations cytoplasmiques

LISTE DES FIGURES

Figure 01 :	Eléments pouvant contribuer au phénomène de résistance pléiotropique.....	05
Figure 02 :	Représentation schématique du transporteur ABC.....	09
Figure 03 :	Modèle « ATP-switch » du cycle de transport des transporteurs ABC.....	10
Figure 04 :	Schéma de la réduction d'une d'hydroperoxydes inorganique (H ₂ O ₂), ou organiques (ROOH) par le GP _X	24
Figure 05 :	Le système rédox du glutathion.....	25
Figure 06 :	Les gènes clés de la cancérogenèse chimique.....	26
Figure 07 :	Structure moléculaire de la doxorubicine.....	28
Figure 08 :	Biotransformation de la doxorubicine.....	30
Figure 09 :	Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline par flip-flop.....	31
Figure 10 :	Schéma des différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la doxorubicine.....	36
Figure 11 :	Enchaînement de base des flavonoïdes - noyau FLAVONE.....	42
Figure 12 :	Structure des hétérosides.....	43
Figure 13 :	Effet scavenger sur les radicaux libres (R [•]) par les flavonoïdes.....	46
Figure 14 :	Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.....	47
Figure 15 :	Sites proposés pour la chélation des ions métalliques.....	47
Figure 16 :	Quelques photos de <i>Ruta montana</i>	51
Figure 17 :	Etapas de l'extraction des flavonoïdes de <i>R.montana</i> par la méthode de Markham.....	59
Figure 18 :	Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	62
Figure 19 :	Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	63
Figure 20 :	La réduction du DPPH [°] par un antioxydant.....	65
Figure 21 :	Principe du dosage de l'activité de la CKMB.....	69
Figure 22 :	Principe du dosage de l'activité de la l'ALAT et de L'ASAT.....	70
Figure 23 :	Principe du dosage de l'activité de LDH.....	70
Figure 24 :	Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique	71
Figure 25:	Principe du dosage du glutathion par l'acide 5,5'-dithiobis (2nitrobenzoïque).....	72

Figure 26 :	Principe du test MTT.....	78
Figure 27 :	Le pourcentage de rendement des extraits de <i>R. Montana</i>	81
Figure 28 :	Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE) des fractions issues d'extrait brut méthanolique de <i>R.montana</i>	84
Figure 29 :	Teneur des Polyphénols totaux (mg EAG/gE) des fractions issues d'extrait brut méthanolique de <i>R.montana</i>	85
Figure 30 :	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse EEPRM par CCM sur gel de silice par les systèmes de solvant ; A: Chloroforme/Méthanol (96/4) et B: Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80.....	87
Figure 31 :	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse EAERM par CCM par les systèmes de solvant ; A : Toluène /Acétate d'éthyle- Méthanol (5/3/1) et B Acétated'éthyle/éther de pétrole (20/80)	89
Figure 32 :	Photo de chromatogramme résultant de l'analyse EBRM par CCM par le système solvant : Chloroforme/ MEO/H ₂ O (65/45/12).....	91
Figure 33 :	Les concentrations des extraits de <i>R. montana</i> qui inhibent 50 % du radical DPPH'.....	96
Figure 34 :	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>R.montana</i> (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de CKMB chez des rats wisar traités par la dox (15 mg/kg i.p).....	98
Figure 35 :	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>R.montana</i> (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de LDH chez des rats wisar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).....	99
Figure 36 :	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>R.montana</i> (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de l'ALAT chez des rats wisar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).....	100
Figure 37 :	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>R.montana</i> (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de l'ASAT chez des rats wisar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).....	101
Figure 38 :	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>R.montana</i> (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur le taux du MDA cytosolique cardiaque chez des rats wisar traités par la doxorubicine (15 mg/kg i.p).....	102
Figure 39 :	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>R.montana</i> (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur le taux du GSH cytosolique cardiaque chez des rats wisar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).....	103

Figure 40 :	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>R.montana</i> (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de la CAT chez des rats wisar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).....	104
Figure 41 :	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante <i>R.montana</i> (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de la GST chez des rats wisar... traités par la DOX (15 mg/kg i.p).....	105
Figure 42 :	Photomicrographe de l'histologie du myocarde (coloration par H&E) des rats du lot témoin	107
Figure 43 :	Photomicrographe de l'histologie du myocarde (coloration par H&E) des rats du lot DOX	108
Figure 44 :	Photomicrographe de l'histologie du myocarde (coloration par H&E) des rats du lot traité par EAERM	109
Figure 45 :	Photomicrographe de l'histologie du myocarde (coloration par H&E) des rats du lot préventif	109
Figure 46	Le test MTT pour la réversion de la résistance multiple des cellules A2780 DX3 par différentes concentrations des extraits de la plante médicinale <i>R.montana</i>	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01 :	Transporteurs ATP-Binding Cassette connus d'être impliqués dans la Chimiorésistance et les agents cytotoxiques qu'ils transportent.....	10
Tableau 02 :	Les principales espèces réactives de l'oxygène.....	17
Tableau 03 :	Principales classes des flavonoïdes et leurs sources alimentaires.....	44
Tableau 04 :	Classification systématique de <i>Ruta Montana</i>	51
Tableau 05 :	Quelques dérivés des métabolites secondaires de l'espèce <i>Ruta montana L.</i>	53
Tableau 06 :	Quelques usages traditionnels du <i>R.montana</i>	54
Tableau 07 :	les systèmes utilisés en CCM sur gel de silice.....	64
Tableau 08 :	L'aspect et la couleur de différents extraits de <i>Ruta montana</i>	80
Tableau 09 :	Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés.....	82
Tableau 10:	Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique de <i>R. montana</i>	83
Tableau 11 :	Résultat de la CCM EEPRM par les systèmes de solvant: Chloroforme/Méthanol (96/4) et Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80.....	88
Tableau 12:	Résultat de la CCM de EAERM par les systèmes de solvant : Toluène /Acétate d'éthyle- Méthanol (5/3/1) et Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80.....	90
Tableau 13 :	Résultat de la CCM de EBRM. Système solvant : Chloroforme/ Méthanol /H ₂ O (65/45/12)	92
Tableau 14 :	Interprétation des couleurs des spots en différentes classes des flavonoïdes.....	93
Tableau 15 :	Les pourcentages de réduction du radical DPPH• par les extraits de <i>R.montana</i>	95
Tableau 16 :	Le facteur de réversion de la résistance multiple des cellules A2780 DX3 par l'EEPRM, EAERM et EBRM.....	

Introduction

INTRODUCTION

Le cancer est une maladie liée à la prolifération incontrôlée de certaines cellules devenues anormales pouvant former une tumeur maligne et même se propager à travers le corps, et il constitue par l'importance du nombre de personnes qu'il atteint un problème majeur de santé publique. En effet, d'après les projections de l'Organisation Mondiale de la Santé (Lodish et al., 2005; OMS, 2006), plus de 8,2 millions de gens meurent du cancer chaque année et ce nombre devrait augmenter de 50 %, d'ici 2020 (OMS, 2013). Lorsqu'un cancer est diagnostiqué chez un patient, de nombreux protocoles de traitements peuvent être envisagés pour en favoriser sa rémission. Les principaux traitements proposés sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (Gascon, 2015). Toutefois la chimiothérapie représente une voie standard des traitements anti-tumoraux.

La doxorubicine (DOX) font partie des procédures de chimiothérapie qui est grandement utilisée en clinique pour le traitement de plusieurs types de cancer dont les leucémies, les lymphomes et pour des tumeurs solides et elle est considérée comme une molécule référence (Andrieu, 2004), Cependant les effets secondaires indésirables associés d'une part et l'apparition d'une résistance des cellules à la DOX d'une autre part, représentent un obstacle majeur d'échec de leur application. En effet, Les mécanismes en cause de la résistance des cellules cancéreuses à la DOX sont très complexes et très divers, mais il est souvent associée à un mécanisme de résistance pleiotropique -la *multidrug resistance* (MDR)- qui est "classiquement" associée à l'augmentation de l'efflux du médicament d'où une diminution de leur concentration intracellulaire (Genoux, 2006) caractérisée par la surexpression de différents transporteurs protéiques transmembranaires de type ABC pour « ATP Binding Cassette» qui présentent, une affinité pour la DOX (Lockhart et al., 2003).

Par ailleurs, les effets secondaires de la DOX se traduisent principalement par le développement d'une cardiotoxicité (Pereira et al., 2011). Les mécanismes par lesquels la DOX induit cette toxicité ne sont pas complètement élucidés, plusieurs hypothèses ont été énoncées ; néanmoins il apparait que l'induction d'un stress oxydant au sein du tissu myocardique par la production des radicaux libres constitue le dénominateur commun de ces mécanismes (Delemasure et al., 2006).

Afin de réduire la cardiotoxicité et la résistance et donc améliorer l'efficacité thérapeutique de la DOX des efforts considérables ont été réalisés, pour identifier des substances à potentiel cardioprotecteur et des modulateurs modifiant la chimiorésistance. Cependant les

Introduction

premiers agents qui sont découvertes s'avèrent nocifs et se révélèrent rapidement inutilisables en raison d'une toxicité inopportune (Robert et al., 2003). Les scientifiques ne cessaient de rechercher et penchent vers les plantes médicinales riches en multiples substances phytothérapeutiques tel que les flavonoïdes qui peuvent être l'arme permettant de faire face à la chimiorésistance de la DOX et au stress oxydant induit par ce médicaments au niveau du cœur et sans effets secondaires des substances classiques.

Dans ce contexte le présent travail vise à étudier, l'effet de la plante médicinale: *Ruta montana* (*R.montana*) sur le stress oxydant induit par la DOX au niveau du cœur et sur la réversion de la résistance à la DOX des lignées cellulaire cancéreuses des ovaires humaine. A notre connaissance cette plante n'a été jamais étudiée pour évaluer ces vertus raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants:

- Une étude phytochimique basée principalement sur: la préparation des différents extraits des flavonoïdes, les testes phytochimiques, une étude qualitative et quantitative des flavonoïdes et des polyphénols afin d'estimer les types des flavonoïdes et la quantité des flavonoïdes et polyphénols, ainsi que l'estimation de l'activité antioxydante des extraits *in vitro*.
- L'évaluation *in vivo* de l'effet préventif de l'extrait de *R. montana* sur le stress oxydant induit par la DOX par le dosage des paramètres biochimiques cardiaque, la détermination des paramètres de stress oxydant dans le tissu cardiaque et l'étude histologique du cœur.
- Etude de l'effet des extraits de la plante *R.montana* sur la réversion de la résistance multiple à la DOX des lignées cellulaires A2780 DX3.

Revue bibliographique

I. La résistance à la chimiothérapie anticancéreuse –multi-drug résistance (MDR)-

I.1.Généralités

La chimiorésistance des cellules tumorales aux médicaments anticancéreux qui est fréquemment appelé résistance pléiotropique aux médicaments ou multi-drug résistance (MDR) représente le plus grand défi apporté à la chimiothérapie des cancers (Robert, 2011), cette résistance thérapeutique peut donc être définie par la diminution de la sensibilité des cellules tumorales et par conséquent la réduction de l'efficacité du traitement (Lauzon, 2008).

Historiquement, le concept de MDR est né en 1970 par June Biedler qui découvre que des lignées cellulaires tumorales, cultivées en présence de dactinomycine, devenaient résistantes à la daunorubicine et à la vinblastine (Biedler & Riehm, 1970) et cette découverte est rapidement confirmée par d'autres auteurs sur d'autres modèles cellulaires, avec des composés cytotoxiques de structure très variée et de mode d'action très différent (Robert, 2011).

Les mécanismes en cause de la résistance pléiotropique des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques sont très complexes et très divers, ils peuvent concerner l'altération de la structure de la cible de médicament qui empêchant la reconnaissance (Tsuruo et al., 2003), l'augmentation du métabolisme impliqué dans la détoxification cellulaire des agents cytotoxique comme le système glutathion /glutathion- s- transférase (Baggetto, 1997) et l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN (Mussett, 2002) mais l'augmentation de l'efflux du médicament de la cellule reste le principale mécanisme par lequel de nombreux cancers développent une résistance aux médicaments chimiothérapeutiques (Genoux, 2006) caractérisée par la surexpression de différentes transporteurs protéiques transmembranaires de type ABC pour « ATP Binding Cassette» (Lockhart et al., 2003), parmi lesquelles, le glycoprotéine-P (Pgp), Multidrug Resistance Protein 1(MRP1) et Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) qui sont les principaux transporteurs ABC humains impliqués dans le phénotype MDR (Genoux, 2006). Ces transporteurs auraient pour effet d'expulser les agents anticancéreux hors des cellules tumorales ce qui diminuerait leur action thérapeutique (Lauzon, 2008).

I.2. Les différentes formes de chimiorésistance

Il semble exister deux formes distinctes de la chimiorésistance des cellules tumorales aux agents cytotoxiques, l'une intrinsèque et l'autre extrinsèque.

I.2.1. La chimiorésistance intrinsèque

C'est le phénomène le plus commun (Kerbel, 2001) elle est appelé aussi résistance innée, naturelle et *de novo* (Mussett, 2002; Longley & Johnston, 2005), dans ce phénotype la tumeur ne répond pas d'emblée à un ou plusieurs traitements cytotoxiques (Genoux, 2006), cette résistance est présente dans les cellules tumorales avant le début du traitement à un quelconque médicament cytotoxique (Meschini et al., 2000). La résistance intrinsèque est un phénomène complexe, Elle dépend non seulement de la lignée cellulaire concernée, mais aussi du type d'agent cytotoxique utilisé (Belpomme, 1991).

I.2.2. La chimiorésistance extrinsèque

Cette résistance est définie comme acquise, elle se développe chez les cellules cancéreuses suite à un traitement de chimiothérapie (Meschini et al., 2000) et implique une résistance au médicament utilisé et aux médicaments ayant une structure chimique différente, d'où le caractère de résistance multiple (Lauzon, 2008), dans ce phénotype la tumeur est initialement sensible à la chimiothérapie anticancéreuse puis devient résistante en cours de traitement ou lors de la rechute. La résistance extrinsèque est probablement due suite à une mutation ou à une amplification génique des cellules cancéreuses qui empruntent ou contournent diverses voies métaboliques pour survivre à l'effet cytotoxique des médicaments.

I.3. Les mécanismes de résistance à la chimiothérapie

Lors du traitement d'un patient avec un agent cytotoxique, l'objectif pharmacologique est de délivrer une quantité maximale d'agent actif à proximité de la cible moléculaire visée afin d'induire la mort des cellules cancéreuses (Lehnert, 1996), néanmoins plusieurs mécanismes de résistance influencent la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques (**Figure 1**).

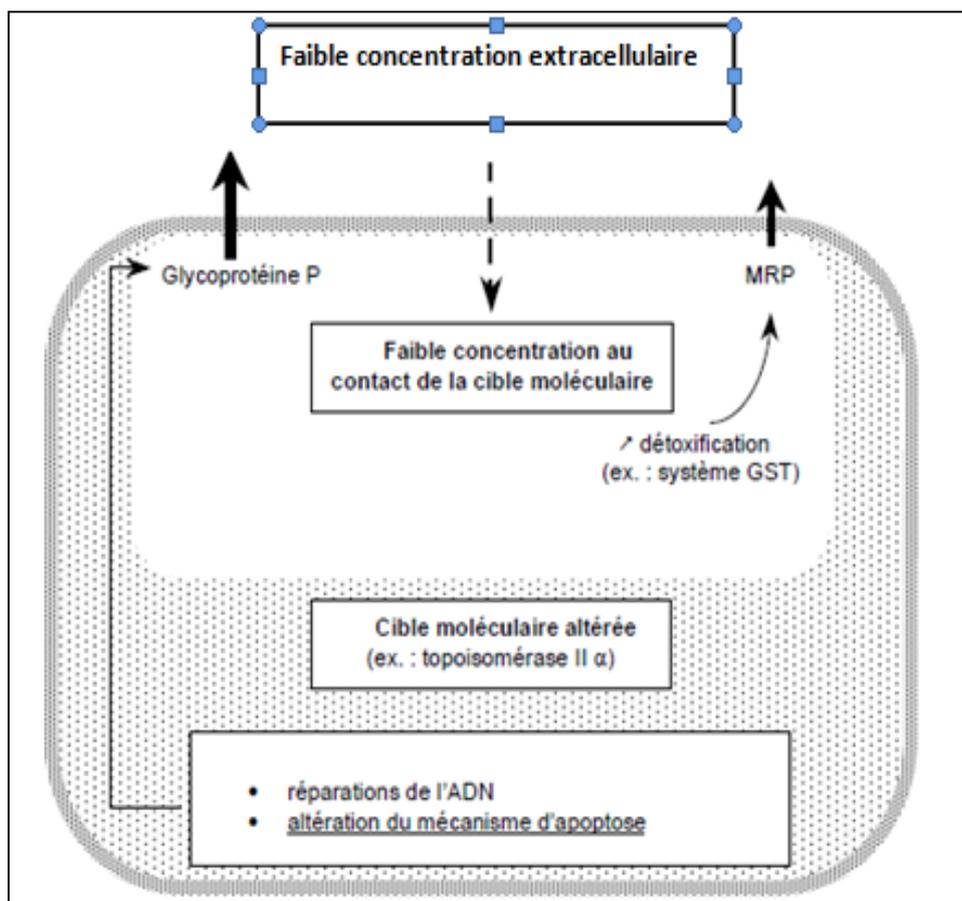


Figure 1 : Eléments pouvant contribuer au phénomène de résistance pléiotropique (Lehnert, 1996).

Ces mécanismes peuvent être directement associés à la cellule même ou bien au microenvironnement cellulaire (L'espérance, 2008) et parfois, ils sont communs à de multiples agents anticancéreux, soit parce qu'ils partagent la même cible, ou encore parce qu'ils nécessitent les mêmes systèmes d'activation ou de transport (Robert, 2011).

Les différents mécanismes de résistance à ce jour sont très complexes et très divers et peuvent concerner:

- A. Des propriétés tissulaires intrinsèques;** qui empêchent l'agent anticancéreux d'atteindre une concentration suffisante à proximité de la cible (Mussett, 2002) à cause de la mauvaise vascularisation de tumeur (Genoux, 2006). ou pourrait être due à la présence de barrière naturelle comme la barrière hémato-encéphalique du système nerveux central qui empêche l'accès des médicaments aux cellules cancéreuses (Schinkel et al., 1994; Genoux, 2006).

B. Altération quantitative et/ou qualitative du métabolisme de l'agent cytotoxique par;

- L'augmentation de l'inactivation des intermédiaires réactifs engendrés par la chimiothérapie par l'hyperactivité des enzymes de détoxification comme le glutathion S-transférase (GST) ((Belpomme, 1991; Tew, 1994; Hayes & Pulford, 1995; Genoux, 2006) ou l'augmentation de la synthèse du glutathion impliqué dans la détoxification cellulaire de médicament en se liant à celles-ci par réaction de glutathio-conjugaison par l'intermédiaire du système GST (Tew, 1994; Mussett, 2002; Gatti & Zunino, 2005; Lauzon, 2008).
- Diminution ou inhibition du système enzymatique impliquée dans l'activation des agents cytotoxiques de type « pro-drugs » (Belpomme, 1991; Genoux, 2006).

C. Résistance par modification des protéines ou enzymes cibles; qui peuvent être quantitative par la surexpression, ou la diminution de l'expression de la cible ou qualitative par des altérations génétiques (mutations) (Chauffert, 1999; Genoux, 2006) ou fonctionnelles (interactions avec d'autres protéines, localisation cellulaire) dans celle-ci empêchant la reconnaissance (Zeshaan & rubin, 2003), à titre d'exemple, l'altération ou la dégradation de l'enzyme topoisomérase II peut diminuer la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux tels que les anthracyclines. (Beck, 1989; Brown et al., 1995; Tsuruo et al., 2003).

D. L'augmentation des mécanismes de réparation des anomalies de l'ADN induites par les agents anticancéreux; ce qui peut entraîner l'apparition d'une résistance non spécifique aux ces agents (Bénard, 1996; Lehnert, 1996), Par exemple, le mécanisme Nucleotide Excision Repair (NER) semble être le mécanisme prédominant de réparation impliqué dans la réponse au cisplatine par l'excision des adduits Cisplatine- ADN par un complexe protéiques (Chauffert, 1999) (au moins 17 protéines différentes) mais seulement la surexpression de quelques unes est suffisante pour amener une résistance à cet agent, comme le protéines ERCC1 qui corrèle avec une mauvaise réponse au Cisplatine dans les cancers de l'ovaire, de l'estomac et du poumon (Longley & Johnston, 2005).

- E. Régulation négative du signal de mort cellulaire programmée nécessaires à la régression tumorale** (Lehnert, 1996); par la modification de l'expression des gènes apoptotiques comme la surexpression des gènes anti-apoptotiques comme le Bcl₂ ou l'évasion des processus pro-apoptotiques par l'inactivation de gène suppresseur de tumeur P₅₃ (Lowe, 1994; Genoux, 2006 ; L'espérance, 2008).
- F. Altération du transport transmembranaire des agents anticancéreux;** qui a été liée à la diminution de la captation intracellulaire des drogues dans la cellule (Gerhard, 1993), En ce sens, la matrice extracellulaire qui entoure les cellules tumorales agit comme une barrière de protection contrant la pénétration de la drogue à l'intérieur de la tumeur (Morin, 2003) de plus, la surexpression de protéines transmembranaires, pourraient également être un facteur causant le développement du phénotype MDR, puisque ces protéines auraient pour effet d'expulser les agents anticancéreux hors des cellules tumorales ce qui diminuerait leur action thérapeutique (Lauzon, 2008).

Ce dernier mode de résistance qui implique des protéines transmembranaire, comptant parmi les transporteurs ABC, caractérisé par une diminution des concentrations intracellulaires des agents cytotoxiques est le mécanisme principal par lequel de nombreux cancers développent une résistance aux médicaments chimio-thérapeutiques de plus c'est l'un des mécanismes les mieux étudiés (Belpomme, 1991; Gerhard, 1993; Genoux, 2006).

I.4. La chimiorésistance liée aux protéines de transport

La première ligne de défense que les agents anticancéreux peuvent rencontrer au moment de leur pénétration dans les cellules tumorales est la présence de pompes transmembranaires (Mussett, 2002) appartenant à la superfamille des *ATP-binding-cassette* protéines (ABC protéines) (Corinne, 2001).

I.4. 1. Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC sont la catégorie la plus importante des protéines transmembranaires de transport existant chez les procaryotes et les eucaryotes et le génome associé est très conservé parmi les espèces (Lockhart et al., 2003). Chez l'humain, ces transporteurs englobent une cinquantaine de protéines divisées en 7 sous-familles (ABCA à ABCG) (Stefkova *et al.*, 2004). Ces protéines transportent contre un gradient de concentration

une grande variété de substrats endogènes ou exogènes tels que les phospholipides, les peptides, les polysaccharides, les hormones stéroïdes les médicaments et les xénobiotiques, à travers la membrane plasmique ainsi que les membranes des compartiments intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, les peroxyosomes et la mitochondrie en utilisant l'énergie procurée par l'hydrolyse de l'ATP (Depeille *et al.*, 2004; Stefkova *et al.*, 2004). Plusieurs protéines de transport associées à la résistance pléiotropique des agents anticancéreux, appartiennent à cette superfamille; la première à avoir été décrite est la glycoprotéine-P (P-gp) (Endicot & Ling, 1989), puis la *multidrug resistance related protein* (MRP) (Cole *et al.*, 1992).

I.4.1.1. Aspect structural des transporteurs ABC

La topologie générale des transporteurs ABC chez les eucaryotes est bien conservée, leurs principales caractéristiques structurales consistent en 4 domaines dont deux domaines transmembranaires ou Trans Membrane Domains (TMDs) intégrés dans la membrane qui permettent la fixation des substrats et leur passage à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique et deux domaines nucléotidiques cytosoliques hydrophile ou Nucleotide Binding Domains (NBDs) qui assurent la fixation de l'ATP et son hydrolyse pour alimenter le processus de transport (**Figure2**) (Leslie *et al.*, 2001; Higgins & Linton, 2004).

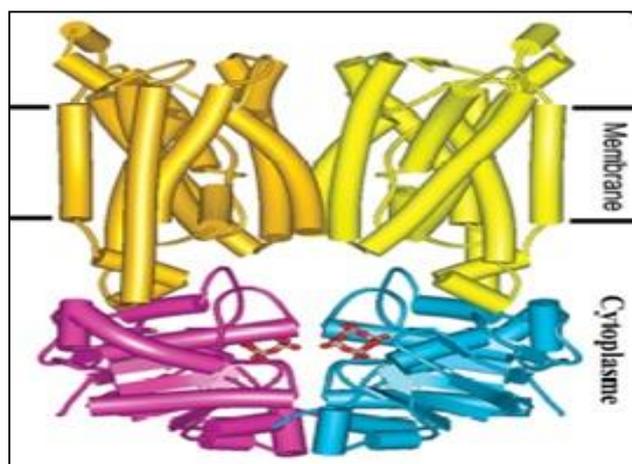


Figure 2 : Représentation schématique du transporteur ABC (Higgins & Linton, 2004).

I.4.1.2. Aspect fonctionnel des transporteurs ABC

Le mécanisme « *ATP-switch model* » est le premier modèle de transport des substrats par les transporteurs ABC (Higgins, 2004) qui implique des corrélations de modifications conformationnelles dans les deux directions entre les NBDs et TMDs en plusieurs étapes (**Figure3**) :

- L'état de repos: le transporteur est dépourvu d'ATP et dispose d'une forte affinité pour le ligand.
- La formation de complexe ligand-transporteur: La liaison du ligand aux TMDs entraîne un changement de conformation des NBDs et par conséquent une augmentation de l'affinité des NBDs pour l'ATP.
- La liaison de l'ATP au NBDs: La liaison de l'ATP à la conformation fermée des NBDs altère l'affinité pour le ligand et permettent sa libération.
- L'hydrolyse de l'ATP : l'hydrolyse de l'ATP initie la dissociation du dimère de NBDs, par déstabilisation de la conformation fermée du dimère.
- Retour à l'état de repos: la libération du phosphate, produit de l'hydrolyse de l'ATP, provoque des changements conformationnels des NBDs et des TMDs. Le dimère de NBDs est alors dissocié et retourne en position ouverte car l'affinité pour l'ADP produit est faible. Celui-ci est alors libéré. Le cycle de transport est complet

permettant également de restaurer l'état de haute affinité du transporteur pour le ligand.

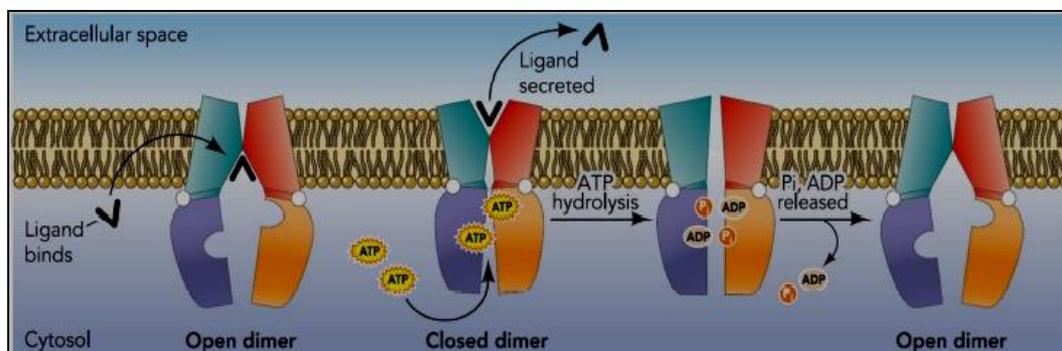


Figure 3 : Modèle « ATP-switch » du cycle de transport des transporteurs ABC (Linton, 2007).

I. 4.2. Les principaux transporteurs ABC impliqué dans le phénotype MDR

Parmi les 50 membres connus de la superfamille des transporteurs appartenant aux ABC protéines, la glycoprotéine-P (P-gp ou ABCB1), la Multidrug Resistance protein 1 (MRP1 ou ABCC1) et la protéine de résistance du cancer du sein (Breast Cancer Resistance Protein –BCRP- ou ABCG2) sont largement impliquées dans le phénotype MDR et sont les plus connus et les mieux étudiés. Ceux-ci sont résumés dans le **tableau 1** (Genoux, 2006; Huang & Sadée, 2006).

Tableau 1: Transporteurs ATP-Binding Cassette connus d'être impliqués dans la Chimiorésistance et les agents cytotoxiques qu'ils transportent (Genoux, 2006; Huang & Sadée, 2006).

Nom commun	L'autre nom	Nom systématique	Agents cytotoxique
P-gp	MDR1	ABCB1	Anthracycline,taxanes, imatimib vincaalkaloïdes
MRP1	_	ABCC1	Doxorubicin, epirubicin, etoposide, methotrexate, vincristine, vinorelbine
BCRP	MXR, ABCP	ABCG2	Daunorubicin, doxorubicin, mitoxantrone, topotecan
MDR2	_	ABCB4	Paclitaxel, vinblastine

I.4.2.1. La glycoprotéine-P

En 1976, Juliano et Ling furent les premiers à mettre en évidence, dans des cellules cancéreuses résistantes, la corrélation entre la diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments et l'augmentation de l'expression d'une glycoprotéine de haut poids moléculaire (170 kDa), qu'ils appellent glycoprotéine P (pour *Perméabilité*) (Juliano & Ling, 1976), présente à l'état naturel dans la membrane de certaines cellules normales et en quantité augmentée dans celle des cellules résistantes (Deuchars & Ling, 1989; Marie, 1990), codée par le gène appelé, d'un commun accord, *MDR1*, pour *Multidrug Resistance*, avant de prendre son nom officiel, *ABCB1*, qui montre l'appartenance de la glycoprotéine P à la famille des transporteurs ABC.

Sa structure contient deux domaines TMDs et deux NBD ainsi que les caractéristiques structurales typiques reliées aux transporteurs ABC (Leslie et al., 2005). Comme il a été décrit auparavant les protéines ABC transportent contre un gradient de concentration une grande variété de substrats endogènes ou exogènes, mais la glycoprotéine P, ne fut transporté aucun composé physiologique, c'est-à-dire aucun substrat endogène : il semble bien qu'elles aient été conservées par l'évolution uniquement dans le cadre de la protection des organismes supérieurs contre les toxines végétales (alcaloïdes) et bactériennes (antibiotiques) (Robert, 2011).

la P-gp confère aux cellules tumorales exposées à des médicaments, un phénotype MDR dit « classique », impliquant une résistance à quatre classes de médicaments couramment utilisées: les anthracyclines, les alcaloïdes vinca, les taxanes et les épipodophyllotoxines (Endicott & Ling, 1989; Gottesman & Pastan, 1993; Hipfner et al., 1999). Il a été découvert que la P-gp interagirait directement avec les médicaments hydrophobes contenus dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique et les transporterait vers l'extérieur de la cellule, de manière énergie dépendante nécessitant l'hydrolyse de l'ATP (Ling, 1997; Hennessy & Spiers, 2007).

I.4.2.2. La protéine MRP1

En 1992, Cole et ses collaborateurs mettent en évidence la surexpression d'un autre transporteur dans certaines lignées cellulaires cancéreuses résistantes à la doxorubicine, ce dernier a été désigné : MRP1 (Multidrug Resistance protein 1) (Cole et al., 1992), Qui est une glycoprotéine de 190 kDa, et de 1531 acides aminés (Cole et al., 1992; Almquist et al., 1995; Hirose, 2002).

Elle appartient, comme la glycoprotéine P, à la superfamille ABC des transporteurs membranaires consommateurs d'ATP (Leier, 1994; Chauffert, 1999; Hipfner et al., 1999). MRP1 serait, jusqu'à maintenant, la première de 7 protéines (MRP1 à 7) et appartiendrait à la sous-famille ABCC1 (Hipfner et al., 1999). Son homologie de séquence avec d'autres transporteurs ABC et notamment avec la glycoprotéine-P a permis de proposer un modèle de sa topologie, à savoir : deux domaines transmembranaires (TMD) comportant 6×2 hélices et deux domaines nucléotidiques (NBD) communs aux ABC mais également un domaine transmembranaire supplémentaire comportant 5 hélices transmembranaires (Genoux, 2006).

L'expression de la protéine MRP1 par les tissus humains normaux incite à penser que la MRP1 possède un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire (Jedlitschky, 1994; Leier, 1994; Müller, 1994). Il a été démontré que la protéine MRP1 est une pompe transmembranaire énergie dépendante permettant de transporter les composés toxiques tels que les produits de la peroxydation des lipides, herbicides, et mycotoxines conjugués au glutathion, ce qui préviendrait leur accumulation intracellulaire et évoquant ainsi un rôle de détoxification cellulaire (Leslie et al., 2001; Hirose, 2002).

La protéine MRP1 est surexprimée dans la membrane de plusieurs lignées cellulaires résistantes dérivées de différents tumeurs incluant les cancers du poumons, colon, sein, vessie, prostate, thyroïde, col utérin, gliome, neuroblastome et leucémie (Hipfner et al., 1999). Cette surexpression de MRP1 Dans les cellules résistantes, cause une augmentation de l'efflux ATP-dépendant de plusieurs agent anticancéreux tels que les anthracyclines (doxorubicine et donomycine), les alcaloïdes de la pervenche (vincristine et vinblastine) et les épipodophyllotoxines (étoposide et téniposide) (Cole et al., 1994; Huang & Sadée, 2006) hors des cellules, ce qui a pour conséquence de diminuer sa concentration intracellulaire (Renes et al., 2000; Lockhart et al., 2003). Le cycle de transport de MRP1 (ou ABCC1) suit le modèle « *ATP-switch* » des transporteurs ABC (Boumendjel, 2009).

I.4.2.3. La protéine ABCG2

Le gène codant pour cette protéine a été découvert dans les années 90 dans les cellules de cancer du sein, d'où son nom BCRP (Breast Cancer Resistance Protein) (Yang, 1995) puis dans les cellules du placenta ABCP (ABC transporter in Placenta) (Allikmets, 1998) et vers la fin des années 90, Miyake et ces collaborateurs ont isolé ce gène à partir d'une lignée

cellulaire humaine de carcinome du colon hautement résistante au mitoxantrone ; qui fût alors nommé Mitoxantrone Resistance-associated gène pour (MXR) (Miyake, 1999). L'analyse phylogénétique de ce transporteur avec d'autres transporteurs ABC a permis le rapprochement avec ABCG1. Il appartient donc à la sous-famille des ABCG et la protéine a donc été ensuite appelée ABCG2 (Genoux, 2006).

Le gène ABCG2 code une protéine membranaire composée de 655 acides aminés et d'un poids moléculaire de 72.1 kDa. C'est un demi-transporteur, qui comporte un TMD constitué de 6 hélices transmembranaires et un NBD. Seule une homo-dimérisation permet de rendre la protéine fonctionnelle (Genoux, 2006).

ABCG2 est exprimée de manière quantitativement variable dans la membrane plasmique des cellules de nombreux tissus. Il joue un rôle dans la protection contre les xénobiotiques (Brechtbuhl, 2010). Les premières études sur ABCG2 ont été effectuées sur des lignées cellulaires sélectionnées résistantes à un agent chimiothérapeutique donné. Les premiers substrats alors connus d'ABCG2 sont essentiellement des anticancéreux, comme par exemple la mitoxantrone, la camptothécine, les antimétabolites comme le méthotrexate (antifolate) et les inhibiteurs des topoisomérases (Genoux, 2006).

I.5. La réversion de la multi-drug resistance

Dès la découverte du phénotype MDR, la résistance liée à la surexpression des protéines transmembranaires est considérée comme le mécanisme principal par lequel de nombreux cancers développent une résistance aux médicaments chimiothérapeutiques, c'est dans ce sens là que de nombreux travaux ont été réalisés afin d'identifier des composés « chimiosensibilisateurs » ou agents réversants appelés aussi modulateurs, c'est-à-dire capables de restaurer l'activité des anticancéreux en empêchant leur expulsion de la cellule par l'inhibition des protéines de transport (Volm, 1998; Krishna,2000; Corinne, 2011). Le meilleur modulateur est celui dont on pourrait obtenir un taux sérique supérieur à celui nécessaire, *in vitro*, pour inhiber complètement le transporteur, diffusant bien dans le tissu tumoral, *in vivo* et dénué de toxicité (Mussett, 2002).

Les premiers agents modifiant la chimiorésistance furent des composés, issues de classes pharmacologiques très diverses, utilisés en thérapeutique pour d'autres indications comme le vérapamil (bloqueur des canaux calciques), utilisé comme hypotenseur, la cyclosporine A, comme immunosuppresseur, la quinidine, comme anti-arythmique, et bien d'autres (Robert & Jarry, 2003), se montrèrent actifs sur la réversion de la résistance dans les leucémies aiguës myéloïdes, les lymphomes non- Hodgkiniens et les myélomes. Ces composés « de première génération », se révélèrent rapidement inutilisables en raison précisément de leurs propriétés pharmacologiques propres qui apportaient une toxicité inopportune (Robert & Jarry, 2003).

Par ailleurs, l'utilisation des modulateurs « de deuxième génération » qui sont des dérivés de ces différentes molécules tels que dexvérapamil; le PSC-833 ou valsopodar, analogue non immunosuppresseur de la cyclosporine A; ou encore le MS-209 ou dofequidar, analogue des quinolines, possèdent des résultats probants parce qu'ils dépourvus de leurs propriétés pharmacologiques indésirables et conservant leur capacité de réversion de la MDR, malheureusement ils ne furent pas considérés comme suffisamment actifs pour être mis sur le marché (Robert, 2011).

Plus récemment, divers chimistes s'intéressent à la modulation du phénotype MDR par des composés synthétiques qui dits « de troisième génération », actifs à des concentrations 100 fois inférieures à celles atteintes par les composés des 1^{re} et 2^{ème} générations (Robert & Jarry, 2003).

Certains de ces composés sont montrés actifs mais, pour des raisons inconnus, n'ont pas atteint, eux non plus, le statut de médicament (Robert, 2011). Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour ces chimio-sensibilisateurs : Ils peuvent affecter la fonction de transport en se liant directement aux protéines par inhibition compétitive ou non compétitive. En outre, ces composés peuvent aussi agir indirectement sur ces protéines par altération de la structure des membranes cytoplasmiques, inhibition des protéines Kinase C (PKCs) qui sont impliquées dans la régulation de l'expression de ces protéines et déplétion de glutathion réduit (GSH) (Mussett, 2002; Corinne, 2011).

Actuellement, les recherches biologiques se penchent vers l'étude du potentiel de certaines substances naturelles et extraits de plantes médicinales pour limiter la chimiorésistance des agents anticancéreux et de sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie conventionnelle sans les effets secondaires rapportés avec les inhibiteurs classiques des transporteurs membranaires. En effet on peut citer l'exemple de l'extrait de la plante *Rhizoma Alismatis* qui (Songyot et al., 2002) a des propriétés réversantes, permettant d'inhiber les transporteurs membranaires.

Le curcumin, qui est un composé polyphénolique naturel retrouvé dans les rhizomes de *Curcuma longa*, s'avère être un agent modulateur de l'expression et de la fonction de la Pgp. Ainsi l'effet chimio-sensibilisateurs des flavonoïdes sur de nombreux lignées cellulaires a été apporté par plusieurs travaux (Imai et al., 2004; Zhang et al., 2005; Morris & Zhang, 2006; Sylwia Borska 2012; Victor Kuete 2014).

C'est dans ce contexte, que nous allons tester la réversion de la résistance multiple à la DOX par les extraits de la plante médicinale algérienne *Ruta montana* qui est riche par de nombreux métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les phénols, les triterpènes secondaires connues par leurs capacités antioxydantes.

II. Stress oxydant, radicaux libres et antioxydants

II.1. Définition de stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre dans la balance entre les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) et les systèmes de défenses antioxydants, que se soit par déficit en antioxydants, par suite d'une surproduction de radicaux libres ou une combinaison de ces deux facteurs (Ece et al., 2007).

II. 2. Les espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres

Les ERO regroupent les radicaux libres oxygénés (RLO) et certains dérivés oxygénés non radicalaires (DONR).

II.2.1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atome ou molécule) hautement réactives (demi-vie courte); possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche orbitale la plus externe qui cherchent à se stabiliser (Morrisset al., 1995; Halliwell & Gutteridge, 1989), et ils ont tendance: soit par appariement avec des électrons arrachés sur d'autres molécules situées dans un environnement proche en causant leur oxydation soit par le transférer d'un électron en causant leur réduction, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Delattre et al., 2005). Les radicaux libres peuvent être des radicaux centrés d'oxygène, d'azote ou de carbone (Fusco et al., 2007). Les radicaux qui endommagent les systèmes biologiques sont, en particulier, des radicaux libres d'oxygène (RLO), plus connus sous le nom de «Espèces Réactives de l'Oxygène» ou «ERO» (Rahman, 2007).

On peut distinguer deux types des radicaux libres :

- **Les radicaux libres primaires;** qui dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}). Ils jouent un rôle particulier en physiologie (Baskin & Salem, 1994; Darley-Usmar et al., 1995).

- **Les radicaux libres secondaires;** issus de la réaction des radicaux libres primaires avec les molécules biochimiques de la cellule (lipides, protéines, glucides...) (Baskin& Salem, 1994).

II.2.2. Les dérivés oxygénés non radicalaires

Ce sont des molécules ne possédant pas d'électron célibataire, comme l'oxygène singulet $1O_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas ainsi des radicaux libres, mais sont des précurseurs de radicaux libres et douées d'une réactivité semblable (Morris et al., 1995; Favier, 2003; Delattre, 2005).

Les principales espèces réactives de l'oxygène générées dans les systèmes biologiques sont montrées dans le (**Tableau 2**).

Tableau 2: Les principales espèces réactives de l'oxygène (Delattre, 2005)

Type des ERO	Nom de l'ERO	Symbole chimique
Radicaux libres oxygénés	Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$
	Radical hydroxyle	OH^{\bullet}
	Radical peroxyde	ROO^{\bullet}
	Radical alkoxyde	RO^{\bullet}
	Radical oxyde nitrique	NO^{\bullet}
	Peroxinitrite	$ONOO^{\bullet}$
	Hypochlorite	ClO^{\bullet}
Dérivés oxygénés non radicalaires	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
	Hydroperoxyde	$ROOH$
	Oxygène singulet	$1/2O_2$
	Nitroperoxyde	$ONOOH$

II. 3. Les sources des ERO

Les ERO peuvent avoir une multitude de sources soit exogènes ou endogènes

II. 3.1. Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des ERO comme; Les toxiques environnementaux tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂) (Kohen & Nyska., 2002), quelque médicaments comme les anticancéreux tels que les anthracyclines (Pein et al., 1995; Sinha et al., 1989), Les xénobiotiques comme les herbicides (Kohen & Nyska., 2002), l'ingestion d'alcool (Albano et al 1999), la contamination par les métaux lourds et les composés chlorés (Priyadarsini, 2005), Les rayonnements ionisants (rayons X et gamma) (Kohen & Nyska., 2002; Schrder & Krutmann, 2005; Sasaki, 2006, Sinhaet al., 1989) et non ionisants (rayons UV) (Sinha et al., 1989; Chen et al., 2012).

II. 3.2. Sources endogènes

La production endogène des ERO dans les cellules des mammifères découle de plusieurs sources, de manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir la molécule d'oxygène est susceptible d'être à l'origine d'une production d'ERO (Hamanaka, 2010); La mitochondrie au cours du transfert d'électrons dans sa chaîne respiratoire pendant le métabolisme énergétique cellulaire produirait 90 % des ERO. (Balaban et al, 2005; Milane, 2004; Haton, 2005 ; Borg & Reeber, 2008). Les phagocytaires comme les macrophages ou les polynucléaires au cours de l'inflammation s'accompagne d'une production massive d'espèces réactives de l'oxygène agissant contre les infections microbiennes en lysant les agents microbiens phagocytés (Ahmad, 1995; Krause, 2004).

Les peroxysomes hépatique et rénale renferment de nombreuses enzymes générant le H₂O₂ qui est utilisé comme substrat par la catalase peroxysomale afin de réaliser des réactions de peroxydation importantes dans le processus de détoxification des xénobiotique (Moure et al., 2001; Belviranli & Gökbél, 2006; Schisler & Singh, 1989) ainsi que les microsomes qui contiennent, le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant les ERO (Morel et al., 1999).

Les ERO sont produits aussi *in vivo* sous l'action de plusieurs systèmes enzymatique comme celle décrit auparavant dans les organites cellulaires tels que les enzymes mitochondriales de la chaîne respiratoire, la myéloperoxydase des phagosomes, les

cytochromes P450 du réticulum endoplasmique et les enzymes des peroxysomes. D'autres enzymes sont également sources de génération des radicaux libres tel que les cyclo- et lipoxygénases (Harrison, 2002; Milan, 2004), NADPH oxydase (Delattre et al., 2005; Babior, 1999), la xanthine oxydase/déshydrogénase (Salvayre et al., 2005) et NO-synthase (NOS) (Servais, 2004).

II. 4. Le rôle des ERO dans la physiologie cellulaire

Les ERO participent à divers processus physiologique à dose raisonnable. En effet, Ils remplissent de très nombreuses fonctions important, ils régulent le phénomène d'apoptose, en entraînant la destruction des cellules tumorales en agissant comme second messenger (Valko et al, 2006 ; Thannickal & Fanburg, 2000 ; Droge, 2002; Wang et al., 1999), Ils jouent un rôle essentiel dans la défense immunitaire contre les agents pathogènes par l'activation des facteurs de transcription, eux mêmes responsables de l'activation de gènes impliqués dans la phagocytose ou par l'oxydation de l'ensemble des composants bactériens au sein du phagosome (Favier, 2003; Delattre et al., 2005). Les ERO peuvent aussi intervenir dans la transduction de signaux cellulaires (Delattre et al., 2005) et impliqués dans les phénomènes de cycle cellulaire, de la croissance et de la différenciation cellulaire, et participent aussi au fonctionnement de certaines enzymes (Favier, 2003).

II.5. Principales cibles des ERO

A concentration élevée les ERO peuvent engendrer des lésions importantes sur toutes les macromolécules contenues dans les cellules, particulièrement les lipides, les protéines, l'ADN et les glucides (Koechlin, 2006).

II.5.1. Les lipides

Les lipides membranaires et surtout leurs acides gras polyinsaturés (AGPI) comme l'acide linoléique ou l'acide arachidonique sont facilement oxydables par les ERO (Pincemail, 2006), ce qui peut diminuer la fluidité des membranes ainsi que l'activité de leur protéines transmembranaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (Favier, 2003; Valko et al., 2006). L'oxydation des lipides aboutit à la formation des aldéhydes toxiques dont le 4-hydroxynonanal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA) qui a une demi-vie plus longue que celle des radicaux libres et diffuse facilement. Il peut former des liaisons avec les bases de l'ADN et devenir un

mutagène et peut donc être considéré comme un marqueur de la peroxydation lipidique (Milane, 2004; Favier, 2003; Delattre et al., 2005).

L'attaque des lipides peut concerner aussi les lipoprotéines circulantes aboutissant à la formation de LDL (low density lipoprotein) oxydées qui formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardio-vasculaires (Favier, 2003).

II.5.2. Les protéines

De nombreux enzymes cellulaires, des protéines de transport et des protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif vont ainsi être oxydés par les radicaux libres et inactivés (Jacques & André, 2004).

Les acides aminés des chaînes de protéine les plus sensibles à l'oxydation par les radicaux libres sont surtout celles qui comportent le groupement sulfhydryle (fonction thiol – SH-) tels que la cystéine et la méthionine (Favier, 2003; Tratner, 2003), leur oxydation conduit à la formation de ponts disulfures (Ahmad, 1995; Favier, 2003) et donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines et les acides aminés aromatiques comme la tyrosine formant des bi-tyrosine (Tyr-Tyr) qui conduit à la réticulations des protéines. Les radicaux libres sont aussi capables de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques (Koechlin, 2006). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Favier, 2003; Jacques & André, 2004).

II.5.3. L'ADN

- Les ERO représentent des ennemis permanents vis-à-vis de l'intégrité de la molécule d'ADN, ils peuvent induire des effets mutagènes, des erreurs de réplifications de l'ADN, l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, et encore une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogenèse (Valko et al., 2006). Les altérations oxydatives de l'ADN sont induites dans la majorité des cas, par le radical hydroxyle. Lorsque le peroxyde d'hydrogène échappe aux enzymes de régulation, il gagne le noyau de la cellule et réagit avec les ions Fe^{2+} et Cu^{2+} associés à la chromatine produisant ainsi *in situ* le radical hydroxyle qui attaque l'ADN la plus proche (Valko et al., 2007) Plus de 100 lésions différentes peuvent être générées directement par l'attaque de ces sous produits de l'oxygène. Les lésions les plus fréquentes incluent; l'oxydation des bases (Singal et al., 1988; Valko et al., 2006).

les cassures de brins (Favier, 2003 ; Rehman et al., 1999), la formation de site abasique (Favier, 2003), le Pontages ADN -protéines (Morris et al., 1995 ; Favier, 2003; Krippeit-Drews et al., 1994) et la formation d'adduits (Feng et al., 2004).

II.6. Pathologie ciblée des radicaux libres

La surproduction des espèces réactives de l'oxygénées sont impliqués dans l'étiologie de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à l'évolution des complications, la plupart des maladies apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux libres (Ferrari, 2001; Favier, 2003; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Les radicaux libres peuvent favoriser l'apparition de cancer par l'oxydation de l'ADN qui provoque des mutations qui peuvent concerner des gènes clés du développement d'un clone de cellules tumorales tel que les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes intervenant dans la restauration des télomères (par exemple la télomérase) (Marnett, 1987; Cerutti, 1994). L'augmentation de la production d'espèces réactive de l'oxygène intervenant également dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose par l'oxydation des LDL plasmatique contenant une grande quantité d'acide gras polyinsaturés (lesgards et al., 2002; Beaudeau, 2006).

Les radicaux libres jouent également un rôle dans la genèse des maladies neurodégénératives tel que la maladie d'alzheimer et de parkinson qui sont caractérisés par l'augmentation intracérébrale du MDA signe de la lipoperoxydation (Desport, 2002).

Le diabète, constitue un exemple des maladies associées au stress oxydant. Il est maintenant admis que des concentrations élevées de glucose extra et intracellulaires induisent un stress oxydant par l'autoxydation du glucose et la glycation des protéines (Bonfont, 2004). Dans de nombreuses autres situations pathologiques comme le sida ou l'insuffisance rénale et les maladies rhumatismales le stress oxydant est un épiphénomène à l'établissement de la pathologie mais participe à ses complications immunitaires ou vasculaires (Favier, 1997).

II.7. Systèmes de défenses antioxydants

Une substance est considérée antioxydant, lorsqu'elle est susceptible à une concentration relativement faible en comparaison avec celle du substrat oxydable d'inhiber

significativement la production, de limiter la propagation ou de neutraliser les métabolites réactifs de l'oxygène (Abuja & Albertini, 2001; Favier, 2003) et par conséquent retardé ou empêché les dommages oxydatifs dans les tissus (Bandyopadhyay et al., 2007).

Les systèmes antioxydants peuvent être classés en deux groupes principaux: les antioxydants d'origine endogène et les antioxydants d'origine exogènes comprenant des antioxydants alimentaire présents dans certains fruits et légumes.

II.7.1. Les systèmes antioxydants endogènes

Les antioxydants endogènes, sont enzymatiques et non enzymatiques (Pincemail et al., 2002).

II.7.1. 1. Les antioxydants endogènes enzymatiques

L'organisme humain possède des systèmes de défense enzymatique primaire reconnus comme étant les plus performants, utilisés comme première ligne de défense en prévenant la formation des ERO, constitué principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) (Avissar et al., 1989).

➤ La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une métalloenzyme intracellulaire qui assure la première ligne de défense contre le stress oxydant (Comhair & Erzurum, 2001; Mates et al., 1999 ; Milane, 2004). Chez l'homme, les plus hauts niveaux de SOD se trouvent dans le foie, la glande surrénale, les reins et la rate (Scheibmeir et al. , 2005) et elle est classée en quatre isoenzymes selon la nature d'ion métallique du site actif et leur localisation cellulaire: la SOD cytosolique et nucléaire à cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), mitochondriale à manganèse (Mn-SOD), extracellulaire (EC-SOD) qui est une SOD à cuivre et zinc (Crapo, 1997) située sur la face externe de la membrane des cellules endothéliales, l'espace interstitiel des tissus et des fluides extracellulaires et p Cu/Zn-SOD pour celle présente dans le plasma (Mates et al., 1999 ; Milane, 2004).

Ces isoenzymes de la SOD catalysent la même réaction de dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène composé moins toxiques (Comhair & Erzurum, 2001) selon la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène formé peut être à son tour éliminé par deux autres enzymes : La catalase et la glutathion peroxydase.

➤ La catalase

La catalase (CAT) est une enzyme héminique joue un rôle significatif dans le contrôle de la concentration de peroxyde d'hydrogène (généralement produit par les SOD) afin d'éliminer leur excès par une réaction de dismutation en une molécule d'eau et d'oxygène moléculaire qui sont des composés stables selon la réaction suivante (Lindau- Sehpard & Shaffer, 1993).



La catalase est une enzyme tétramérique, chaque monomère comporte un noyau porphyrinique avec un atome central de fer à l'état Fe^{3+} lié au site actif et une molécule de NADPH protégeant ainsi d'une éventuelle inactivation par le peroxyde d'hydrogène et augmente son efficacité (Bonfont-Rousselot et al., 2003). Elle est répartie dans les différents tissus, mais avec une plus grande activité dans les hépatocytes suivie par les érythrocytes, puis les cellules pulmonaires (Ratnam et al. , 2006; Milane, 2004; Borg et Reeber, 2008) et elle est localisée principalement dans les peroxysomes et les mitochondries (Deaton & Marlin, 2003), mais elle se trouve aussi dans le cytoplasme pour les érythrocytes (Pelmont,1995).

➤ La Glutathion peroxydase (GPx)

Les GPx constituent une famille d'enzymes sélénium (Se)-dépendantes à caractère antioxydant (Milane, 2004), qui sont l'un des principaux systèmes de protection capables de réduire le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes organiques (ROOH) toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol (Ganther, 1999 ; Favier, 2003), En utilisant du glutathion réduit comme co-substrats (Servais, 2004) selon le mécanisme réactionnel résumé dans la **figure 4**.

Lors de ce mécanisme réactionnel le glutathion réduit (GSH) est oxydés en glutathion disulfure oxydé (GSSG) (Ahmad,1995). La régénération du GSH est catalysée par la glutathion réductase (GR) (Serdar et al., 2006) qui agit par oxydation du NADPH, H^+ fourni par la voie des pentoses phosphates (Jacques et André., 2004).

La famille des GPX formée d'un très grand nombre d'isoenzymes contiennent un seul résidu séléno-cystéine (Se-Cys) situés aux centres actifs de l'enzyme dans chacune de ces

quatre sous-unités identiques, ce qui est essentiel pour l'activité enzymatique (Matés et al., 1999). Elles se trouvent dans le cytosol, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau (Favier, 2003 ; Servais, 2004).

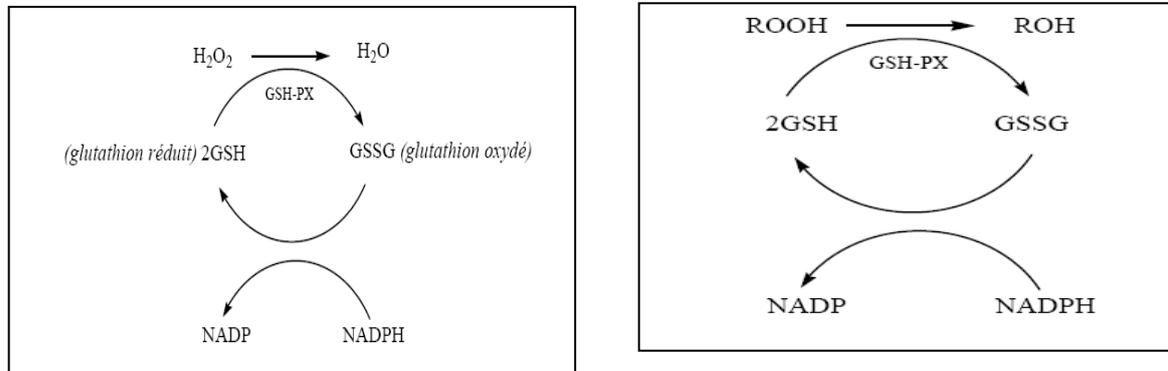


Figure 4: Schéma de la réduction d'hydroperoxydes inorganiques (H_2O_2), ou organiques ($ROOH$) par le GP_x (Mates et al., 1999; Servais, 2004)

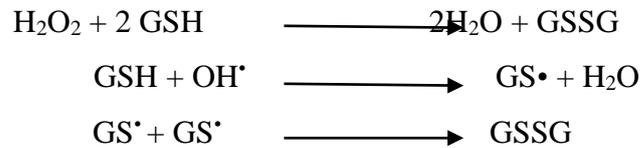
II.7.1.2. Les antioxydants endogènes non enzymatiques

Les systèmes antioxydants endogènes non enzymatiques comprennent plusieurs substances protéiques et non protéiques capable de piéger et de détruire les ERO, parmi les quelles on peut citer: la transferrine, l'apotransferrine, la ceruloplasmine, l'albumine, la thiorédoxine, le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles femelles, la mélanine, la mélatonine et le coenzyme Q (Durackova, 2008; Favier, 2003) , De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, les plus importants sont les thiols, composés contenant le groupement sulfhydrile (SH) , jouent un rôle important dans la protection des systèmes biologiques contre les agressions oxydantes comme le glutathion réduit (Favier, 2003).

➤ Le glutathion (GSH)

Le glutathion (GSH) est le thiol majeur le plus abondamment, c'est un tripeptide (L γ -Glutamyl-LCystéinylglycine) présent à des concentrations millimolaires dans le milieu intracellulaire (0.5-10mM) tandis que sa concentration plasmatique est de l'ordre de 0.5 à 10 μ M (Jannuel, 2003; Peter et al., 2002). Avec son groupement actif sulfhydrile (-SH) de la cystéine, il est le principal antioxydant soluble dans la cellule (Couto et al., 2013), il joue son rôle d'antioxydant par deux mécanismes ; il peut piéger les radicaux libres, en particulier le

peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle avec la formation d'une molécule de glutathion dissulfure oxydée (GSSG) (Favier, 2003; Gardès-Albert et al., 2003) :



La régénération de la fonction thiol SH à partir de GSSG semble se faire, *in vivo*, à l'aide de glutathion réductase avec l'utilisation de NADPH+H⁺ (Deaton et Marlin, 2003). Le GSH est aussi capable de participer comme co-substrat à l'activité des enzymes antioxydantes telles que la GPX, GR et GST (**Figure 5**) (Ravi et al., 2004; Couto et al., 2013) .

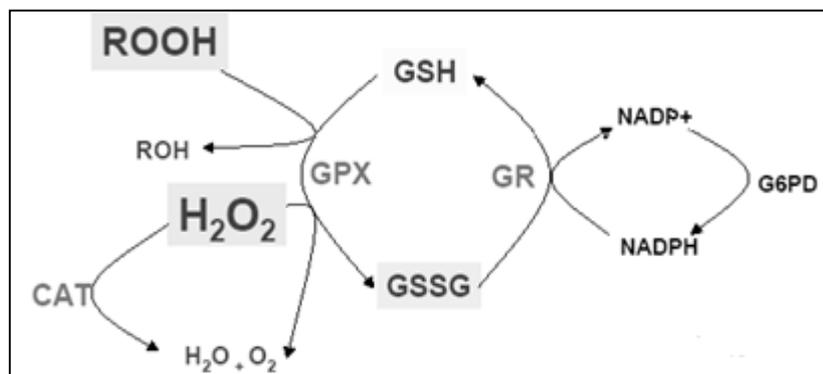


Figure 5 : Le système redox du glutathion

Outre les rôles principaux de protection contre le stress oxydant, le GSH participe dans le réserve et le transport de cystéine à travers la membrane plasmique; il peut agir comme cofacteur de l'enzyme –GST- de détoxification des xénobiotiques par une réaction de conjugaison, et régénère les vitamines (C et E) à leurs formes actives (Rahman, 2007).

II.7.2. Les systèmes antioxydants exogènes

Plusieurs substances exogènes ont la propriété de piéger et de détruire les ERO. Il s'agit de molécules d'origine alimentaire, comme la vitamine E (Fusco, 2007; Deaton & Marlin, 2003 ; Gardès-Albert et al., 2003) et la vitamine C (Delattre et al., 2005) .

, les composés naturels tels que les caroténoïdes (Rao & Rao, 2007) et les flavonoïdes présents dans certains fruits et légumes et les oligoéléments d'origine alimentaire qui sont essentiels pour leur rôle de co-facteur d'un certain nombre d'enzymes antioxydants (Burk, 2002).

III. La cardiotoxicité de la doxorubicine

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde est forme donc un enjeu de santé publique fort (Genoux, 2006). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, plus de 8,2 millions de gens meurent du cancer chaque année et il est d'ailleurs estimé que ce nombre devrait augmenter de 50 %, d'ici 2020 et que 11, 4 millions en mourront en 2030 (OMS, 2013; L'espérance, 2008).

Le cancer peut se définir comme une maladie grave qui se traduit par l'émergence d'amas de cellules cancéreuses (appelés tumeurs) (Genoux, 2006), qui est le résultat d'une prolifération excessive et anarchique de certaines cellules deviennent immortelles et incontrôlables car elles échappent aux lois qui régissent la prolifération cellulaire (Alberts, 2002; Mussett, 2002).

L'anomalie responsable de la transformation cancéreuse, a comme origine en une altération majeure de l'information génétique, c'est-à-dire une mutation de l'ADN (Mussett, 2002).

Ces modifications portent sur des gènes critiques dans la formation d'un cancer, soit les gènes codant pour des protéines intervenant dans le contrôle du cycle et de la prolifération cellulaire (oncogènes), les gènes suppresseurs de tumeur, impliqués dans la réparation de l'ADN (Griffiths, 2002). ou les gènes intervenant dans la restauration des télomères (par exemple la télomérase). Les trois événements mutagènes-clés pour développer un cancer sont la surexpression d'un proto-oncogène, l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs (Griffiths & Suzuki, 2002) et l'activation des gènes codant la télomérase (**Figure 6**).

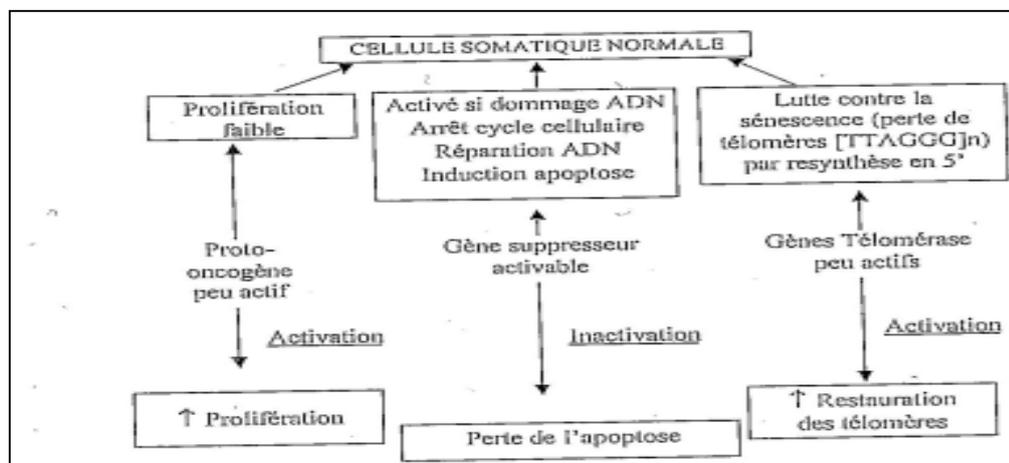


Figure 6: Les gènes clés de la cancérogenèse chimique

Le choix d'une avenue de traitement afin d'enrayer cette pathologie meurtrière par un oncologue repose obligatoirement sur le diagnostic posé suite à un examen histologique de la tumeur prélevée par biopsie. Suite à cet examen préliminaire, les traitements peuvent être envisagés selon la localisation, la nature, la taille et plusieurs autres caractéristiques de la tumeur (Lauzon, 2008).

Les principaux traitements proposés sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Souvent, un protocole de traitement va combiner plusieurs de ces méthodes afin de maximiser les chances d'éliminer ou de diminuer la masse tumorale (Gascon, 2015). Cependant la chimiothérapie anticancéreuse occupe une place considérable dans le traitement des cancers, notamment pour ceux qui ne peuvent pas être traités par chirurgie ou radiothérapie, comme les lymphomes, leucémies et tumeurs métastatiques (Genoux, 2006). Malheureusement, la plupart des agents cytotoxique anticancéreuse ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses, mais dans certains cas, le traitement peut aussi affecter les cellules saines. C'est de cette non-spécificité que déroule leur toxicité. Par exemple, la cardiotoxicité est un des désavantages majeurs de l'utilisation de la doxorubicine comme agent anticancéreux. En effet, ce médicament anticancéreux, administré à des doses totales cumulées de 550 mg/m^2 entraînerait des problèmes cardiaques chez plus de 7 % des patients traités (Hande, 1998; Iarussi et al., 2001; Kim et al., 2003).

Le mécanisme impliqué reste irrésolu, mais certains groupes de recherches ont rapporté que les radicaux libres produits par ce médicaments seraient majoritairement responsables de la cardiotoxicité (Hande 1998, Laikangbam et al., 2015).

III.1. Propriétés générale de la doxorubicine

III.1.1. Définition et origine

La doxorubicine (ou adriamycine) est un médicament antibiotique anticancéreux de la famille des anthracyclines. Ce médicament a été découvert en 1960 par une équipe italienne des laboratoires "Farmitalia Research " à partir des actinobactéries mutantes de genre *Streptomyces Peucetius var. caesieus* et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974 (Di Marco et al., 1963; Hande, 1998; Kuf, 2003; Minotti et al., 2004) Leur suffixe *rubicine* rappelle leur couleur rouge intense bien visible dans les flacons de poudre pour solution injectable (Kuf, 2003; Minotti, 2004).

À ce jour, la doxorubicine est la molécule de référence la plus utilisée en chimiothérapie malgré sa cardiotoxicité élevée. Elle possède un large spectre anticancéreux y compris les leucémies, les lymphomes (maladie de Hodgkin) et les tumeurs solides (cancer du sein et de l'ovaire, sarcomes osseux et tissulaires et neuroblastomes) (Mizutani et al., 2005; Tacar, 2013).

III.1.2. Structure chimique de la doxorubicine

Le nom chimique de la DOX est 3-glycoloyl-1,2, 3, 4, 6,11-hexahydro-3, 5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxonaphtacen-1-yl-3-amino-2, 3,6-trideoxy-a-L-lyxopyranoside Hydrochloride qui correspond à la formule chimique brute $C_{27}H_{29}NO_{11}H^+ Cl^-$ et sa masse molaire est de 580 (Abidli, 2004; Takemura & Fujiwara, 2007).

La DOX possède la même structure chimique de la famille des anthracyclines (**Figure 7**), elle est composée de quatre noyaux chromophores aromatiques (tétracycline) correspondant à la portion aglycone (anthraquinone) hydrophobe faible quasi plan portant des fonctions quinones et hydroquinones adjacents, qui leur permet de fonctionner comme accepteur et donneur d'électrons, reliés par une liaison glycosidique avec un aminosucre, la daunosamine (Hortobàgyi, 1997; Minotti, 2004).

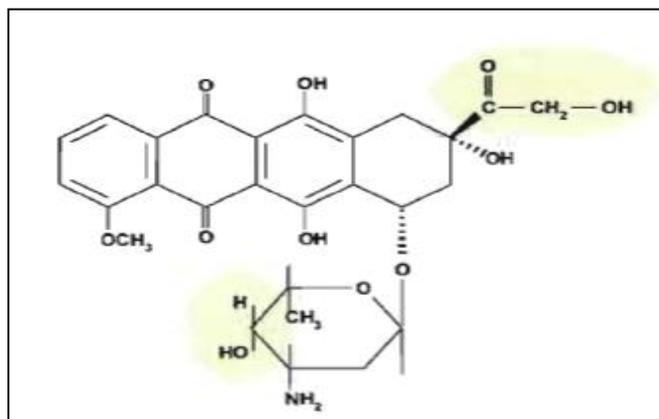


Figure 7 : Structure moléculaire de la doxorubicine (Hande, 1998; Tsuruo et al., 2003).

II.2. Pharmacocinétique de la doxorubicine

Les études pharmacocinétiques montrent que la DOX a un profil multiphasique :

III.2.1. L'absorption

La doxorubicine comme toutes les autres anthracyclines, est habituellement administrée par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée, et en injection rapide, pour éviter une extravasation à côté de la veine qui endommagerait les tissus (Hande, 1998). Leur schéma d'administration est modulé par la dose, selon leur toxicité cardiaque potentielle, et la modalité d'injection en *bolus* ou en perfusion (Robert & Gianni, 1993).

III.2.2. La distribution

La DOX subit une étape sanguine de transport, au cours de laquelle il est véhiculé vers les différents tissus, puis elle est rapidement captée par différents organes de l'organisme (cœur, reins, poumons, foie et rate) à part le système nerveux central car elle ne traverse pas la barrière hématoencéphalique (Marcot, 1997). Dans la circulation générale, elle est liée à 75 % aux protéines plasmatiques, surtout l'albumine pour former des complexes. La phase de distribution est rapide, elle se traduit par des temps de demi-vies plasmatiques brèves respectivement de l'ordre de 5 à 30 min (Campos, 2012).

III.2.3. Le métabolisme

La DOX est essentiellement biotransformée au niveau du foie par différentes voies de métabolisme (**Figure 8**) parmi lesquelles:

- La conversion de la DOX, en doxorubicinol (13-dihydrodoxorubicine), son métabolite actif principal par réduction de la fonction carbonyle en fonction hydroxyle par l'enzyme la carbonyle réductase, une C13-aldocétoréductase NADPH dépendante (Mross, 1990 ; Zhou, 2002; Gambliel, 2002)
- La conversion de la DOX en hydroxy aglycone ou deoxy aglycone par l'élimination de la partie glycosidique par cytochrome P450 réductase NADPH dépendante (Zhou 2002; AFECT, 2004).

- les réactions de conjugaisons par l'union de la DOX ou de leur métabolite avec l'acide glucuronique ou le groupement sulfate (Zhou, 2002; Maluf, 2002).

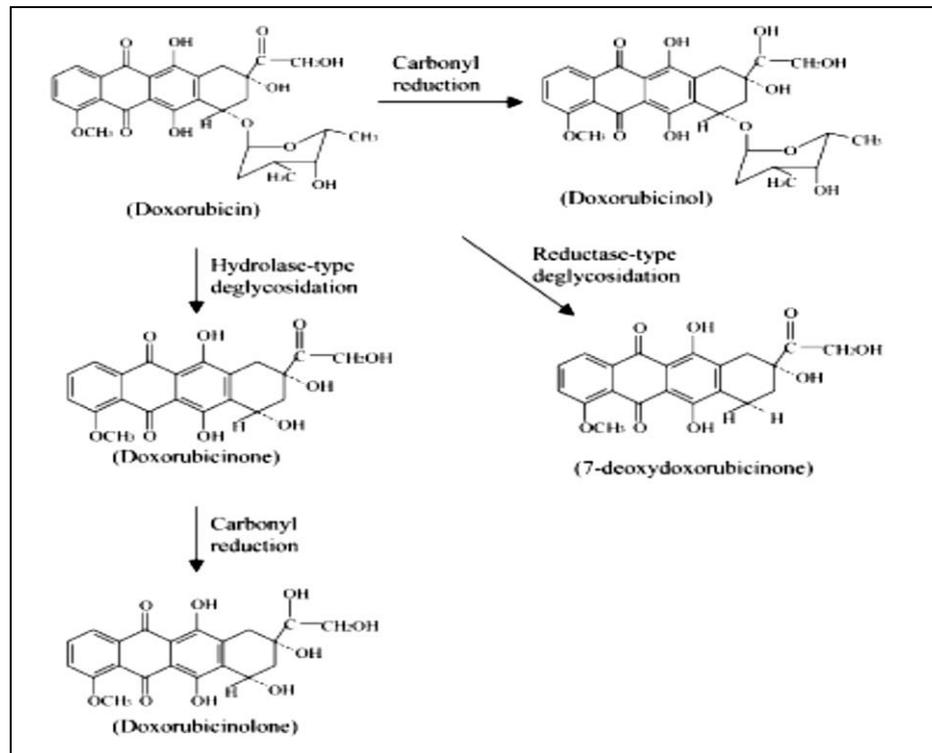


Figure 8: Biotransformation de la doxorubicine (Zhou, 2002).

III.2. 4. L'élimination

La DOX et ses métabolites seraient rapidement éliminés du plasma majoritairement dans la bile à raison de 40 – 50 % sous forme inchangée et de 23% sous forme de doxorubicinol. Alors que cette élimination est faiblement dans les urines (5 à 15 %) et sous forme inchangée ce qui expliquerait la coloration rouge de l'urine, soit la couleur de ce médicament, quelques jours après le traitement (Marcot, 1997; Tannock & Hill, 1998) le temps d'élimination est de 30 h (Robert & Gianni, 1993).

III.3. Pharmacodynamique de la doxorubicine (mécanisme d'action antitumorale)

La compréhension de l'action de la DOX comme toutes les autres anthracyclines a considérablement progressé avec le développement de la biologie et de la pharmacologie cellulaire (Nathalie, 2014) L'hydrophobicité de la doxorubicine associée à sa nature de base

faible non chargée lui permet de diffuser passivement à travers la membrane plasmique par un mouvement de flip-flop du feuillet externe au feuillet interne (**Figure 9**). Au niveau cellulaire, près de 99.8% de l'accumulation de la DOX se ferait au niveau du noyau chez des cellules sensibles à cause de sa très grande affinité avec l'ADN (Cutts & Phillips, 1995).

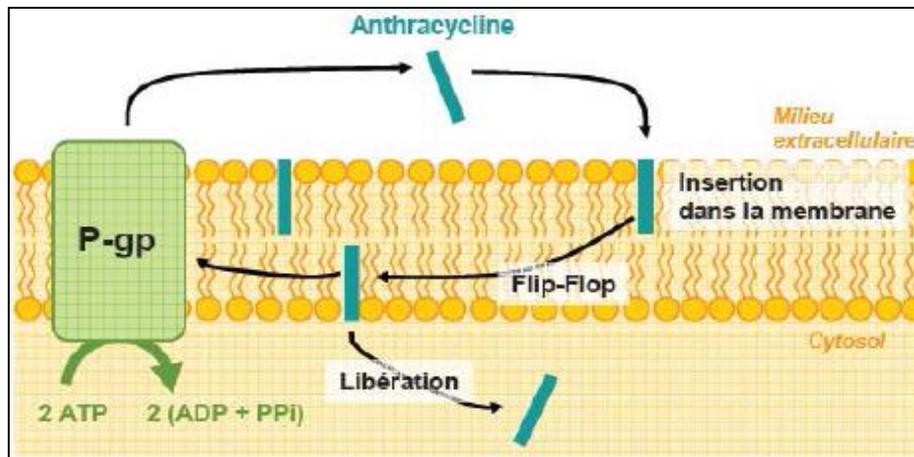


Figure 9 : Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline par flip-flop

Plusieurs mécanismes d'action ont été impliqués dans l'activité anticancéreuse de la DOX :

III.3.1. Intercalation dans la molécule d'ADN

La DOX comme les autres anthracyclines s'intercale entre les deux brins de l'ADN d'où le nom d'intercalant donné à ce groupe de substances. La présence d'un anneau planaire dans leur structure multicyclique leur permet de former des ponts (crosslink) en s'interposant entre deux paires de bases adjacentes principalement sur les résidus guanine (Cutts & Phillips, 1995; Hande, 1998; Iarussi et al., 2001; Wallace, 2003; Szulawska & Czyz 2006). et d'y contracter des liaisons hydrophobes qui impliquent la structure anthraquinone de la DOX, par l'intermédiaire des cycles aromatiques B, C et D, et les paires de bases de l'ADN (Booser & Hortorbagy, 1994) et des interactions électrostatiques qui impliquent d'une part, le groupe amine chargé positivement en C3' de la daunosamine, et d'autre part le groupe phosphate chargé négativement de l'ADN (Priebe & Perez, 1993; Szulawska & Czyz, 2006), ce qui permet de stabiliser la drogue intercalée et former un complexe [ADN-DOX]. En s'intercalant dans l'ADN, la DOX modifie la structure de l'ADN et empêche ainsi la fixation de différents enzymes comme l'ADN et l'ARN polymérase et les enzymes de réparation de l'ADN (Cutts

& Phillips, 1995; Hande, 1998; Iarussi et al., 2001), ce qui inhibe la réplication, la transcription et donc la synthèse protéique nécessaires à la survie de la cellule (Wallace, 2003; Szulawska & Czyz, 2006).

III.3.2. Inhibition de la topoisomérase II

La topoisomérase de classe II est un enzyme nucléaire chargée de réguler les conversions topologiques de l'ADN pour permettre le bon fonctionnement nucléaire lors de la transcription, la réplication, la suppression des recombinaisons, la ségrégation et la condensation des chromosomes pendant la mitose et probablement la méiose (Isaacs et al., 1995; Potter & Rabinovitch, 2005; Rao, 2013). La topoisomérase crée un complexe avec l'ADN « le complexe de clivage » et induit des coupures transitoires doubles brins pour relaxer sa structure afin d'assurer ces activités cellulaires (Chen et al., 2013; Dal Ben et al., 2007; Rao, 2013) et ensuite relier les extrémités libres des brins coupés pour la restitution de la structure tridimensionnelle de l'ADN (Minotti, 2004)

L'intercalation de la DOXO à l'ADN stabilise le complexe de clivage lorsque les coupures sur les chaînes sont induites, et empêche la topoisomérase II de réassembler les extrémités libres des segments coupés de l'ADN (Dal Ben et al., 2007; Chen et al., 2013). Ce qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire, puis des aberrations chromosomiques, des échanges entre chromatides sœurs et la mort de la cellule tumorale par apoptose (Corinne, 2001; Koivusalo et al., 2005; Potter & Rabinovitch, 2005).

III.3.3. Production des radicaux libres

L'oxydation de la structure quinone de la doxorubicine par différentes enzymes entraînerait la formation de radicaux libres tels que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyl (Singal et al., 1997; Corinne, 2001; Yang et al., 2014). De plus, la conjugaison de la partie hydroquinone de la doxorubicine avec le fer ferrique intracellulaire peut conduire à la production non-enzymatique de radicaux libres (Minotti, 2004). Ces radicaux libres produits endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes de la cellule tumorale (Iarussi et al., 2001; Yang et al., 2014), qui ne peut pas effectuer la réparation et va entrer en apoptose (Yang et al., 2014). En effet, l'action proapoptotique de la DOX par les radicaux libres est basée sur l'activation de l'expression de la protéine p53 qui se fixe sur l'ADN, y active la transcription du gène Bax (médiateur proapoptotique), qui induit la libération du cytochrome c par ouverture des pores mitochondrial

et inhibe celle du gène Bcl-xL (médiateur anti-apoptotique). La libération du cytochrome C entraîne la formation de l'apoptosome, complexe effecteur comprenant l'apoptosis activating factor-1 (Apaf-1), le cytochrome c et la pro-caspase-9 (Minotti, 2004).

Cependant, des études ont démontré que les dommages induits par les radicaux libres au niveau des cellules tumorales sont observables seulement à des concentrations supra-cliniques de la DOX (Fornari et al., 1994; Volkova & Russell, 2011). De plus, l'usage de molécules antioxydantes en même temps que l'administration de DOX n'empêche pas son activité antinéoplasique (Takemura & Fujiwara, 2007).

Néanmoins ces radicaux libres sont responsables de la cardiotoxicité aiguë de la doxorubicine, mais les mécanismes induisant la cardiotoxicité restent encore souvent dissociés de l'effet antitumoral de ce médicament (Gewirtz, 1999).

III.4. Mécanisme de cardiotoxicité de la doxorubicine

La DOX, comme toute autre anthracycline, représente un pilier de la chimiothérapie; mais, leur toxicité cardiaque est le facteur limitant dans leur prescription (Wojtacki, 2000; Monsuez, 2010). En effet, le développement des problèmes cardiaques de la DOX peut apparaître sous deux formes cliniques bien différentes dans leurs manifestations et leurs conséquences; soit une cardiotoxicité aiguë ou chronique (Singal et al., 1987; Singal et al., 2000; Wojtacki, 2000; Hershman & Shao, 2009). La première forme survient immédiatement au cours de l'administration de la doxorubicine mais plus fréquemment dans les heures qui suivent la perfusion, principalement représentée par des troubles du rythme cardiaque (Geisberg & Sawyer, 2010; Colombo et al., 2013).

La cardiotoxicité chronique apparaît le plus souvent plusieurs semaines ou plusieurs mois (un à trois mois) après la dernière cure de chimiothérapie, délai pouvant aller, selon certains auteurs, jusqu'à deux ans. Les manifestations cliniques se traduisent principalement par une insuffisance cardiaque sévère et irréversible à prédominance du ventricule gauche, causant une incapacité de fournir suffisamment de sang à l'ensemble du corps (Wojtacki 2000; Geisberg & Sawyer, 2010 ; Colombo et al., 2013).

La DOX possède différents mécanismes antinéoplasiques et il est admis que le mécanisme principal est lié à son interaction avec l'ADN, en particulier avec la topoisomérase II nucléaire (Minotti, 2004) mais ceux-ci ne semblent pas impliqués dans l'induction des dommages cardiaques car cette enzyme est très peu exprimée dans les cardiocyte (Andrieu-Abadie, 1999) en fait l'activité antitumorale et la cardiotoxicité

correspondaient à des cibles intracellulaires différentes. Les mécanismes par lesquels la doxorubicine induit une cardiotoxicité ne sont pas complètement élucidés, plusieurs hypothèses ont été énoncées: le stress oxydatif, la dérégulation de l'homéostasie calcique, l'inhibition de la cardiolipine et la production de métabolites (Gascon, 2015). Mais il apparaît que l'induction d'un stress oxydant au sein du tissu myocardique constitue le dénominateur commun de ces mécanismes (Delemasure, 2006). Les principaux mécanismes retrouvés sont représentés par:

III.4.1. Production de radicaux libres

L'hypothèse du développement d'un stress oxydatif induit par le traitement à la doxorubicine a été largement documentée (Daloz, 1999), Ce mécanisme est présent dans les cellules tumorales, mais semble jouer un rôle plus important dans l'induction de la cardiotoxicité. (Delemasure et al., 2006).

Le cœur est particulièrement sensible aux radicaux libres engendré par la doxorubicine en comparaison avec d'autres organes comme le foie et les reins, Ceci est expliqué par ;

- Le déficit des systèmes de défenses antioxydantes au niveau du cœur qui traduit par un taux relativement bas de SOD et de CAT et un faible taux de renouvellement du glutathion (Cummings, 1991; Delemasure, 2006).
- L'augmentation de système redox dans les cardiomyocytes (Quiles, 2002).
- Le taux élevé des enzymes réductases et dehydrogenase au niveau du cœur (la NADH dehydrogénase et la NADPH cytochrome P-450 réductase) qui jouent un rôle important dans la production accrue d'ERO (Green, 2002; Chen, 2007).
- La grande affinité de la DOX au phospholipide polyinsaturé (la cardiolipine) qui se trouve particulièrement dans la membrane interne de la mitochondrie des cardiomyocytes ce qui provoque l'accumulation de la DOX dans les tissus de cœur (Jain, 2000; Quiles, 2002; Tokarska-Schlattner, 2006; Chen, 2007; Vander Heide, 2007)

Le métabolisme de la DOX entraîne la production des radicaux libres par la voie enzymatique ou la voie dépendante des ions ferriques.

III.4.1.1. La voie enzymatique

La DOX est capable d'induire une production accrue de radicaux libres oxygénés principalement au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Xu et al., 2005)

La forme initiale de type quinone de la doxorubicine favorise sa réduction en une forme semi-quinone radicalaire par les flavines réductases telles que la xanthine oxydase, la NADH déhydrogénase et la NADPH cytochrome P-450 réductase (Tokarska-Schlattner, 2006; Oleson, 1990). Ce dérivé peut lui-même subir une réduction en hydroquinone, ou reformer la molécule initiale par oxydation en présence d'oxygène moléculaire, produisant ainsi des superoxydes (O_2^-) (Minotti, 1999; Delemasure et al., 2006; Tokarska-Schlattner, 2006) qui sera également oxydé par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). A ce stade, le H_2O_2 peut entraîner la formation de radicaux hydroxyls un des radicaux libres les plus réactifs et destructifs, mais peut aussi être éliminé par la catalase et la glutathion peroxydase (Li, 2000; Iarussi et al., 2001) (**Figure 10**). Toutefois, le cœur est un des organes qui en est le moins pourvu de catalases (Zucchi, 2003). En outre, certains travaux ont montré que la doxorubicine diminue l'expression des gènes qui produisent les enzymes antioxydantes notamment en SOD et en GPx (Hassan et al., 2014)

De plus, sous l'effet de stimuli inflammatoires induit par la DOX, une grande quantité de monoxyde d'azote (NO) est produite à partir de la L arginine par l'enzyme NO synthase sous sa forme inductible (iNOS) présente au niveau des macrophages et des cellules vasculaires (Vasquez-Vivar, 1997). L' $O_2^{\cdot-}$ et le NO^{\cdot} sont modérément toxiques individuellement, mais lorsqu'ils sont produits de façon concomitante et en grandes quantités, ils se combinent immédiatement pour former un oxydant puissant, le peroxydant (ONOO⁻). (Beckman, 1990). La production de radicaux libres par la doxorubicine, au sein des cellules myocardiques, endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires (Iarussi et al., 2001) et ayant pour conséquence une évolution de la cellule vers l'apoptose (Hsiu-Chuan, 1996).

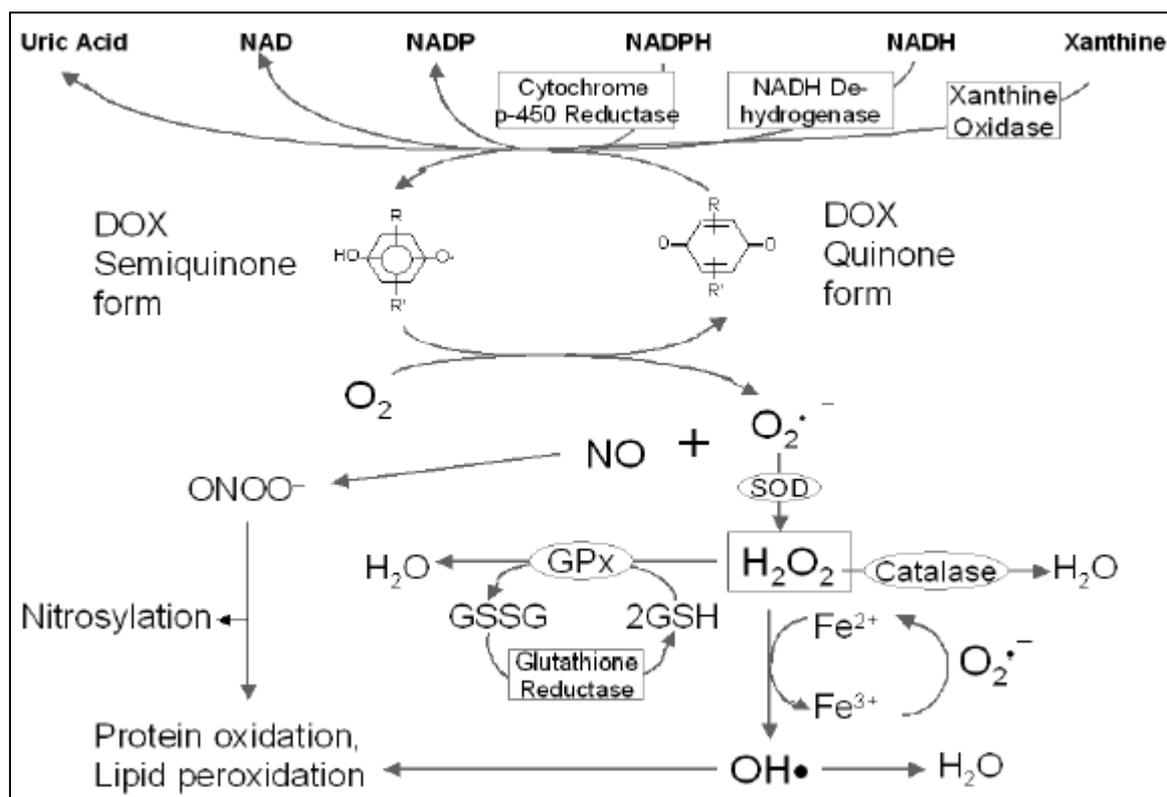


Figure 10: Schéma des différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la doxorubicine (Liu, 2003)

III.4.1.2. La voie dépendante des ions ferriques

Cette voie de génération de radicaux libres fait intervenir la formation d'un complexe organométallique entre la DOX et le fer (Xu, 2005). La DOX attaque les protéines responsables de l'entreposage et de la relâche des ions ferriques (Fe^{3+}), transferrine et ferritine provoquant ainsi la libération de ces ions de ses sites de stockage (Xu, 2005; Chen, 2007; Gammella et al., 2014;). Le Fe^{3+} se lie alors à trois molécules de la doxorubicine avec la fonction cétone et hydroxyle de carbone C11 et C12 pour former un complexe très stable: $Fe^{3+}-(DOX)^3$. Ce complexe subit un cycle interne d'oxydoréduction, donnant naissance à un complexe $Fe^{2+}-(DOX)^3$. Ce dernier peut céder son électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire et aboutir ainsi à la formation de $O_2^{\cdot-}$ et par la suite la formation des autres radicaux libres (Quiles, 2002; Liu, 2002; Barnabé, 2002; Liu, 2003; Xu et al., 2005; Tokarska-Schlattner, 2006; Outomuro, 2007).

III.4.2. Perturbation de l'homéostasie calcique

La DOX est responsable d'un dérèglement de l'homéostasie calcique des cellules par l'activation puis l'ouverture des canaux calciques et la libération de calcium du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme (Octavia et al., 2012). L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracytoplasmique permet l'activation d'enzymes lytiques protéases et lipases calcium dépendantes (Petit, 2004; Outomuro, 2007) ainsi que le changement de potentiel de la membrane de la mitochondrie, ce qui permet de relâcher le cytochrome C, qui une fois présent dans le cytosol, devient un des nombreux facteurs important pour induire une voie de signalisation conduisant à l'apoptose des cellules (Mazevet et al., 2013).

III.4.3. Modification de l'expression de certains gènes dans les cardiomyocytes

Il est aussi constaté une inhibition par la DOX de l'expression des gènes codant des protéines qui participent à la contraction du myocarde (Zucchi & Danesi, 2003) comme l'actine, troponine I, protéine de la chaîne légère de la myosine et l'enzyme créatine kinase (Jain, 2000; Zucchi & Danesi, 2003; Petit, 2004).

III.4.4. Induction de la mort cellulaire programmée

De nombreuses expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont montré que la DOX pouvait conduire à une perte de cellules cardiaques par apoptose et provoque le développement de l'insuffisance cardiaque (Arola, 2000) qui provient de l'action pro-apoptotique initiée par les ERO qui activent la protéine p53. En effet, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ entraîne l'activation de p53 qui à son tour permet l'induction de la cascade pro-apoptotique (Collins, 2006).

Dans une autre expérimentation, il a été prouvé que chez des rats traités par une dose cumulative de 20 mg /kg, que l'apoptose induite était associée à une activation de la caspase 3 et à une augmentation du ratio Bcl2/Bax (Childs, 2002).

III.4.5. La production de métabolites toxiques

La doxorubicine est principalement métabolisée dans le cytosol des cardiomyocytes par une enzyme NADPH-dépendante -la carbonyle réductase- pour former la doxorubicinole qui est moins actif sur le plan tumoral mais plus toxique que la molécule parentale, la doxorubicine (Olson, 1998). La doxorubicinole ainsi formée semble jouer un rôle plus

important que la DOX dans l'homéostasie des ions fer, en dérégulant la disponibilité des ions ferriques et en produisant ainsi un stress oxydatif (Zucchi & Danesi, 2003).

III.4.6. Liaison avec les phospholipides

La DOX possède une affinité pour les phospholipides polyinsaturés et plus particulièrement pour la cardiolipine. La présence de ce phospholipide qui représente 18 % de la constitution de la membrane interne de la mitochondrie des cardiomyocytes est essentielle pour le bon fonctionnement de cette organelle, car elle interagit avec plusieurs protéines pour une activité optimale, principalement au niveau de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative (Paradies et al., 2014). La DOX en s'associant avec la cardiolipine, interfère avec sa capacité d'interagir avec les autres protéines et modifie ainsi le fonctionnement de la mitochondrie des cardiomyocytes à produire l'énergie (Jung & Reszka, 2001).

III.5. Les signes d'évaluation des lésions cardiaques induites par la doxorubicine

La pathogénie de la toxicité cardiaque induite par la doxorubicine se traduit par l'augmentation des marqueurs biologiques indicateurs de lésion cardiaques ainsi que par des anomalies anatomopathologiques dans le tissu du cœur.

III.5.1. Les marqueurs biologiques de la cardiotoxicité de la doxorubicine

Certaines enzymes sont libérées dans la circulation sanguine suite aux lésions causées aux cellules et la mesure de leur activité dans le plasma peut être d'un grand intérêt diagnostique dans différentes situations pathologiques (Kamoun, 2003). Lors des lésions cardiaques il existe de nombreux marqueurs biologiques, l'histoire de ces marqueurs de l'atteinte cardiaque débute dès 1954 avec la détermination de l'activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT ou TGO) dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde (HSA, 2010). Cette enzyme est présente dans le cœur, le foie, les muscles squelettiques, les reins, les poumons, le pancréas et les érythrocytes où elle catalyse la réaction suivante (Pelmont, 1995).



Son activité est mesurée en biologie clinique lors de certaines maladies et leur activité la plus élevée se trouve au niveau du cœur d'où d'inclure cette enzyme dans le bilan cardiaque (Pelmont, 1995).

L'utilisation de l'ASAT comme marqueur biologiques indicateur de lésions cardiaque est suivie rapidement par celle du lactate déshydrogénase (LDH) (HSA, 2010) qui est une enzyme cytoplasmique catalyse la transformation du pyruvate en lactate ou la réaction inverse, en présence de NAD^+/NADH (Pelmont, 1995). Elle est retrouvée dans différents organes (reins, cœur, muscles, pancréas, rate, foie...). Le dosage de ce marqueur est retrouvé aussi en hématologie, en oncologie et lors de pathologies diverses. Les deux enzymes ASAT et alanine aminotransférase (ALAT) sont deux marqueurs qui ont été beaucoup utilisés jusqu'à l'introduction de la créatine phosphokinase (CPK ou CK) dans les années 60 (HSA, 2010). Suite aux lésions causées aux cellules cardiaques par la DOX. Cette enzyme intracellulaire catalyse la phosphorylation réversible de la créatine en créatine phosphate par le complexe $\text{Mg}^{2+}\text{-ATP}$ (Pelmont, 1995). Elle se trouve en majorité dans les muscles squelettiques lisses et cardiaques, d'où son dosage lors des atteintes musculaires ou en cardiologie (HSA, 2010) (Pelmont, 1995) Enfin, des marqueurs de sensibilité analytique très élevée, les troponines, furent développés au début des années 90. Très récemment, de nouveaux marqueurs sont aussi un signe précoce d'agression myocardique, qui sont les peptides natriurétiques l'atrial natriuretic peptide (ANP) et le brain natriuretic peptide (BNP) (Hamm, 1994; HSA, 2010).

III.5. 2. Les anomalies histologiques cardiaques induites par la doxorubicine

L'évaluation histologique de la toxicité cardiaque de la DOX a été rendue possible grâce au développement des techniques de biopsie endomyocardique (BEM) du ventricule droit (Billingham, 1978; Mason, 1978). L'administration de la DOX entraîne des lésions au niveau des cardiomyocytes et du tissu interstitiel cardiaque. Macroscopiquement, le cœur endommagé par le DOX est flasque et ses ventricules sont souvent dilatés avec remaniements importants de la matrice extracellulaire: raréfaction, voir disparition du réseau fibreux périmyocyttaire, remplacé par des plaques de tissu fibreux cicatriciel dense. Microscopiquement, l'examen montre des anomalies quantitatives et qualitatives dans les cardiomyocytes (Billingham, 1978); qui apparaissent petits, rétractés avec un cytoplasme présentant une accumulation lipidique, des lysosomes nombreux, une perte myofibrillaire et un aspect vacuolaire par dilatation du réticulum sarcoplasmique puis une raréfaction de leur citernes terminales et parfois sa disparition complète, ensuite un œdème mitochondriale qui

sont alors surchargées en dépôts calciques avec épaissement de ces membranes, une dégénérescence nucléaire suivis de perte de myofibrilles puis installation d'une fibrose, conduisant à la mort cellulaire (Mason,1978; Lefrak, 2006).

III. 6. Stratégie de prévention contre la cardiotoxicité de la doxorubicine

Le problème du développement d'effets cardiotoxiques, suite à l'administration de la DOX, nécessite l'exploration de plusieurs stratégies de prévention (Gascon, 2015) qui ont été marquées par l'établissement des protocoles de surveillance cardiologique; mieux formalisés des patients traités (la biopsie du ventricule droit, l'échographie cardiaque ECG, la mesure de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG) et le dosage sérique des protéines cardiaques) (Mason, 1978; Schwartz, 1987; Hamm, 1994; Delemasure, 2006) néanmoins a cause des inconvénients de chacune de ces méthodes plusieurs d'autre procédés ont été pratiqué comme la modifications des modalités thérapeutiques (Delemasure, 2006) soit par modification du schéma d'administration (infusion sur 48-96 heures ou administration de faibles doses chaque semaine) (Bielack, 1989) la limitation de la dose cumulée totale ou par le développement d'analogues de la DOX moins cardiotoxique tel est le cas de l'épirubicine, l'idarubicine et les préparations liposomales (Delemasure, 2006).

Étant donné que l'une des principales causes de dommages cardiaques serait la libération de radicaux libres, les premières approches considérées pour contrer les effets nocifs des anthracyclines ont fait appel au recours plus large aux thérapeutiques associées par l'utilisation des substances antioxydantes agissant sur le stress oxydant et qui font actuellement l'objet de grandes recherches (Oliveira et al., 2004; Delemasure, 2006) Les études effectuées sur certains antioxydants, par exemple la vitamine E ou la coenzyme Q, ont démontré des résultats très intéressants *in vitro*. Cependant, les conclusions des études *in vivo* démontrent une activité cardioprotectrice limitée en présence de tous les processus biologiques du corps (Oliveira et al., 2004).

D'autre part il existe de nouvelles substances qui auraient un meilleur potentiel cardioprotecteur, et ce, sans diminuer l'activité antitumorale de la DOX sur les cellules cancéreuses, comme le dexrazoxane capable de chélater le fer intracellulaire libre et ainsi de diminuer la formation du complexe $Fe^{3+}-(DOX)_3$ et par conséquent de réduire la production de radicaux libres (Swain, 1997; Hasinoff & Herman, 2007), Cependant, des études ont démontré que l'utilisation du dexrazoxane lors de chimiothérapie, chez les jeunes enfants, augmente le risque de développer des cancers secondaires et des infections graves (Magnano

et al., 2014). En conséquence, l'utilisation du dexrazoxane comme cardioprotecteur n'est approuvée que dans des cas particuliers (cancer du sein à un stade métastatique) (Hershman & Shao, 2009). Par ailleurs, d'autres solutions doivent être envisagées.

Le développement d'une cardiotoxicité suite à l'administration de la DOX est encore un problème important. En conséquence la mise en place de nouveau moyen devient nécessaire. Actuellement, les recherches biologiques se penchent vers l'étude du potentiel de certains extraits de plantes médicinales riches en composés phénoliques pour ses vertus antioxydantes et cardioprotectrices.

IV. Les flavonoïdes

IV. 1. Généralité et historique

Historiquement, Les flavonoïdes ont été isolés pour la première fois par le scientifique Chervreul en 1814, mais ont été réellement découverts qu'en 1938 par Albert Szent-Györgyui, qu'il appelle vitamine P (pour *Perméabilité*), en raison de leur efficacité à réduire la perméabilité vasculaire afin de guérir les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sanguins (Szent-Görgyi, 1938; Bruneton, 1993), cette notion de vitamine P a ensuite été abandonné puisque les flavonoïdes ne rencontraient aucune des caractéristiques associées à la définition d'une vitamine (Alan & Miller, 1996). Toutefois les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes vasculaires appartenant à la famille des polyphénols (Bruneton, 1999; Athamena, 2009). Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Peluso, 2006) et interviennent comme filtre auprès les rayons ultraviolets (Rajnerayanama et al., 2001) et assurant ainsi la protection des tissus contre les agressions des organismes pathogènes (Chebil et al., 2006). Ils sont Considérés comme des micronutriments importants dotés de nombreuses propriétés biologiques pour l'être humain (Milane, 2004 ; Besle et al., 2004).

IV. 2. Structure et classification

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes qui ont une origine biosynthétique commune, ce qui explique qu'ils partagent la même structure de base (Grotewold E, 2006), qui est constitué d'un squelette de phényl-2-benzopyrane que désigne le noyau FLAVONE à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), conformé de deux noyaux aromatiques en C6 (noyaux A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné de trois carbones qui dit cycle pyrone C (Erlund, 2004; Yao *et al.*,2004)) (**Figure 11**).

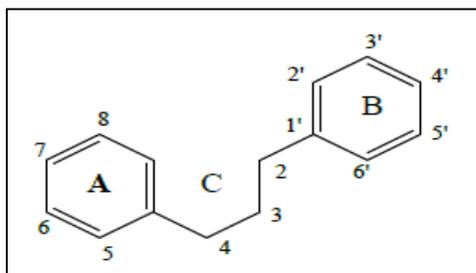


Figure 11: Enchaînement de base des flavonoïdes - noyau FLAVONE- (Erlund, 2004).

Les flavonoïdes se trouvent soit à l'état libre, dans ce cas ils sont nommés aglycones, soit sous forme de C- ou O-glycosides (hétérosides) (Milane, 2004) (**Figure 12**), et dans ce cas ils sont liés à des sucres tels que le glucose, le rhamnose, l'arabinose. La partie osidique peut être mono-, di- ou trisaccharidique (Gerhard, 1993; Dacosta, 2003).

Les flavonoïdes sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes (Moon, 2006).

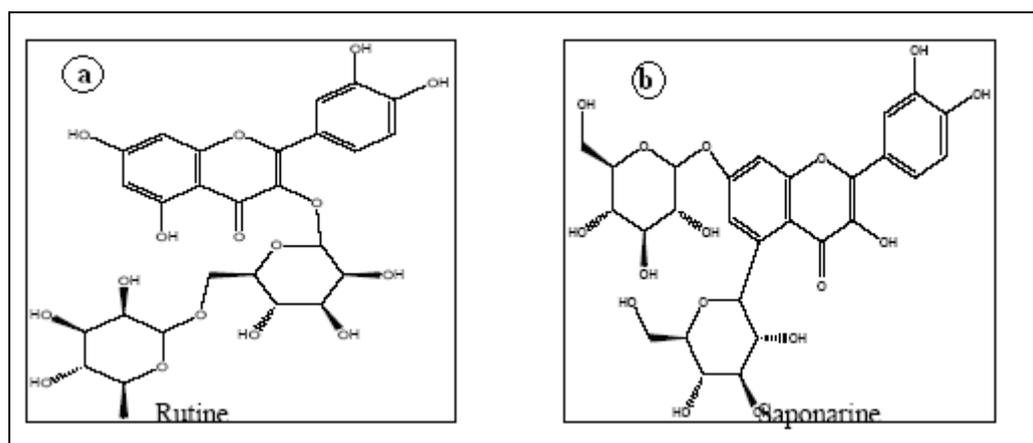
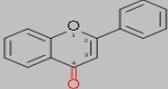
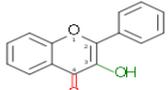
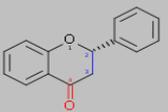
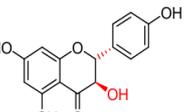
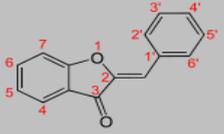
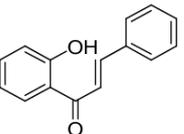
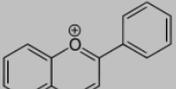
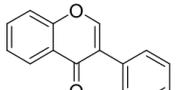


Figure 12: Structure des hétérosides; (A): O-glycosides (B) : C- glycosides (Milane, 2004).

Selon les variations d'hétérocycle C (soit le degré d'oxydation, de saturation et d'hydroxylation) (Pietta, 2000; Valérie, 2008; Ferhoum, 2001) ainsi que selon la position de la connexion entre le cycle B et C, les flavonoïdes peuvent être subdivisés en plusieurs classes de molécules. Les différentes classes de flavonoïdes (Valérie, 2008; Ferhoum, 2001) sont illustrées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Principales classes des flavonoïdes et leurs sources alimentaires (Moon, 2006).

Classe	Squelette	Exemples	Source alimentaires
Flavone		Apigénine, Lutéoline, Chryisine	Peau des fruits, persil, et céleri.
Flavonol		Quercétine, Kaempférol Myricétine	Poireau, radis, thé noir, oignon, pomme, olive et brocolis
Flavanone		Naringénine, Eriodictyol, Taxifoline	Poireau, radis, thé noir, oignon, pomme, olive, brocolis, et vin rouge
Dihydroflavonols		Dihydrokaempférol	Fruits de genre <i>citrus</i>
Aurone		Hispidol, Aureusidine, Sulfurétine, Maritimétine.	/
Chalcone		Butéine et phlorétine	/
Anthocyanidol		Cyanidol, malvidol et apigénidol	Raisin, fraise et framboise
Isoflavones		Genistéine, Daidzéine	Légumineuses (soja, et pois chiches verts), et graines de tourne sol

IV. 3. Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels dans la plupart des végétaux (Ghestem et al., 2001; Bruneton, 1999), ils sont distribués dans les organes aériens (graines, feuilles, écorce et fleurs) (Medic et al., 2003) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique), et parfois dans les racines. Ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (jeunes feuilles et boutons floraux). Au niveau cellulaire, les flavonoïdes de type hétérosides, s'accumulent dans les vacuoles ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux (Seghiri, 2008).

Les flavonoïdes diététiques sont rencontrés dans plusieurs aliments comme les fruits (notamment du genre *Citrus*), les légumes et également dans les boissons telles que le thé et le café (Bilia, 2007).

IV. 4. Pharmacocinétique des flavonoïdes

IV. 4. 1. Absorption

La plupart des flavonoïdes diététiques dans les aliments sont sous forme glycosidique, mais peuvent également exister sous des formes aglycones. Les formes aglycones peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle (Hollman et al., 1997; Hollman & Katan, 1998) tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées par le clivage des liaisons hétérosidique, par les glycosidases, de la flore microbienne au niveau du côlon avant d'être absorbées (Manach et al., 1995; Manach et al., 2004).

La biodisponibilité ou la fraction des flavonoïdes administré qui atteint la circulation générale; c'est-à-dire qui sera disponible par voie systémique sous forme inchangée (la quantité des flavonoïdes absorbée) et la vitesse à laquelle elle l'atteint (la vitesse d'absorption) dépend de la capacité de transport à travers la bordure en brosse des anthérocytes, l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang et de la capacité de la sécrétion biliaire (Vanessa et al., 2003). Ces facteurs vont leur conférer une faible biodisponibilité (Remesy et al., 1996).

IV. 4. 2. Métabolisme distribution et élimination

Les formes bioactives des flavonoïdes dans le sang ne sont pas celles retrouvées dans les plantes puisque ils ont été métabolisés (Williams, 2004). Les principaux organes de

métabolisme des flavonoïdes sont l'intestin par la flore microbienne et le foie (Haslam, 1998). En effet, les flavonoïdes sont transformés, au niveau des cellules intestinales, en flavonoïdes conjugués par méthylation, sulfatation ou glucuronidation (Crespy et al., 2004 ; Nijveldt, 2001), Une partie de ces nouveaux métabolites sont ensuite transportés dans le sang par l'albumine vers le foie où ils seront encore métabolisés (Nijveldt, 2001). Cependant, d'autres métabolites pourraient être déversés dans l'intestin via la bile et y être hydrolysés par les enzymes de la flore intestinale libérant ainsi de nouveaux aglycones en constituant probablement un recyclage entérohépatique des flavonoïdes qui permet le maintien d'une concentration non négligeable dans le sang (Manach et al., 1995; Rechner et al., 2000).

La fraction des flavonoïdes métabolisés destinée finalement vers les tissus pourrait avoir un effet biologique potentiel ou serait éliminée de la circulation sanguine par voie biliaire ou urinaire (Haslam, 1998).

IV. 5. Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

IV. 5. 1. Effet scavenger sur les radicaux libres et propriétés antioxydantes

De nombreuses études ont établi que les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules par différentes actions (Van Acker et al., 1995) :

- **Effet scavenger des radicaux libres;** les flavonoïdes (Fl-OH) sont capables de réduire les radicaux libres par transfert d'hydrogène et le radical Flavonoxy (Fl-O) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure stable. (Jovanovic et al., 1994). (**Figure 13**).

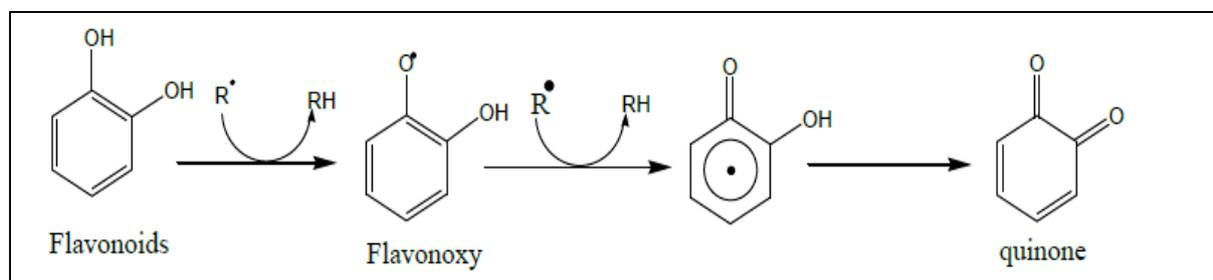


Figure 13: Effet scavenger sur les radicaux libres (R^\bullet) par les flavonoïdes (Jovanovic et al., 1994).

La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres est due à la présence de la structure ortho-dihydroxy sur le cycle B (groupement catéchol), la double liaison insaturée entre C2 et C3 adjacente à la fonction 4-oxo et la présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3 (Rice-Evans et al., 1996) (**Figure 14**).

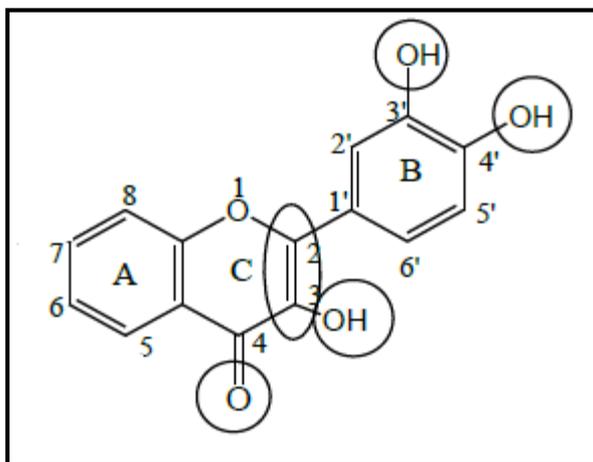


Figure 14: Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996).

- **La chélation d'ions métalliques de transition** comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) qui sont responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène (empêchant ainsi la réaction de Fenton) (Ahmad, 1995; Dacosta, 2003; Ferrali et al., 1997), Les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques sont le noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C et les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles C et A (Moridani et al., 2003) (**Figure 15**)

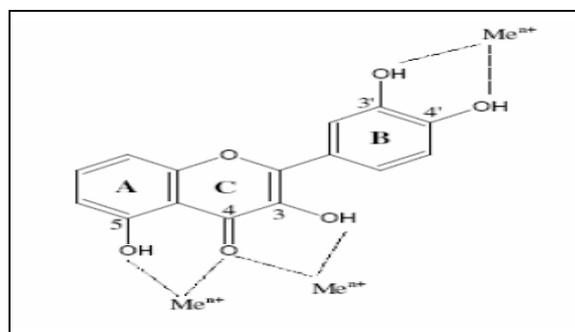


Figure 15: Sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Van Acker et al., 1996).

- **la protection des systèmes de défense antioxydants** par la régénération des antioxydants liés aux membranes comme l' α -tocophérol (Chebil, 2006).
- **Inhibition ou neutralisation de l'activité de certaines enzymes oxydantes** responsables de la production d'ERO comme l'oxygénase et la xanthine oxydase (Cotelle, 2001; Chebil, 2006).

IV. 5. 2. Propriétés anticancéreuses

Les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder ou d'empêcher l'apparition de certains cancers. Les propriétés anticancéreuses des flavonoïdes peuvent être expliquées par les mécanismes suivant:

- Inhibition des enzymes intervenant dans la réactivation des procarcinogènes en intermédiaires carcinogènes tel que le Cytochrome P450 (Obermeier et al., 1995)
- Stimulation des enzymes de la réparation de l'ADN.
- Induction de l'apoptose des cellules tumorales (Tabar, 2011).
- protection contre les dommages oxydatifs sur l'ADN grâce à leur capacité de réduction des radicaux libres (Tabar, 2011).

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments (Pietta, 2000; Tomofuji, 2009).

La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20 % de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du colon. Le mécanisme suggéré est que la quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales (Pietta, 2000; Tomofuji, 2009).

La catéchine, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHDG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN (Pietta, 2000; Tomofuji, 2009).

IV. 5. 3. Autres propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées, ils ont décrits comme étant des antihypertenseurs (Ghedira, 2005), antiallergiques, anti-inflammatoires, antimicrobienne (Ramos, 2007; Narayana et al., 2001) et antidiabétique (Zheng et al., 2011).

Les flavonoïdes sont aussi capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Middleton & Elliott., 1996).

Récemment des chercheurs ont montré que les flavonoïdes pouvaient avoir une action plus sélective en interagissant avec une glycoprotéine de surface du virus HIV, empêchant ainsi la liaison du virus à la cellule hôte (Mahmoud et al., 1993).

Ces propriétés thérapeutiques sont attribuées à l'influence des flavonoïdes sur de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies. En effet, les flavonoïdes peuvent moduler l'activité de nombreuses enzymes et protéines intracellulaires (Ghedira, 2005).

V. La plante médicinale *Ruta montana*

Ruta montana est une plante aromatique annuelle appartenant à la famille des rutacées (Quezel & Santa, 1963) caractérisée par des poches sécrétrices qui libèrent une huile essentielle (Ozenda, 2000). Cette famille a été décrite initialement en 1782 par Durande (Durande, 1782), puis par Jussieu en 1789 (De Jussieu, 1789), elle comprend près de 1500 espèces regroupées en environ 150 genres (Heywood, 1996) En Algérie, il existe 4 espèces et sous espèces du genre *Ruta*, qui se différencient entre elles par l'allure des feuilles, la grappe fructifère, les bractées et les sépales : *Ruta montana*, *Ruta chalepensis* subsp. *angustifolia*, *Ruta chalepensis* subsp. *latifolia* et l'espèce Saharienne *R. tubercula* (Ozenda, 1958; Quezel & Santa, 1963; Bossard & Cuisance, 1981).

Beaucoup d'espèces des *Rutaceae* sont utilisées en pharmacie et dans l'industrie agroalimentaire, telles que diverses espèces du genre *Citrus*. Leurs flavonoïdes sont principalement utilisés pour améliorer l'insuffisance veineuse lymphatique, et leurs huiles essentielles sont utilisées en parfumerie (Goskowicz et al., 1994). *R. montana* a été choisie dans le cadre de nos travaux pour son abondance en Algérie et également pour ses propriétés médicinales reconnues depuis l'antiquité.

V.1. Description botanique de la plante

La plante *R. montana* est un sous-arbrisseau gris vert, vivace, glabre de 30 à 60 cm de hauteur (**Figure 16 A**), émet une odeur très forte, plutôt désagréable (Benziane, 2007). À tige rameuse dans sa partie supérieure, dressées et semi-ligneux (**Figure 16 B**). Les feuilles, glauques très divisées en segments linéaires-obtus, alternes lancéolées ou souvent oblongues dans leur pourtour (Francis & Devergnas, 2012), enroulées en dessous par leur bord, couvertes de petites punctuations qui sont des pochettes à essence (**Figure 16 C**). Le goût de ses feuilles est très amer et acre (Benziane, 2007). Les fleurs sont jaune verdâtre, petites à 0.6 cm de longueur, à 4 pétales concaves, denticulés sur les marges (Francis & Devergnas, 2012) et 4 sépales lancéolés en alêne, longuement acuminés (Quezel & Santa, 1963). Calice persistant. Elles comportent 8 étamines et 4 à 5 carpelles libres multi-ovulés, à style soudé, (**Figure 16 D**). À maturité, le fruit est une capsule globuleuse, s'ouvrant en deux valves et laissant apparaître une graine globuleuse noire et brillante (Creté, 1965; Fournier, 1948; Achille, 1980).



Figure 16: Quelques photos de *R. montana*. (A) la plante entière, (B) la tige, (C) les feuilles, (D) les fleurs.

V. 2. Classification systématique

La classification systématique de *R. Montana* est représentée dans le **Tableau 4** (Quezel & Santa, 1963).

Tableau 4 : Classification systématique de *R. Montana*

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i> (plantes vasculaires)
Super division	<i>Spermatophyta</i> (plantes à graines)
Division	<i>Magnoliophyta</i> (plantes à fleurs)
Sous division	<i>Angiospermae</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotylédons)
Sous classe	<i>Rosidae</i>
Super ordre	<i>Rutanae</i>
Ordre	<i>Rutales</i>
Sous-ordre	<i>Rutineae</i>
Famille	<i>Rutaceae</i>
Sous-famille	<i>Rutoideae</i>
Genre	<i>Ruta</i>
Espèce	<i>Montana</i>

V. 3. Appellation de la plante

La plante est désignée par un grand nombre de dénominations depuis qu'elle est connue (Cousin, 1999) Elle est indiquée par son nom français « rue » dont la signification fait allusion à ses vertus emménagogues (François & Niestlé, 2000). Dans la médecine traditionnelle grecque et latine, la rue est tirée du nom *Réuo* qui signifie libre de maladie (Ernes, 1995). La plante est citée par Ibn-Baytar sous les termes de *sadzab* et *fidjen* (Baba Aissa, 1999). Alors que Le nom vernaculaire est le "Fidjel el djbel " en arabe et "Awernii" en berbère (Daoudi et al., 2016).

V.4. Répartition géographique

R. montana pousse dans les régions tempérées et chaudes, Elle vit à l'état spontané dans les rochers, collines sèches et elle est abondante dans les terrains calcaires dans le bassin méditerranéen (Quezel & Santa, 1963), sur les lieux arides de presque toute la France, l'Europe méridionale et l'Afrique du nord. En Algérie, elle est rencontrée dans les zones montagneuses de l'intérieur sur l'Atlas Saharien et les pelouses arides (Clevely & Richmond ,1997).

V.5. Travaux phytochimiques antérieurs et propriétés biologiques

Les investigations phytochimiques réalisées sur *R.montana* ont indiqué la présence de Nombreux métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les huiles essentielles, les coumarines, les phénols, les saponines, les lignanes et les triterpènes (**Tableau 5**), avec des activités biologiques, y compris antifongique, phytotoxiques, abortive, dépresseur, antidote, anti-inflammatoire et antioxydant (Raghav et al.,2006; Mejrib et al.,2010).

L'une des propriétés reconnues par l'USDA (United States Département of Agriculture) est de sa capacité pour abaisser la pression artérielle comme hypotenseur, ce qui en fait une plante utile pour le traitement des vaisseaux sanguins (Metzger, 1932).

Tableau 5: Quelques dérivés des métabolites secondaires de l'espèce *R. montana L.*

La plante	Origine	Les dérivés	Références	
<i>R. montana</i>	Les coumarines		(Benkiki,2006)	
	Espagne	Chalépensine, rutolide, bergaptène, chalépine, rutamarine, xanthotoxine, psoralène, umbellifèrone, Umbellifèrone et daphnoretine .		
	Australie	Rutolide.		
	Les alcaloïdes			
	Turquie	3-Hydroxyqui-2- noline et montanine.		
	Maroc	1-méthyl-4- méthoxy-2- quinolone, evolitune et 2-(decan-9- one) -N- méthyl-4- quinolone.		
	Les flavonoïdes			
	Turquie	Rutine.		
	Les huiles essentielles			(Belkassam,2011)
	Algérie	Resorcinol, 2-acétyltétradécane, undécane-2-one, 2- acétoxytétradécane		
Tunisie	Cyclopentane oxide, Méthylcyclopropane, 2-Butène, Linalool.			

V.6. Usage thérapeutique traditionnel de la plante

La rue est une plante utilisée depuis longtemps pour des usages thérapeutiques et culinaires (épice) (Benziane, 2007); dans l'antiquité en Grèce et en Égypte, elle est employée pour provoquer des avortements et pour améliorer l'activité visuelle (Larousse, 1997). D'autre part, il est reconnu depuis longtemps que le jus des feuilles de la rue sert comme antidote contre les morsures de serpent et les piqûres d'insectes (Metzger, 1932).

La plante est utilisée fréquemment pour ses propriétés stimulantes, antiseptiques, émétagogue, diurétiques, antispasmodique, rubéfiant, abortives, antirhumatisme, antiparasitaire et analgésique (Forment & Roques, 1941; Benkiki, 2006), elle est également utilisée chez les malades sujets aux attaques de l'épilepsie et l'hystérie (Kirtikar & Bsu, 1984). Sa tisane est consommée pour soulager les coliques, les douleurs d'estomac, la fièvre, les problèmes cardiaques dus à une colère ou une frayeur, les maux d'oreilles (Nicolas, 1999). Le suc obtenu par l'écrasement des feuilles est instillé dans les yeux lors de la maladie oculaire. La plante fraîche est appliquée contre les maux de tête (Francis & Devergnas, 2012). Le **tableau 6** présente les multiples usages traditionnels de plusieurs *Ruta* de part le monde.

Tableau 6 : Quelques usages traditionnels du *R. montana*

La plante	Pays	Partie utilisée	Voie	Usages	Réf.
<i>R. montana</i>	Espagne	Plante entière	orale	Emménagogue, contre la Fièvre abortive, antispasmodique et contre les vers intestinaux.	(FrontQuer, 1962)
	Maroc	Plante entière	orale	Abortif puissant, Soigne la jaunisse et photo sensibilisante	(Claisse, 1993)
	Algérie	Parties aériennes	orale	Emménagogue et Antispasmodique, rubéfiant, poudre écharrotique	(Benkiki, 2006)

L'exploitation sélective du contenu des *Ruta* utilisées dans ces différentes pharmacopées demeure ainsi une des voies prometteuses de découverte de médicaments nouveaux.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude de l'effet de la plante médicinale: *R. montana* sur le stress oxydant induit par la doxorubicine au niveau du cœur et sur la réversion de la résistance à la doxorubicine des lignées cellulaires cancéreuses des ovaires humaine. La partie expérimentale est réalisée au laboratoire de biologie de l'environnement, Université Mentouri Constantine, laboratoire central de biochimie de Centre hospitalo-universitaire Dr Benbadis Constantine, laboratoire d'Anatom Pathologique de l'hôpital Abd Elhafid Boudjemaa de Constantine et laboratoire de Biochimie Université Sapienza, Roma- Italie.

I. Matériel

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Matériel végétal

Il est constitué des extraits de la partie aérienne de la plante médicinale *R. montana* récoltée dans la région de Mila en Mai 2012 et identifiée par Mme Kabouche Z professeur au Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutique (LOST) de photochimie, à l'université Mentouri Constantine 1.

I.1.2. Matériel animale

L'étude de l'effet préventif de la plante médicinale *R. montana* sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine a été réalisée sur des rats Wistar albinos mâles provenant de l'institut Pasteur d'Alger, Algérie, pesant entre 130g-260g les rats sont répartis en 4 lots ayant libre accès à l'eau et à la nourriture. Les animaux destinés au traitement sont préalablement mis en période d'adaptation allant de 7 à 15 jours.

I.1.3. Les lignées cellulaires

Nos études pour tester l'effet des extraits de *R. montana* contre la résistance au DOX ont été réalisées sur des lignées cellulaires adénocarcinome ovarien d'origine humaine A2780 DX3 (le type résistant).

I.1.4. Le médicament anticancéreux : la doxorubicine

Le médicament anticancéreux que nous avons utilisé pour provoquer la toxicité cardiaque chez les rats est la doxorubicine (50mg/25ml); il nous a été fourni par le centre anticancéreux de Constantine (CHUC).

I.2. Réactifs chimiques et équipements

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl₃, acide sulfurique (H₂SO₄), HCl, acide acétique, NaOH, NH₄OH, KI, I₂, NaCl, AlCl₃, K₂HPO₄, KH₂PO₄, acide trichloroacetic, H₂O₂, KCl, TBA, glutathion, quercétine, K₃Fe[CN]₆, Gomme Arabique, acide orthophosphorique, méthanol, n-butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, formol, 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl, 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid], Malondialdehyde, RPMI-1640; proviennent tous de Sigma-Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Rotavapeur (HAHNVAPOR), spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (JENWAY 6305 UV/VIS), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (VILBER COURMAT), Bain Marie (MEMMERT), Agitateur magnétique (SCIOLOGEX), vortex (VELP) et Balance (OHAUS), Automate Architect (ADVIA 1800), Incubateur (HERA cell) et lecteur de microplaque ELISA.

II. Méthodes

II.1. Préparation et étude des extraits de la plante médicinale *R. montana*

II.1.1. Préparation des extraits

La partie aérienne (tiges, fleurs et feuilles) de la plante récoltée a été bien nettoyée et séchée à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil à température ambiante. Enfin, la plante sèche a été pulvérisée au broyeur pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation. La méthode de Markham (Markham, 1982) était suivie pour l'extraction des flavonoïdes en utilisant des solvants organiques à polarité croissante. Suivant cette méthode; 640 g de la poudre de *R. montana* est introduit dans un bécher qui contient le mélange hydroalcooliques; méthanol /H₂O (7:3) pendant une nuit (macération alcoolique). Cette technique est effectuée 3 fois, suivie chaque fois d'une filtration et soumis à une évaporation rotative à 50 °C utilisant un rotavapeur (HAHNVAPOR) pour obtenir l'extrait brut méthanolique. L'extrait brut méthanolique a été initialement mélangé avec l'eau distillé

Matériel et Méthodes

pendant une nuit, après filtration la phase aqueuse a été soumise à trois extractions successives liquide-liquide par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le butanol. La **figure 17** résume les différentes étapes de cette extraction.

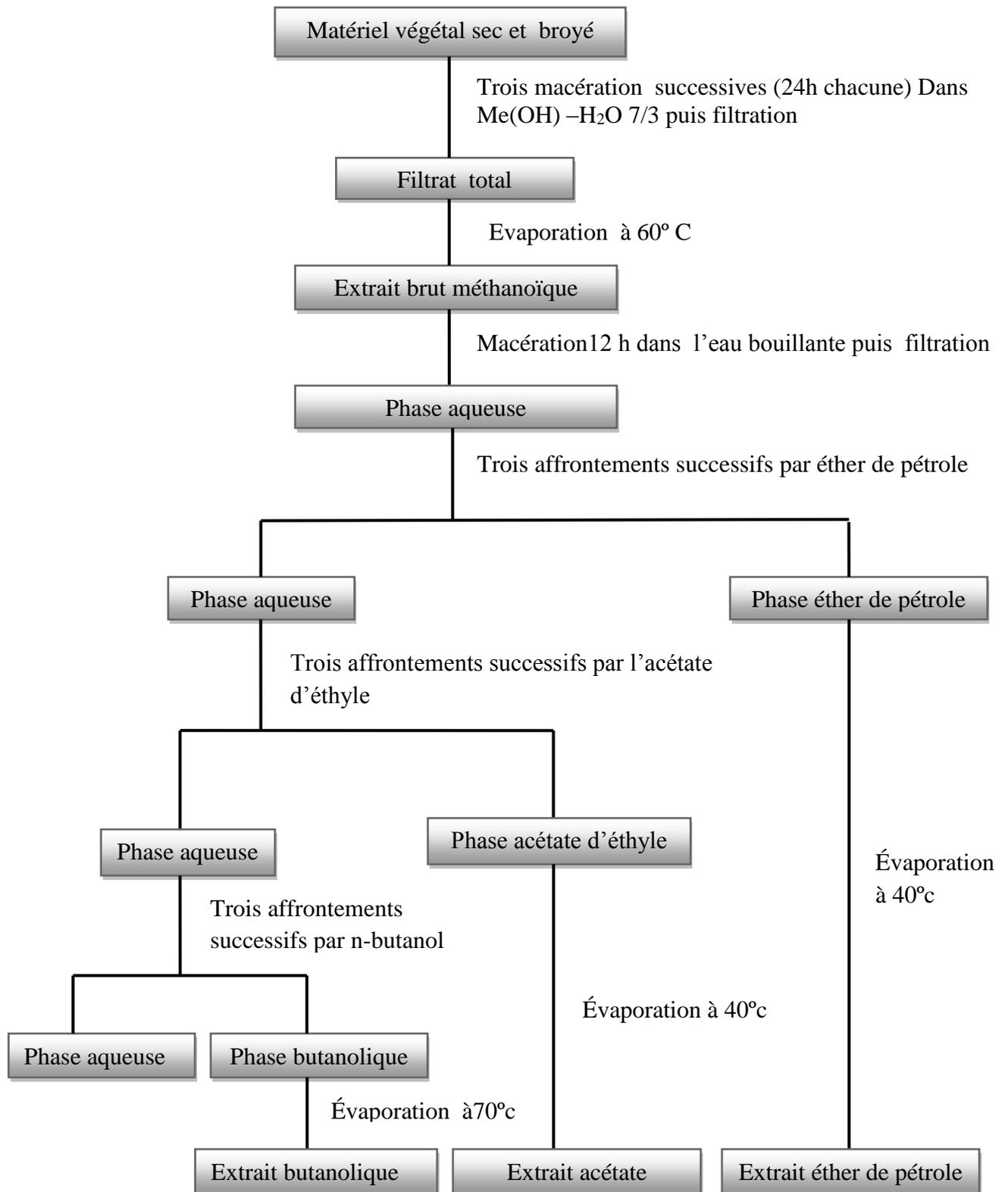


Figure 17 : Etapes de l'extraction des flavonoïdes de *R. montana* par la méthode de Markham (Markham, 1982).

II.1.2. Le Rendement des extraits de *R. montana*

Afin de déterminer le rendement des extraits de la partie aérienne de *R. montana* des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale, en calculant le rapport suivant :

$$R(\%) = (P1/P2) \times 100$$

P1 : poids de l'extrait

P2 : poids de la matière végétale de départ

II.1.3. Caractérisation phytochimique de la plante

Les tests de screening phytochimique sont des réactions physicochimiques qui permettent de caractériser la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et responsables de propriétés pharmacologiques; Ils sont réalisés à base de précipitations ou de colorations caractéristiques.

Les tests phytochimiques de la plante médicinale *R. montana* sont réalisés sur l'extrait brut méthanolique.

II. 1.3.1. Recherche des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de FeCl₃ à 2%, sont ajoutées à 2 mL de l'extrait brut méthanolique. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes. Le test est considéré positif s'il ya l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (Karumi et al., 2004).

II. 1.3. 2. Recherche des saponosides

- **Test 1** : 5 ml de l'extrait brut méthanolique sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides (Karumi et al., 2004).
- **Test 2** : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques (Edeaga et al., 2005).

II. 1.3.3 Recherche des flavonoïdes

5 ml de l'extrait méthanolique sont traités avec quelques gouttes d' AlCl_3 (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune (Edeaga et al., 2005).

II. 1.3. 4. Recherche des composés réducteurs

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl_3 et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl_3 sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) (Edeaga et al., 2005).

II. 1. 3. 5. Recherche des coumarines

Parmi les composés réducteurs on note les coumarines, la mise en évidence de ces dernières se fait selon la méthode décrite par (Benmahdi, 2001). Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH et le placer dans un bain marie pendant quelques minutes. Ajouter 0,5 ml de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.

II. 1. 3. 6. Recherche des alcaloïdes

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. 5 ml d'HCl (2N) sont ajoutés à l'extrait et chauffer dans un bain marie. Après la Filtration, le filtrat est traité avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d' I_2 solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels (Benmahdi, 2001).

II.1.4. Etude quantitative

II. 1.4. 1. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes d'extraits, méthanolique, éther de pétrole, acétate d'éthyle, butanolique de la plante ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium

Matériel et Méthodes

(Boharun et al .,1996); 1 ml de chaque extrait (préparés dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage $y = ax + b$ établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-40 µg / ml, chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les extraits servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimé en milligrammes équivalent de quercétine par gramme du poids d'extrait (mg EQ / g E) (**Figure 18**).

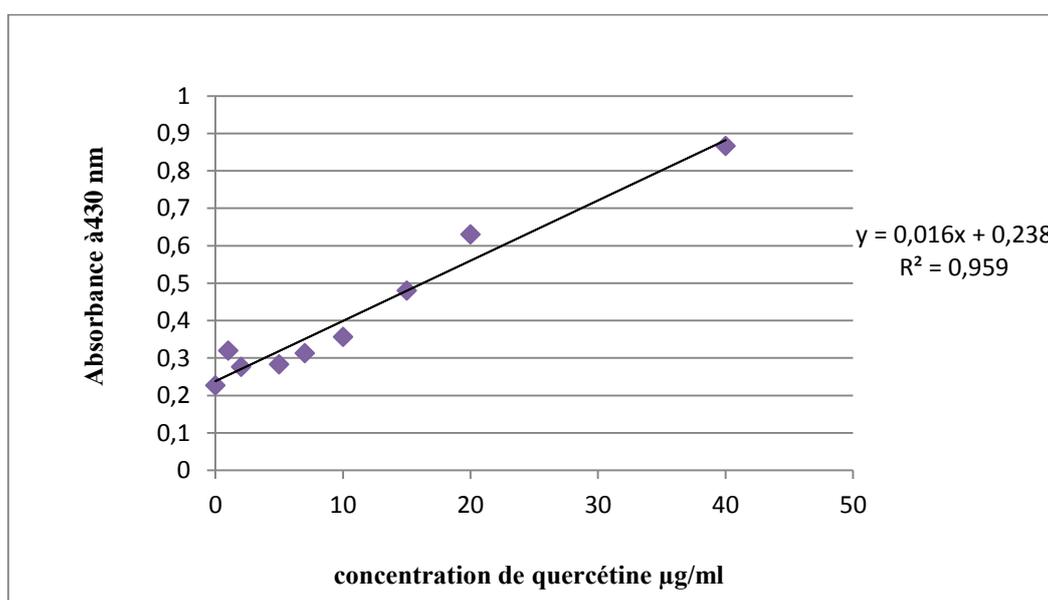


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

II.1. 4.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de *R. montana* ont été effectué selon la méthode de bleu de Prusse (Price & Butler, 1977) modifiée par Graham (Graham, 1992). Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium (K₃Fe [CN]₆) par les polyphénols pour donner les ions ferreux (Fe⁺²), ces derniers réagissent avec le chlorure de fer(FeCl₃) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de chaque extrait (dilués dans l'eau distillée ou dans le méthanol) a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du K₃Fe(CN)₆ (0.016 M) puis 1 ml du FeCl₃ (0.02 M, dans le HCl 0.1 N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle de temps d'une minute. Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml Gomme Arabique 1 %, 30 ml acide phosphorique 85 % et 90 ml de l'eau distillée) ont été ajoutés et

Matériel et Méthodes

l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0-200 µg / ml) (**Figure 19**) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait.

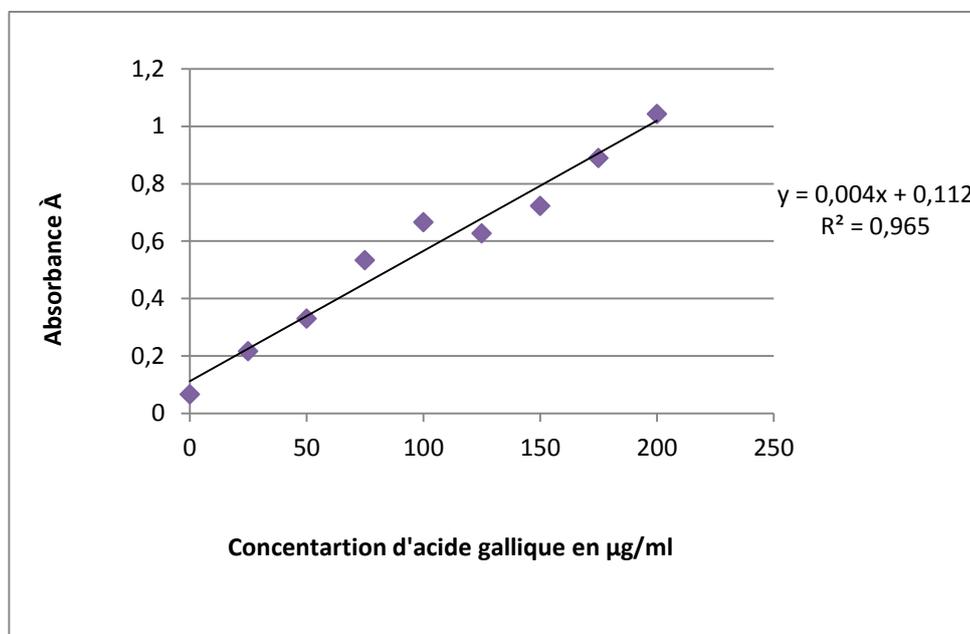


Figure 19: Courbe d'étalonnage d'acide gallique (mg EAG / g E).

II.1.5. Etude qualitative (Chromatographie sur Couche Mince)

II.1. 5.1. Principe

La Chromatographie sur Couche Mince-CCM- repose sur la séparation des différents constituants d'un extrait selon leur force de migration dans la phase mobile qui est en générale un mélange de solvant, adapté au type de séparation rechercher, et leur affinité vis-à-vis la phase stationnaire qui peut être un gel de silice ou de polyamide. Les techniques chromatographiques ne sont pas suffisantes pour identifier un produit mais elles apportent des renseignements (Rapport frontal - R_f - et coloration) susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structure.

II.1. 5.2. Protocole de CCM sur gel de silice

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium 10x10cm. L'extrait est déposé à l'aide d'une micropipette (2 µl) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque. Ensuite, les plaques sont placées dans les cuves de développement dans les quelles se trouve un système de solvants approprié appelé phase mobile, à environ 0,5 cm de hauteur. La migration est effectuée par l'utilisation des systèmes de solvants cités dans le **tableau 7**

Tableau 7 : Les systèmes utilisés en CCM sur gel de silice

Les extraits	Phase mobile
Extrait éther de pétrole	Système 01: Chloroforme/Méthanol (96/4)
	Système 02: Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80
Extrait acétate d'éthyle	Système 01 : Toluène /Acétate d'éthyle- Méthanol (5/3/1)
	Système 02 :Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80
Extrait butanolique	Chloroforme/ MEO/H ₂ O (65/45/12)

Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 365 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les R_f.

II.1.5.3. Révélation

Après développement, les plaques ont été séchées, puis visualisées séparément par une lampe UV à 366 nm. Les rapports frontaux (R_f) des spots issus de la séparation ont été calculés selon le rapport suivant :

$$R_f = d / D$$

d :Distance parcourue par la substance

D : Distance parcourue par le solvant

Ce facteur permet de mentionner une information préliminaire sur la structure des substances flavoniques.

II.1.6. Estimation *in vitro* de l'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical libre DPPH°

II.1.6.1. Principe de l'essai

La capacité de l'extrait à piéger les radicaux libres est déterminée par une méthode colorimétrique, simple et rapide; la méthode de Koleva (Koleva et al., 2002) qui utilise le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) qui, à l'état stable, possède une coloration violette foncée qui absorbe à 517 nm. La réduction des radicaux DPPH• par un agent antioxydant entraîne une décoloration de la solution en jaune pâle (**Figure20**).

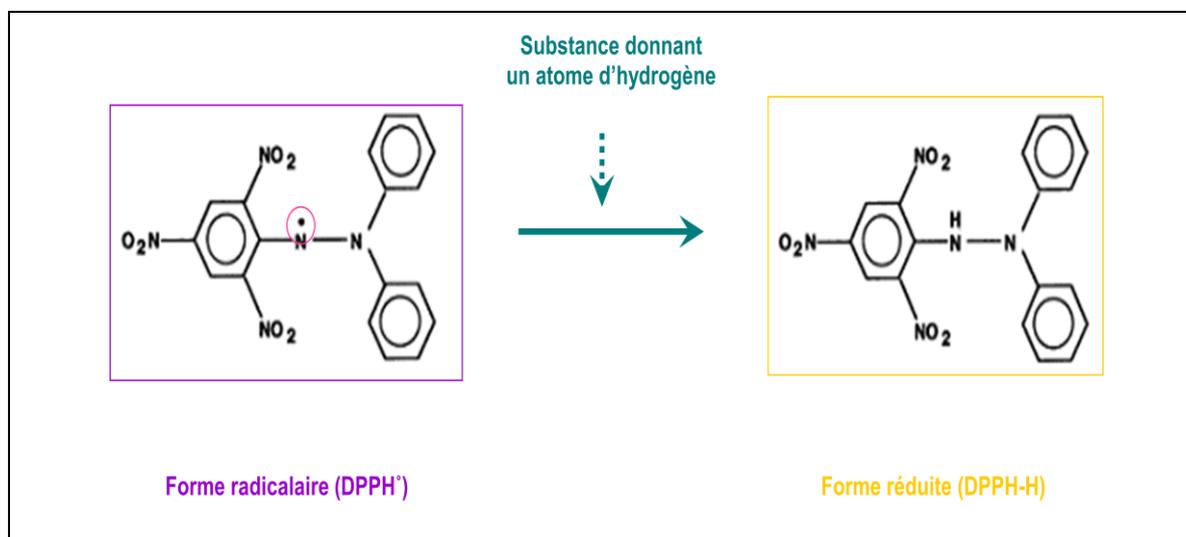


Figure 20 : La réduction du DPPH• par un antioxydant (Molyneux, 2004)

II.1.6.2. Réalisation de l'essai

Le DPPH° 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (C₁₈H₁₂N₅O₆) est solubilisé dans du méthanol absolu pour avoir une solution de 100µM. A partir d'une solution méthanolique mère de C₁= 40 mg/ml de chaque extrait, les dilutions suivantes ont été préparées : C2: 30mg/ml, C3: 20mg/ml, C4: 10mg/ml, C5:5mg/ml, C6: 3 mg/ml, C7: 2 mg/ml, C8: 1mg/ml, C9: 0,5mg/ml, C10mg/ml : 0,250 mg/ml , C11: 0,125 mg/ml , C12 mg/ml : 0,1mg/ml.

A chaque volume de 1,5 ml de la solution méthanolique du DPPH•, un volume de 15 µl de chaque concentration préparée de l'extrait est ajouté. Après agitation et incubation à la température ambiante pendant 15 min, les densités optiques des mélanges réactionnels sont

Matériel et Méthodes

mesurées par le spectrophotomètre à 517 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions par le méthanol.

L'activité antioxydante est comparée à celle d'un flavonoïde commercial qui est la quercétine qui est à son tour déterminée de la même façon que celle de l'extrait.

II.1.6. 3. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (% PI) du DPPH^{*} est données selon la formule suivante :

$$\% \text{ PI du DPPH}^* = [(A_B - A_E) / A_B] \times 100$$

A_B et A_E sont les valeurs de l'absorbance du blanc et de l'extrait respectivement à 517 nm.

II.2. Etude de l'effet préventif de l'extrait acétate d'éthyle de *R. montana* (EAERM) sur la cardiotoxicité de la doxorubicine

II.2.1. Traitement des animaux

32 Rats sont utilisés pour cette étude qui a duré 15 jours. Ils sont répartis en 4 lots.

- **Lot 1 (Témoin: 8 rats):** animaux recevant l'eau saliné (5ml/Kg) par gavage pendant 15jours.
- **Lot 2 (Extrait: 8 rats):** animaux recevant par voie orale l'extrait acétate d'éthyle de *R. montana* à la dose quotidienne de 100 mg/kg/5ml dilué dans l'eau distillée, pendant 15 jours.
- **Lot 3 (DOX: 8rats):** animaux recevant l'eau saliné (5ml/Kg) par gavage pendant 15jours puis traités le 12^{ème} jour par la doxorubicine seule à la dose unique de 15 mg/kg par voie intrapéritonéale.
- **Lot 4 (Extrait + DOX: 8rats):** animaux prétraités par l'extrait acétate d'éthyle à la dose quotidienne de 100 mg/kg par gavage pendant 15 jours, la DOX est administrée à la dose unique de 15 mg/kg par voie intrapéritonéale, le 12^{ème} jour du traitement.

Les rats sont maintenus à température ambiante avec accès libre en eau et en nourriture. L'état de santé général des animaux traités est observé et le poids corporel de chaque rat est mesuré chaque jour durant toute la période du traitement. Il est impératif d'ajuster les doses de traitement pour les lots chaque 3jours selon le changement du poids afin de maintenir la même dose par kilogramme du poids corporel.

II.2.2. Le sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques

A la fin de la période du traitement, les animaux sont mis à jeun pendant une nuit. Le sacrifice des rats est fait après 48h de l'injection de la DOX par décapitation, leur sang est récupéré sur des tubes héparinés pour les études biochimiques et enzymatiques (dosage de la CKMB, ASAT, ALAT et LDH), et après la dissection le cœur de chaque rat est prélevé pour le dosage tissulaire et pour les coupes histologiques.

II.2.2.1. Préparation du sérum et de l'homogénat

Le sérum est préparé par la centrifugation du sang à 6000 tours / minute pendant 15 minutes puis stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation pour l'analyse des paramètres biochimiques.

Matériel et Méthodes

Après la dissection, le coeur de chaque rat est rapidement prélevé et bien rincé avec l'eau physiologique froide puis séché sur le papier filtre. Ensuite, le coeur est coupé en petits morceaux, pesé et enfin homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur de daounce dans une solution de KCl 1.15% à raison de 10% p/v. L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 tours/minute pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite, le surnageant est récupéré dans des tubes secs est stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation pour les dosages tissulaires.

II.2.2.2. Préparation des échantillons pour les coupes histologiques

Pour l'étude histologique, des échantillons du cœur, doivent être rapidement prélevé puis rincé avec l'eau physiologique froide, et ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol à 10%.

II.2.3. Dosages biochimique *in vivo* (activité de CKMB, ASAT, ALAT et LDH)

Les activités enzymatiques de CKMB, l'ASAT, l'ALAT et LDH, biomarqueurs de la fonction cardiaque, sont déterminées par colorimétrie en utilisant des Kits du commerce (Biomérieux, France), sur un automate multiparamétrique (TECHNICON, Germany).

II.2.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la CKMB

La créatine phosphokinase (CKMB) catalyse la phosphorylation de l'ADP en ATP via la conversion de la phosphocréatine en créatine. L'ATP produit de cette réaction est utilisé pour la phosphorylation de glucose en glucose 6-P (G-6-P) en présence de glucokinase. Le G-6-P est ensuite oxydé par l'enzyme glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) via la réduction du NADP en NADPH. La vitesse de formation de ce dernier est mesurée à 340 nm qui est proportionnelle à l'activité de la CKMB. Les réactions résumant le principe de la procédure est représenté dans la **figure 21**.

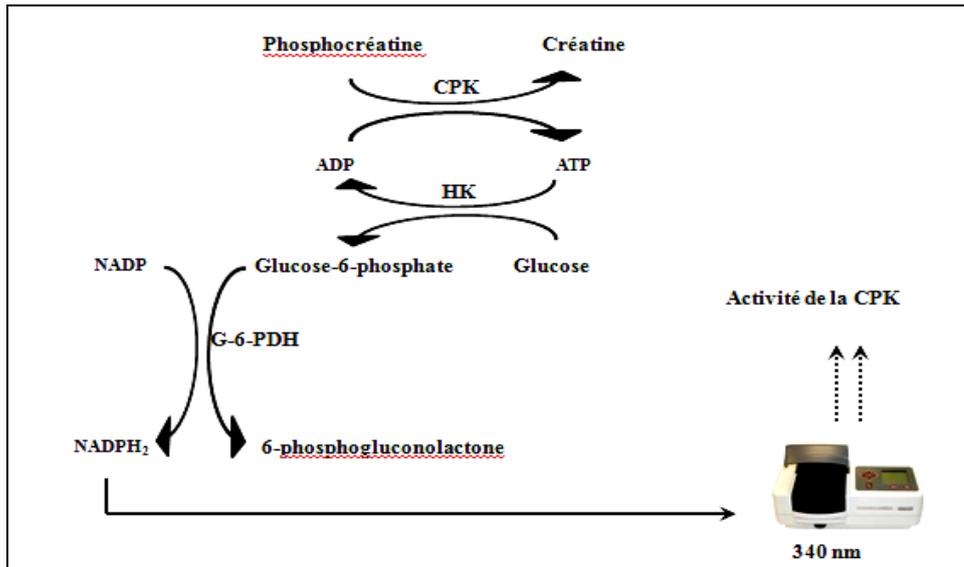


Figure 21 : Principe du dosage de l'activité de la CKMB

II.2.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique de l'ASAT et l'ALAT

L'aspartate aminotransférase (ASAT ou GOT) catalyse le transfert du groupement amine de l'aspartate sur l'alpha-cétoglutarate pour former une molécule d'oxaloacétate et de glutamate. En présence de NADH₂ et de malate déshydrogénase (MDH), l'oxaloacétate est réduit en L-malate. Au cours de cette réaction, NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm (**Figure 22 A**).

L'alanine aminotransférase (ALAT ou GPT) catalyse le transfert du groupement amine de l'alanine sur l'alpha-cétoglutarate pour former une molécule d'oxaloacétate et de glutamate. En présence de NADH₂ et de lactate déshydrogénase (LDH), l'oxaloacétate est réduit en L-lactate. Au cours de cette réaction, NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm (**Figure 22 B**).

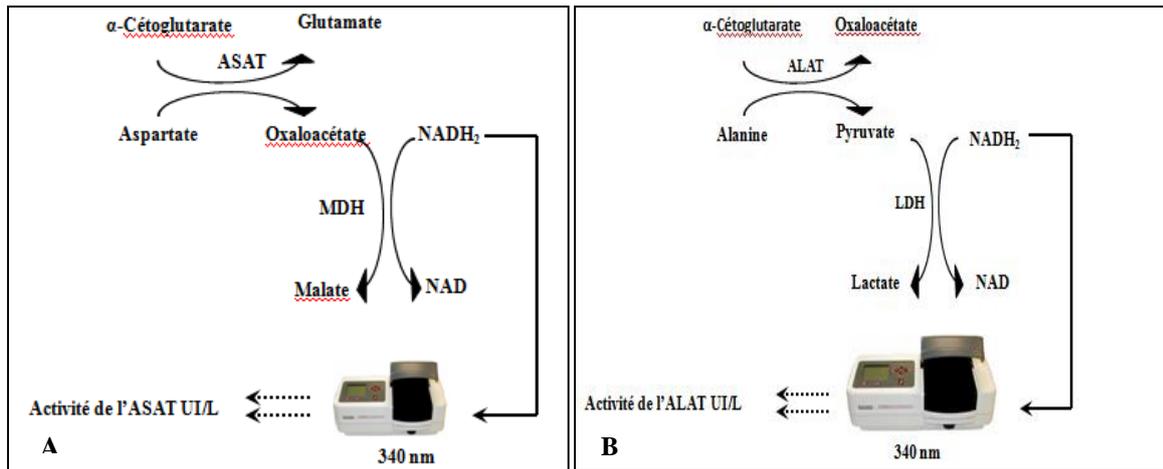


Figure 22: Principe du dosage de l'activité de la L'ASAT (A) et de l'ALAT (B)

II.2.3.3. Evaluation de l'activité enzymatique de LDH

La lactate deshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le $NADH$, pour donner le lactate et le NAD^+ (Figure 23). La concentration catalytique est déterminée à partir de la vitesse de disparition du $NADH$, mesuré à 340 nm.

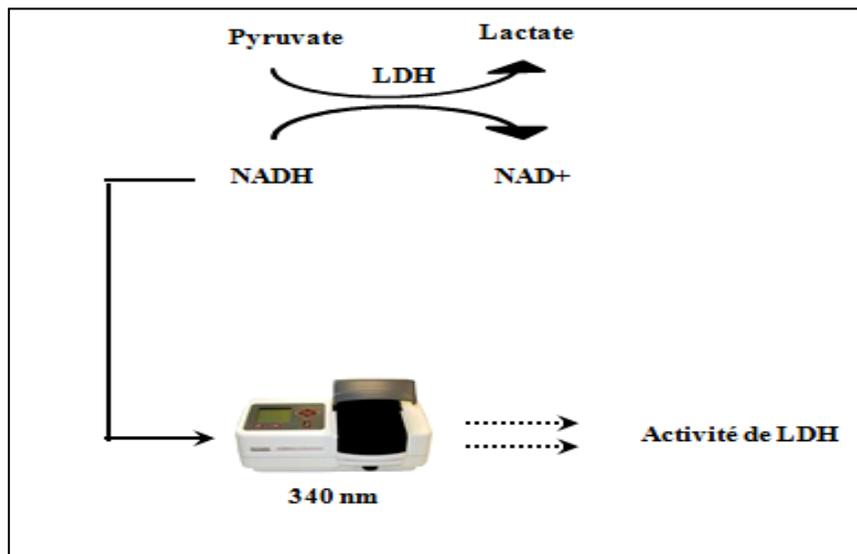


Figure 23: Principe du dosage de l'activité de LDH

II.2.4. Effet de EAERM sur le taux des biomarqueurs de stress oxydant dans le tissu cardiaque

II.2.4.1. Dosage du Malonyldialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde est l'un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) méditée par les radicaux libres. La mesure de l'MDA à l'aide du thiobarbiturique (TBA) selon la méthode de Okhawa (Okhawa, 1979) permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur le plus utilisé pour déterminer un stress oxydant.

A .Principe du dosage

Le dosage de l'MDA repose sur la formation, en milieu acide et à chaud (100°C), entre une molécule d' MDA et deux molécules d'acide TBA (**Figure 25**) d'un complexe fluorescent de couleur rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n- butanol.

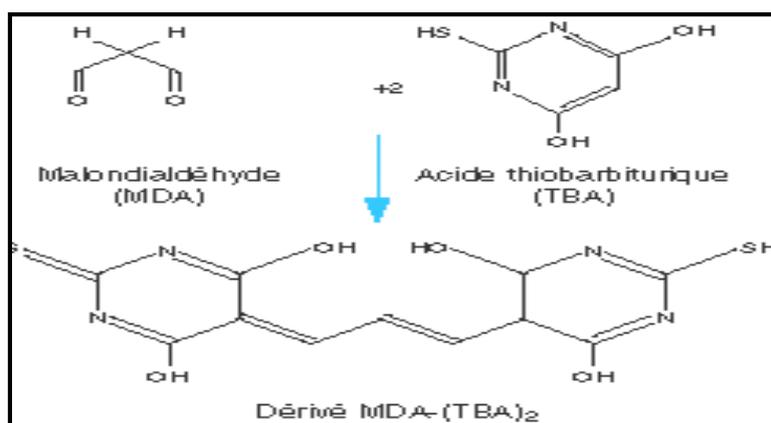


Figure 24 : Réaction du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique

B. Réalisation du dosage

À 0.5 ml de l'homogénat du cœur, nous avons additionné 0.5ml de l'acide trichloroacétique (TCA) 20 % et 1ml de l'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 min, refroidis puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours /minutes, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec l'eau distillée. Le MDA est exprimé en nmol/g de tissu de cœur calculé à partir d'une

Matériel et Méthodes

gamme d'étalonnage sous les mêmes conditions avec une solution de « 1,1,3,3-tetraoxypropane » qui, est déterminé par l'équation: $Y = 0.0184X$ $R^2 = 0,978$

II.2.4.2. Dosage du glutathion (GSH)

Le glutathion, est un tripeptide antioxydant constitué de trois acides aminés: le glutamate, la cystéine et la glycine, indispensable à la défense cellulaire, existe sous deux formes : une forme oxydée (GSSG) et une forme réduite (GSH). Le glutathion réduit, est le composé le plus abondant de toutes les molécules à fonction thiol (SH) dans le tissu animal (Delphine, 2009).

B. Principe du dosage

La concentration de glutathion cardiaque a été effectuée selon la méthode colorimétrique d'Ellman (Ellman, 1959). Elle est basée sur l'oxydation du GSH par le réactif d'ELLMAN ou l'acide 5,5-dithio-2-nitrobenzoïque (DTNB)-. Libérant ainsi le thionitrobenzoïque (TNB); dérivés thiols aromatiques colorés, qui à pH alcalin présente une absorbance à 412nm selon la réaction suivante (**Figure 25**).

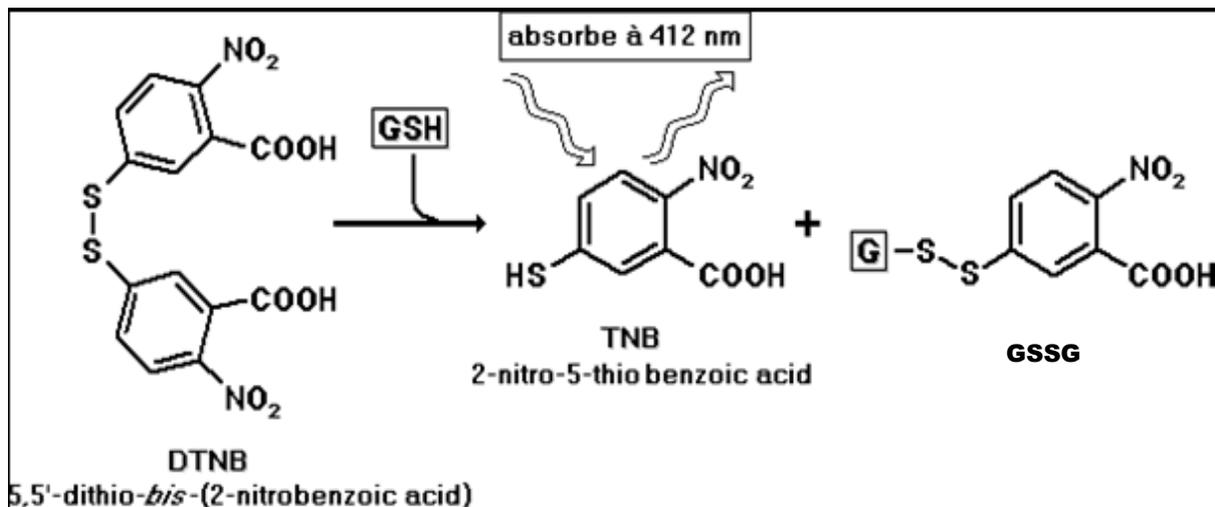


Figure 25 : Principe du dosage du glutathion par l'acide 5,5'-dithiobis (2nitrobenzoïque)

B. Réalisation du dosage

0.5 ml de TCA (10%) est ajouté à 0,5ml de l'homogénat du cœur. Après agitation douce de 10 à 15 min, on centrifuge le mélange à 2000 tpm pendant 5min. Dans un tube à essai, on ajoute à 0,2 ml du surnageant 1,7 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 7), puis on ajoute 0,1 ml de solution de DTNB. Après 5min d'incubation, la densité optique du mélange réactionnel est lue par spectrophotomètre à 412nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA. Le taux de GSH est calculé à partir d'un courbe étalon préparé par le GSH. Les résultats sont exprimés par $\mu\text{mol/}$ gramme de cœur.

II.2.5. Effet de l'EAERM sur l'activité des enzymes antioxydants cardiaque

II.2.5.1. Dosage de la catalase

A. Principe du dosage

L'activité enzymatique du catalase est mesurée selon la méthode de Clairborne (Clairborne, 1985) par analyse spectrophotométrique du taux de décomposition du peroxyde d'hydrogène à 25°C en présence de source de l'enzyme catalase qui se trouve au niveau de l'homogénat cardiaque. En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorbance à 240 nm de H₂O₂ en fonction du temps.

B. Réalisation du dosage

Dans une cuve de spectrophotomètre en quartz, 50 μl de l'homogénat sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H₂O₂ à 19 mmoles/ml préparée dans le tampon phosphate de potassium (KH₂PO₄ 0.1M , pH 7.4). L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 240nm chaque minute pendant 2 min en prenant les valeurs à t₀. L'activité enzymatique du catalase est exprimée en constante de vitesse de la réaction par gramme de tissu cardiaque, selon la formule suivante:

$$K = \frac{2.303}{T} \times \log (A1/A2)$$

Dont :

K : Constante de vitesse de la réaction.

T : Interval de temps en minute.

A1 : Absorbance à t₀

A2 : Absorbance à t₁

L'activité enzymatique du catalase = K/n (K/g) où n représente la quantité de tissu en gramme Dans le volume utilisé de l'échantillon testé

II.2.5.2. Dosage du Glutathion- S-transférase (GST)

La GST c'est l'enzyme majeure de la détoxification enzymatique des xénobiotiques ou composés naturels souvent cytotoxiques de nature électrophile par conjugaison avec le glutathion (Anjum et al., 2012), selon la réaction suivante :



A. Principe du dosage

La mesure de la glutathion S-transférase est effectuée selon la méthode de Habig and jakoby (Habig & jakoby, 1981) détaillée dans le Kit de SIGMA. Le principe est basé sur la mesure de l'absorbance à 340 nm du complexe Glutathion-2,4-Dinitrobenzene formé entre le GSH et le CDNB par l'action de la GST.

B. Réalisation du dosage

Le mélange réactionnel contient 2,7 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5 (2,8 ml pour le blanc), 0,1 ml de glutathion 50 Mm (préparé dans le tampon phosphate pH 6,5) et 0,1ml de CDNB 40 Mm (préparé dans l'éthanol à 95%). 0,1ml de l'homogénat est ajouté au mélange placé dans la cuve et le tout est mixé par inversion. L'absorbance est mesuré chaque minute pendant 5 minutes.

La concentration de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$\text{Unités/ml enzyme} = (\Delta A_{340}/\text{mn Test} - \Delta A_{340}/\text{mn Blanc}) (3) / (9,6) * (0,1)$$

- 3 : volume total (ml)
- 9,6 : coefficients d'extinction du CDNB conjugué.
- 0,1 volume de l'extrait enzymatique (ml).

Une unité correspond à la conjugaison de 1µmole de 1- chloro-2,4-dinitrobenzene avec le glutathion réduit par minute.

II.2.6. L'étude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital Abd Elhafid Boudjemaa de Constantine, laboratoire d'Anatom Pathologique, suivant la technique décrite par (Houlot ,1984). La technique comporte cinq étapes principales:

II.2.6. 1. La fixation des échantillons

Après la décapitation des rats, des fragments de cœur des quatre lots ont été rapidement fixés dans le formaldéhyde 10% afin d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies et entraînant leur insolubilité.

II.2.6. 2. La déshydratation et l'éclaircissement des échantillons

Après la fixation les échantillons sont retirés du formol puis rincés à l'eau distillée, ensuite, ils sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées. La déshydratation se fait en utilisant un automate (Leica TP 1020) qui fait immerger les cassettes des échantillons dans des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains de xylène pour l'éclaircissement des tissus et en fin les pièces sont plongées dans des bains de paraffine liquide qui va peu à peu pénétrer les tissus en remplaçant le solvant.

II.2.6. 3. L'inclusion des échantillons

Après la saturation des échantillons par la paraffine liquide ils sont inclus par la paraffine dans de petits moules à fond plat afin de construire des blocs, pour faciliter sa coupe en utilisant l'appareil à inclusion « Leica EG 1150 C » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu.

II.2.6.4. La réalisation des coupes histopathologique

Après l'étape d'inclusion, Les blocs de paraffine sont coupés en tranches minces de 4 à 5 µm grâce à un microtome « Leica RM 2125 RT ». Les coupes sont étalées sur des lames de verre et collées sur la lame par l'utilisation de gélatine liquide. Les lames sont ensuite placées dans un bain marie pour déparaffiner les coupes puis séchées dans une étuve à 60°C pendant 2 heures.

II.2.6.5. La coloration

Les coupes sont colorées par l'utilisation de la technique à l'Hématoxyline-Eosine selon les étapes suivantes:

- lavages des lames à l'eau du robinet puis rinçage à l'eau distillée.
- Les lames sont Immergées dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).

Matériel et Méthodes

- La différenciation des coupes dans 100 mL d'alcool éthylique à 70 % et 50 ml d'acide HCl puis lavages dans un bain d'eau du robinet
- Les lames sont plongées dans un bain d'eau ammoniacale à 2 % afin de Bleuir les coupes puis Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme).

Après séchage, le montage des lames a été ensuite effectué pour pouvoir les examiner à différents grossissements à l'aide du microscope optique muni d'un appareil photo intégré.

II.3.Effet des extraits de la plante *R.montana* sur la réversion de la résistance multiple à la DOX des lignées cellulaires A2780 DX3

II.3.1. préparation des concentrations des extraits

Différentes concentrations des extraits (40 mg/ml, 10 mg/ml, 2,5 mg/ml, 0,625 mg/ml) ont été préparées par dissolution dans le Diméthyl sulfoxyde (DMSO).

II.3.2. Les lignées cellulaires et le milieu de culture

Les lignées cellulaires de cancer humain utilisées dans cette expérimentation, nous ont gracieusement été offertes par le professeur Fabio Altieri du laboratoire de biochimie de l'université Sapeinza, Roma, Italie. Il s'agit de cellules d'adénocarcinome ovarien résistantes (A2780 DX3). Les lignées de cellules ont été cultivées en monocouches d'un maximum de 70%- 80% de confluence dans un milieu de RPMI 1640 complété avec 10% de FBS, 100 g/ml streptomycine, 100 IU / ml penicilline, 1mM pyruvate de sodium et 2 mM glutamine. Les cellules ont été maintenues à 37 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂ et de l'air humidifié.

II.3.3. Le test MTT pour la réversion de la résistance multiple a la DOX par les extraits de *R.montana*

Le test colorimétrique MTT (3[4,5- diméthylthiazol-2yl] -bromure de diphenyltétrazolium est utilisé pour tester la réversion de la résistance multiple à la DOX des cellules A2780 DX3 par les extraits de *R.montana* en présence et en absence de la DOX (Harshita et al., 2013). Le test MTT est un test de détection colorimétrique de l'activité de l'enzyme mitochondriale succinate dehydrogenase dans les cellules viable. Il est basé sur la réduction du «MTT» de couleur jaune en un précipité « formazan » violet insoluble dans l'eau (Figure 26).

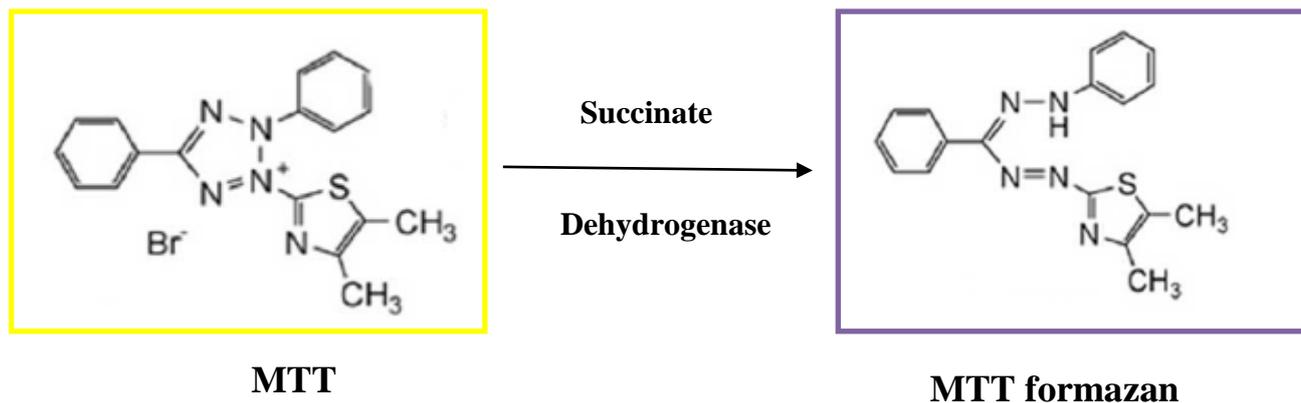


Figure 26 : Principe du test MTT

Les cellules ont été incubées dans des plaques de 96 puits à 5×10^3 cellules/ puits. Elles sont traitées par différentes concentrations de chaque extrait de *R. montana* (0.625, 2.5, 10, 40 mg/ml) avec $7 \mu\text{M}$ de la DOX (8 puits pour chaque concentrations) alors que le milieu de culture pour le contrôle est traité seulement par $7 \mu\text{M}$ de la DOX. Les cellules ont été incubées pendant 72 h. A la fin de la période de traitement, $100 \mu\text{l}$ de la solution de MTT (0,5 mg/ml) est ajouté dans chaque puits. Après 4 h d'incubations dans l'obscurité, le milieu de culture a été jeté et $100 \mu\text{l}$ de DMSO ont été ajouté à chaque puits pour dissoudre les cristaux de formazan.

Ce test d'évaluation de la prolifération cellulaire est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le MTT, de couleur jaune, en son métabolite le bleu de formazan (de couleur violette). L'absorbance dans chaque puits a été lue en utilisant un lecteur de microplaque ELISA à une longueur d'onde de 570 et 690 nm. Le facteur de réversion (FR) qui exprime le pouvoir de réversion multiple à la DOX a été calculé comme suit :

$$\text{FR} = \% \text{ des cellules vivantes pour contrôle} / \% \text{ des cellules vivantes en présence de différentes concentrations de l'extrait.}$$

II.4. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple, Les résultats ont été exprimés en moyenne avec son écart type ($n = 3$) pour chaque cas. L'évaluation statistique est effectuée en utilisant le test t de Student. La valeur trouvée par le calcul du t peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

($p > 0.05$) désigne un effet non significatif (ns).

($p \leq 0.05$) désigne un effet significatif (*)

($p \leq 0.01$) désigne un effet très significatif (**)

($p \leq 0.001$) désigne un effet hautement significatif (***)

L'ensemble des traitements statistiques est réalisé à l'aide du logiciel Minitab 16.

Résultats et discussion

RESULTATS ET DISCUSSION

Le présent travail porte sur l'effet de la plante médicinale: *R. montana* sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine et sur la réversion de la résistance des lignées cellulaire cancéreuses des ovaires humaine A2780 DX3.

I. Etude phytochimique et activité antioxydante des extraits de la plante médicinale *R.montana*

I.1. Rendement des extraits

L'extrait méthanolique de *R.montana* (EMRM) a été préparé à partir de la poudre de la partie aérienne de la plante. La préparation des extraits de *R. montana* a été effectuée par les solvants organiques à polarité croissante à partir d'extrait méthanolique; il s'agit de l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le butanol. Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts; L'extrait éther de pétrole (EEPRM), l'extrait acétate d'éthyle (EAERM) et l'extrait butanolique (EBRM). Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspects différents (**Tableau 8**). Le rendement est calculé par rapport au poids sec de la poudre végétale. Le résultat du rendement a été exprimé en pourcentage (%) (**Figure 27**).

Tableau 8: L'aspect et la couleur de différents extraits de *Ruta montana*

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Les extraits	Le poids des extraits en (g)	Aspect des extraits	Couleur des extraits
<i>R. Montana</i>	640	EMRM	342	Pâte collante	Noire
		EEPRM	15.04	Pâteux	vert foncé
		EAERM	03.55	Pâte collante	Verte foncée
		EBRM	25.14	Pâteux	Marron claire

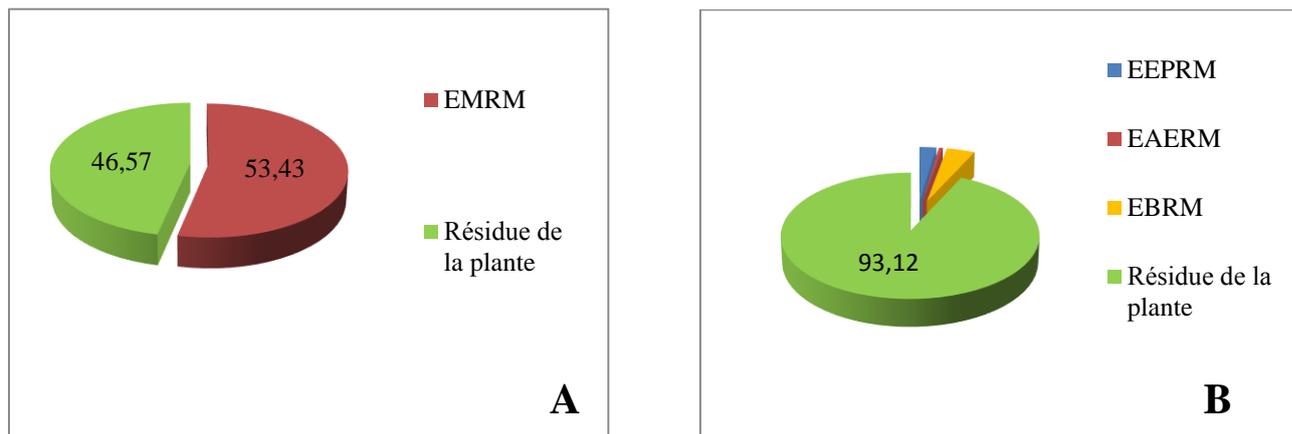


Figure 27 : Le pourcentage de rendement des extraits de *R. Montana* (A) L'extrait méthanolique, (B) les extraits des flavonoïdes

Les résultats obtenus montrent que le rendement de l'extrait méthanolique (**Figure 27A**) est de 53.43 % par rapport au poids sec de la poudre végétale. Cependant, le rendement des extraits issus de l'extrait méthanolique montre que l'extrait butanolique représente le rendement le plus élevé (03,92%) suivi de l'extrait éther de pétrole (02,35%) tandis que, le rendement le plus faible (0,55%) est obtenu par l'extrait d'acétate d'éthyle (**Figure 27B**).

Le bon rendement de l'extrait méthanolique est dû à l'utilisation du mélange hydroalcoolique (Eau /méthanol), effectivement l'eau et le méthanol sont les meilleurs solvants d'extraction selon (Jokić et al., 2010 ; Bonnaillie et al., 2012) et d'après (Moure et al., 2000; Arimboor & Arumughan, 2011) la présence d'eau augmente la perméabilité des tissus végétaux et favorise le phénomène de diffusion de masse dans l'étape d'extraction.

L'utilisation des solvants à polarités différentes permet de séparer les composés de la poudre de la partie aérienne selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction et donc permet de séparer les flavonoïdes selon leur degré de glycosylation (flavonoïdes aglycones, mono, di et triglycosylés) le **tableau 09** montre les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés.

Tableau 09 : Les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés

Extraits	Constituants probables	Références
Extrait méthanolique	flavonoïdes glycosylés et sulfatés, coumarines, aminoacides, terpènes, cires et tannins, alcaloïdes, acides phénoliques, et stéroïdes glycosylés.	(Newman et al., 1974 ; Markham et al., 1982)
Extrait éther de pétrole	Cires, chlorophylle, lipides, acides gras, stéroïdes, triterpènes, caroténoïdes, huiles essentielles, flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, coumarines.	(Ciulei, 1981)
Extrait acétate d'éthyle	les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés	(Newman et al., 1974 ; Markham et al., 1982)
Extrait butanolique	les flavonoïdes glycosylés	(Newman et al., 1974 ; Markham et al., 1982)

La macération est une méthode discontinue, le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée. De même, la phase aqueuse devrait être affrontée plusieurs fois par chaque solvant pour améliorer le rendement de l'extraction. Il est difficile de comparer les résultats obtenus dans cette étude avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est que relatif; il dépend de la méthode d'extraction (à chaud ou à froid), les conditions de séchage (lieu de séchage, la température et la durée de séchage), le stade de croissance et la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité (Lee et al., 2003; Fellah, 2006).

I.2. Les tests phytochimiques

Dans le but de rechercher les différentes classes des métabolites secondaires naturelles dans l'extrait méthanolique, nous avons effectué un screening phytochimique par la mise en place d'un ensemble des réactions de caractérisation de différents composés chimiques à savoir : les flavonoïdes, les saponines, les tanins, les alcaloïdes, les coumarines et les composés réducteurs. Les résultats correspondant au screening chimique de la plante *R. montana* sont présentés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique de *R. montana*

Les composés	EMRM
Tanins	+
Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3min	
Saponosides	±
Flavonoïdes	+
Apparition d'une couleur jaune	
Composés réducteurs	+
Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième en bleu-vert.	
Coumarines	+
Alcaloïdes sels	+
Résultat positif avec le réactif de Wagner (présence de turbidité)	

Les résultats sont interprétés comme suit: (+) Réaction positive, (±) Trace, (-) Réactions négatives

Les essais phytochimiques effectués sur l'EMRM ont révélé la présence des flavonoïdes, des saponosides, des tanins, des coumarines, des composés réducteurs, et des alcaloïdes sels. Ce qui est en accord avec les travaux de (Daoudi, 2016) qui a été révélé la présence des flavonoïdes, des tanins, des composées réducteurs, et des alcaloïdes chez *R.montana*. La richesse de cette plante en composés chimiques actifs confirme la large utilisation de la rue en pharmacopée traditionnelle. (Zellagui et al., 2012, Forment,1941).

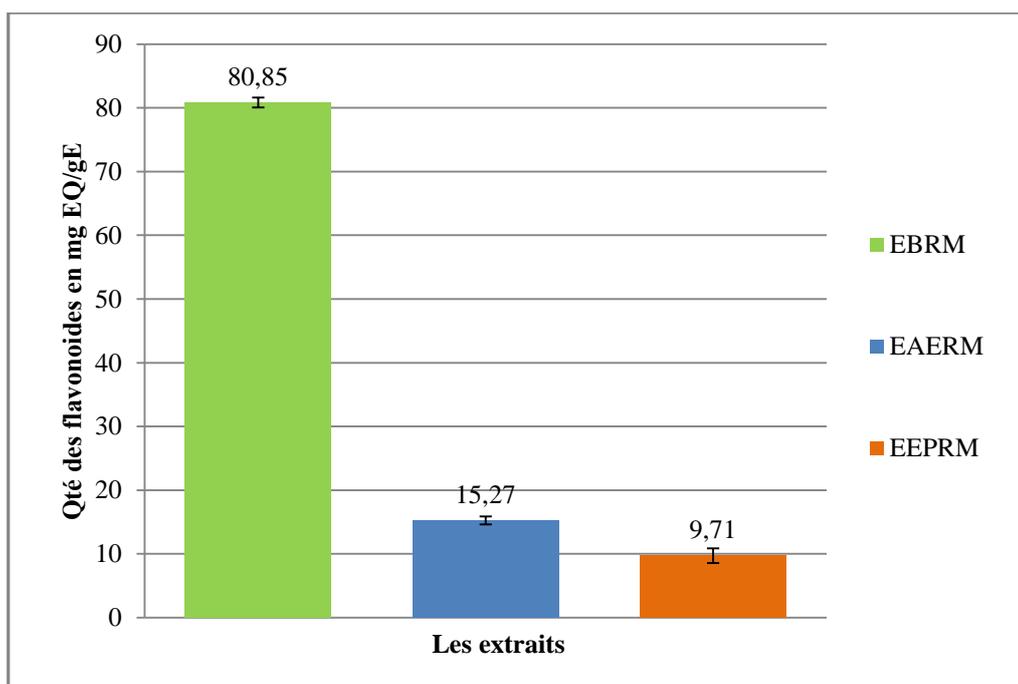
I.3. Etude quantitative

Afin de caractériser les extraits préparés à partir de la partie aérienne de *R.montana*, un dosage des flavonoïdes et des polyphénols totaux a été effectué. Le choix de quantifier les polyphénols parmi les différentes substances phytochimiques, résulte du fait que les polyphénols

ont des activités biologiques très importantes. De même pour les flavonoïdes qui sont considérés comme la classe la plus importante des polyphénols (Beta et al., 2005; Meddour, 2013).

I.3.1. Dosage des flavonoïdes

Les quantités des flavonoïdes des trois fractions issues d'extrait méthanolique sont présentées dans la **figure 28**.



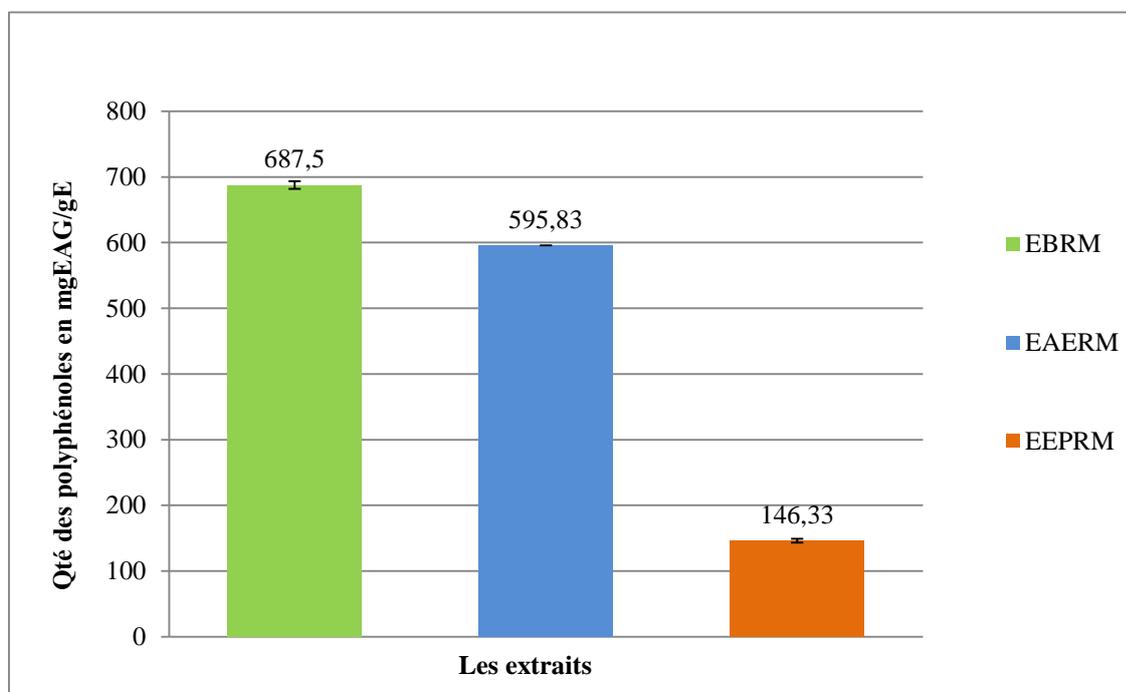
Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3)

Figure 28 : Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE) des fractions issues d'extrait brut méthanolique de *R.montana*.

Les résultats des teneurs en flavonoïdes, exprimés en mg équivalent quercétine par g extrait montrent que l'extrait butanolique est le plus riche en flavonoïdes (**Figure 28**) (80.85 ± 0.78 mgEQ/gE) suivie par l'extrait acétate d'éthyle (15.27 ± 0.62 mgEQ/gE) alors que L'extrait éther de pétrole représente la teneur la plus faible (9.71 ± 1.13 mgEQ/gE).

I.3.2. Dosage des polyphénols totaux

La quantité des polyphénols a été rapportée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de poids sec de l'extrait (mg EAG / g E). Les résultats sont représentés dans la figure 29.



Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3)

Figure 29 : Teneur des polyphénols totaux (mg EAG/gE) des fractions issues d'extrait brut méthanolique de *R.montana*.

Les résultats de dosage de polyphénols révèlent que les extraits butanolique et acétate d'éthyle contiennent respectivement 687.5 mg et 595.83 mg EAG/g E. Alors que l'extrait éther de pétrole contient le contenu phénolique le plus faible avec une concentration de 146.33 mg EAG/gE.

Les résultats de l'étude quantitative montrent que la proportion en polyphénols est nettement supérieure à celle des flavonoïdes, ceci suggère que les polyphénols présents ne sont pas tous des flavonoïdes, il peut y avoir présence d'autres polyphénols tels que les tanins ainsi que les coumarines qui ont été mis en évidence dans le screening phytochimique.

La teneur phénolique d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs tels que, les conditions climatiques des endroits où elles poussent (température élevée, grande exposition au

soleil, la sécheresse et la salinité qui stimule la biosynthèse des métabolites secondaires, notamment les polyphénols), le moment de la récolte, le solvant d'extraction et les conditions de stockage (Podsdek, 2007; Falleh et al., 2008).

I.4. Résultats de l'étude qualitative -Chromatographie sur couche mince-

L'analyse qualitative du contenu phénolique par l'utilisation de CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques des différentes phases issues d'extrait brut méthanolique de la plante *R.montana*. L'identification des composés était basée sur la comparaison des Rfs et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur CCM.

I.4.1. Composés identifiés dans l'extrait éther de pétrole

Nous avons réalisé la séparation de la fraction éther de pétrole avec les systèmes de solvant suivant: Chloroforme/Méthanol (96/4) et Acétate d'éthyle/Ether de pétrole 20/80. Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 30** et le **tableau 11**.

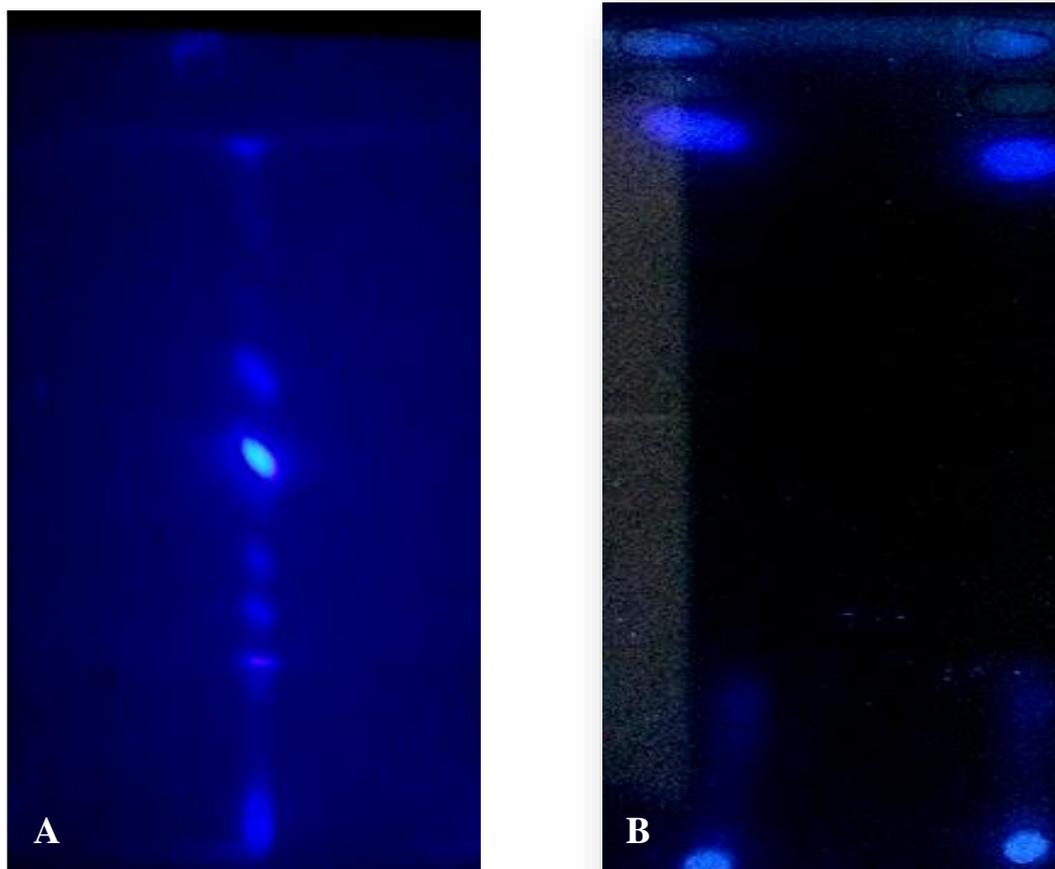


Figure 30 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse EEPRM par CCM sur gel de silice par les systèmes de solvant ; A: Chloroforme/Méthanol (96/4) et B: Acétate d'éthyle/Ether de pétrole 20/80

Résultats et Discussion

Tableau 11 : Résultat de la CCM EEPRM par les systèmes de solvant: Chloroforme/Méthanol (96/4) et Acétate d'éthyle/Ether de pétrole 20/80

Les systèmes de solvant	N ° de spots	Couleur sous UV 365 (nm)	Rf (cm)
Chloroforme/Méthanol (96/4)	1	Mauve	0.05
	2	Violet	0.08
	3	Violet	0.19
	4	Jaune verdâtre	0.21
	5	blanc fluorescent	0.23
	6	Mauve	0.29
	7	violet	0.36
	8	blanc fluorescent	0.49
	9	Bleu fluorescent	0.60
	10	Jaune fluorescent	0.78
Acétate d'éthyle/Ether de pétrole 20/80	1	blanc fluorescent	0.17
	2	violet	0.77
	3	jaune fluorescent	0.89
	4	Bleu fluorescent	0.96

I.4.2. Composés identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle

La séparation des flavonoïdes de EAERM est effectuée par l'utilisation des systèmes Toluène /Acétate d'éthyle- Méthanol (5/3/1) et acétate d'éthyle/Ether de pétrole (20/80). Les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 31** et le **tableau 12**.

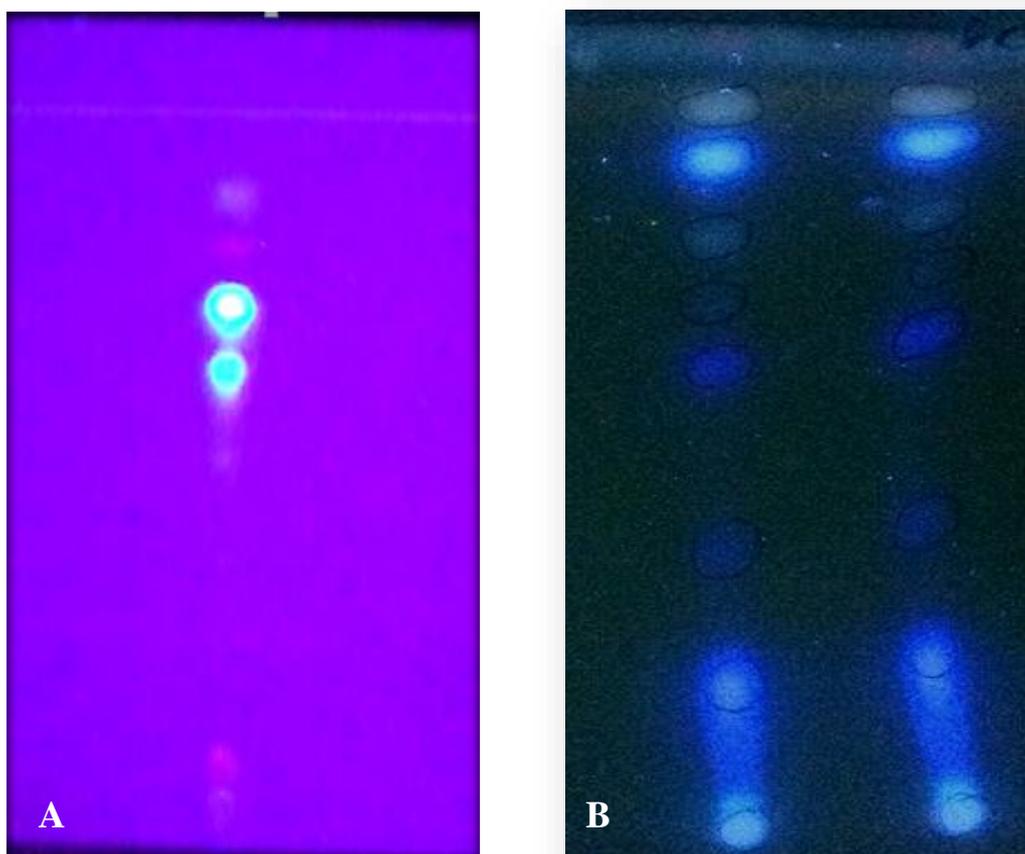


Figure 31 : Photo de chromatogramme résultant de l'analyse EAERM par CCM par les systèmes de solvant ; A : Toluène /Acétate d'éthyle- Méthanol (5/3/1) et B Acétate d'éthyle/Ether de pétrole (20/80).

Résultats et Discussion

Tableau 12 : Résultat de la CCM de EAERM par les systèmes de solvant : Toluène /Acétate d'éthyle/ Méthanol (5/3/1) et Acétate d'éthyle/Ether de pétrole 20/80.

Les systèmes de solvant	N ° de spots	Couleur sous UV 365 (nm)	Rf (cm)
Toluène /Acétate d'éthyle- Méthanol (5/3/1)	1	Violet	0.07
	2	jaune fluorescent	0.48
	3	violet	0.55
	4	Mauve	0.59
	5	Bleu fluorescent	0.66
	6	blanc fluorescent	0.69
	7	violet	0.75
	8	jaune verdâtre	0.82
Acétate d'éthyle/Ether de pétrole 20/80	1	Bleu fluorescent	0.20
	2	Mauve	0.37
	3	violet	0.61
	4	Bleu fluorescent	0.69
	5	blanc fluorescent	0.76
	6	Bleu vif	0.85
	7	jaune verdâtre	0.91

I.4.3. Composés identifiés dans l'extrait butanolique

La migration des flavonoides de la fraction butanolique est effectuée par l'utilisation du système : Chloroforme/ MEO/H₂O (65/45/12), les résultats obtenus sont représentés dans la **figure 32** et le **tableau 13**.

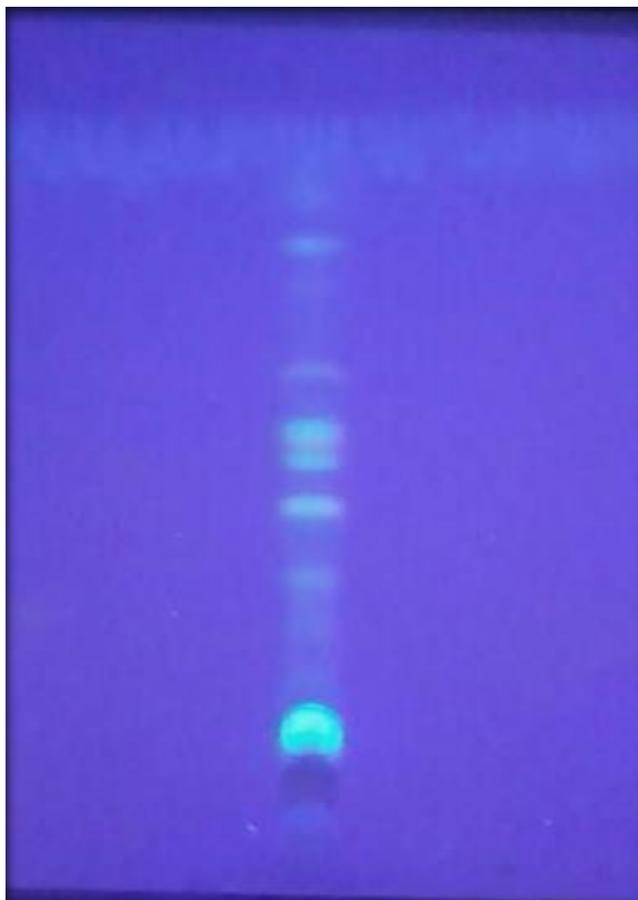


Figure 32: Photo de chromatogramme résultant de l'analyse de l'EBRM par CCM par le système solvant : Chloroforme/ MEO/H₂O (65/45/12)

Tableau 13 : Résultat de la CCM de l'EBRM. Système solvant : Chloroforme/ Méthanol /H₂O
(65/45/12)

N ° de spots	Couleur sous UV 365 (nm)	Rf (cm)
1	Bleu fluorescent	0.15
2	violet	0.22
3	violet	0.27
4	Mauve	0.34
5	violet	0.40
6	Mauve	0.43
7	blanc fluorescent	0.48
8	Mauve	0.51
9	Bleu fluorescent	0.53
10	violet foncé	0.56
11	Mauve	0.6
12	violet foncé	0.63
13	violet foncé	0.67
14	Mauve	0.71
15	blanc fluorescent	0.75
16	Bleu	0.82

Les **tableaux 11, 12 et 13** comportent les Rfs des différents composés apparus avec les différents systèmes solvants utilisés, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV pour les trois extraits. Un ensemble des spots a été obtenu par les différents systèmes solvants pour les trois extraits, avec plus de composés pour l'extrait butanolique (seize composés). Dix composés ont été ségrégués des dépôts de la fraction éther de pétrole par le système de solvant Chloroforme/Méthanol, par contre le second système (acétate d'éthyle/Ether de pétrole) n'a pu

Résultats et Discussion

séparer que quatre composés, alors que pour l'extrait acétate d'éthyle les deux systèmes (Toluène /Acétate d'éthyle- Méthanol (5/3/1) et Acétate d'éthyle/Ether de pétrole (20/80) ont donné presque le même nombre de spots (huit et sept spots) respectivement.

La CCM nous a permis de contrôler la qualité des différents extraits, même si elle n'est pas suffisante pour identifier un constituant précis, elle nous a permis d'obtenir des renseignements utiles sur les éléments constitutifs de nos extraits (fluorescence, coloration, facteur de rétention...). Selon Markham (Markham, 1982) la plupart des flavonoïdes ne sont pas visibles sur le gel de chromatographie (cellulose) après leur migration, à l'exception des anthocyanines qui apparaissent en spots orange et les chalcones, aurones et 6-hydroxyflavonols qui apparaissent en jaune. Pour cette raison, les chromatogrammes doivent être visionnés sous lumière UV, et les flavonoïdes deviennent visibles (fluorescents) sous cette lumière (Markham, 1982 ; Hamlat, 2006).

Tableau 14 : Interprétation des couleurs des spots en différentes classes de flavonoïdes

Couleur des spots sous lumière UV	Type de flavonoïde selon (Markham, 1982)
Violet et violet foncé	Typique pour les flavones et flavonols glycosides (hétérosides)
Fluorescence bleue	Caractéristique des acides phénols
Fluorescence blanche	Isoflavones
Jaune orangé	Flavonols avec 3-OH libre (etdihydroflavonols)
Fluorescence jaune	-Flavonols-Aurones et quelques 2-, 4-OHchalcones
Jaune verdâtre, bleu verdâtre ou vert	-Flavonols avec 3-OH libre -Flavonones ou aurones
Orange, rouge ou mauve	Anthocyanidin 3-glycosides
Rose	La plupart des 3-5 diglycosides

En se basant sur cette littérature et selon les couleurs des spots obtenues sur les chromatogrammes des trois extraits (**Tableaux 11, 12 et 13**), on peut dire que: Pour les trois extraits, on a pu suspecter la présence des anthocyanidin 3-glycosides, flavones et flavonols glycosides (hétérosides), flavonols avec 3-OH libre, flavonones ou aurones, isoflavones, des acides phénols, flavonols et 4-OH chalcones.

I.5. Détermination de l'activité antioxydante des extraits de *R. montana* par la méthode de DPPH• (effet scavenger)

Puisque le principal mécanisme d'action antioxydante des polyphénols des végétaux est le piégeage des radicaux libres, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des végétaux par le piégeage de radicaux libres synthétiques en solution dans des solvants polaires comme le méthanol à température ambiante. Les radicaux les plus fréquemment utilisés incluent le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzoline-6-sulphonique) (ABTS).

Dans cette étude, la méthode par le DPPH• a été choisie pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de nos plantes parce qu'elle est l'une des méthodes les plus simple, les plus rapide et les plus efficace à cause de la grande stabilité du radical DPPH• (Bozin, et al., 2008; Yi et al., 2008; Nur Alam et al., 2013).

Dans le test de DPPH•, la cinétique de décoloration de ce radical a été suivie à 517 nm qui est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal comme le montre l'équation suivante.



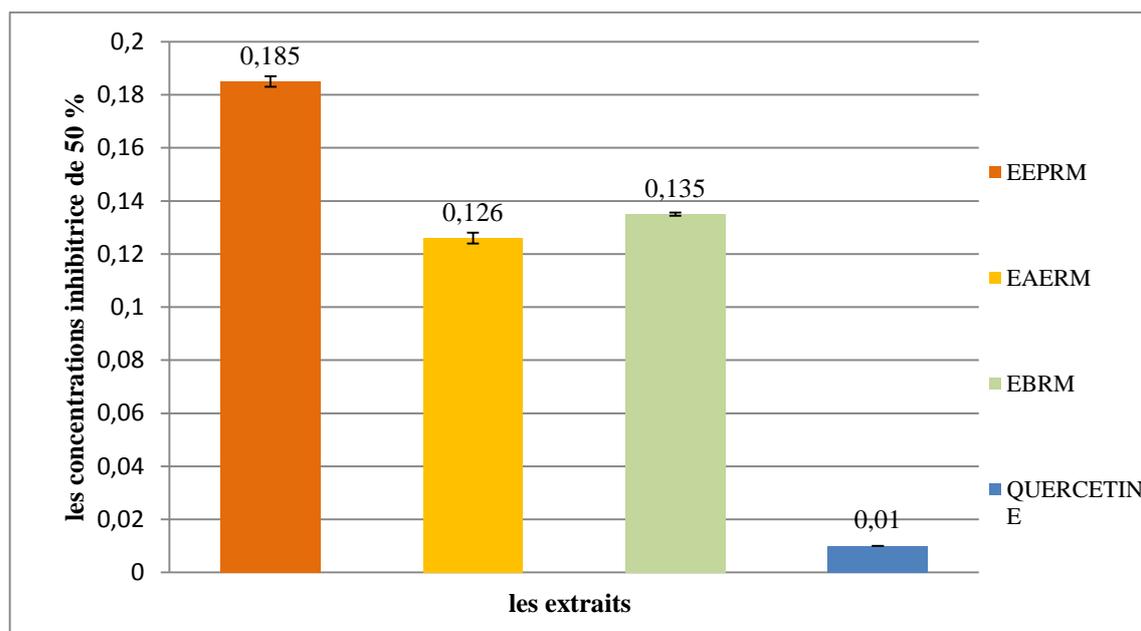
Le DPPH• présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydants donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire. Pour des fins comparatives la quercétine est utilisée comme un antioxydant standard.

Les résultats de l'activité antioxydante exercée sur le radical libre DPPH• par les extraits de *R. montana* sont exprimés par le paramètre IC₅₀ (**Figure 33**). ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH• (IC₅₀), Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé (Brand-Williams et al., 1995; Atoui et al., 2005). Les résultats de cette activité sont figurés dans le **tableau 15** et la **figure 33**.

Tableau 15 : Les pourcentages de réduction du radical DPPH• par les extraits de *R.montana*

Les concentrations		Les % de réduction			
Concentrations initiales en (mg/ml)	Concentrions dans le mélange réactionnel en (mg/ml)	EEPRM	EAERM	EBRM	Qurecetine
40	0.4	88,83±0.13	/	93.19±0.11	-
30	0.3	89,61±1.29	90.80±0.59	92.33±0.09	-
20	0.2	59,82±0.69	81.35±1.43	91.28±0.19	-
10	0.1	34.63±0.71	56.28±2.42	72.88±0.88	-
5	0.05	18.18±0.15	37.04±1.83	46.50±1.47	95.89±0.19
3	0.03	10.99±0.80	23.54±2.53	33.24±0.58	95.75±0.05
2	0.02	08.70±0.57	20.75±5.13	15.20±0.65	95.94±0.19
1	0.01	04.03±0.82	13.10±1.35	08.34±0.79	95.94±0.05
0.5	0.005	1.95±0.35	09.24±0.41	02.80±0.23	95.96±0.22
0.250	0.0025	1.13±1.48	5.10±0.53	01.60±0.44	95.01±0.43
0.125	0.00012	/	3.57±0.31	0.061±0.51	46.43±2.43
0.1	0.0001	/	3.03±1.33	/	-

L'EAERM possède l'effet scavenger le plus puissant parmi les trois extraits avec une valeur de $IC_{50} = 0.126 \pm 0.002$ mg/ ml, suivi par l'EBRM (IC_{50} de 0.135 ± 0.0006 mg/ ml) et enfin l'EEPRM qui est le plus faible parmi ces extraits avec une IC_{50} d'environ 0.185 ± 0.002 mg/ ml. Comparant avec la quercetine les extraits EAERM, EBRM et EEPRM ont un effet scavenger inférieur de 13, 14 et 19 fois, respectivement.



Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Figure 33 : Les concentrations des extraits de *R. montana* qui inhibent 50 % du radical DPPH*.

La teneur en polyphénols totaux des extraits de *R. montana* est corrélée ($R^2 = 0.912$) avec leurs activités antiradicalaires. L'activité anti-radicalaire des extraits est donc relativement dépendante de la teneur en polyphénols totaux. Par exemple EBRM et EAERM, qui représentent les fractions les plus riches en polyphénols (687.5 et 595.83mg EAG /g extrait respectivement), possèdent l'effet scavenger le plus puissant ($IC_{50} = 0.135$ et 0.126) par rapport à l'EEPRM qui contient le contenu phénolique le plus faible (146.33 mg EAG/g E) et représente l'effet scavenger le plus faible ($IC_{50} = 0.185$ mg/ml). Ce qui confirme que les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules.

Ces résultats sont conformes à ceux de plusieurs auteurs qui ont rapportés une telle corrélation positive entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante (Makris et al., 2007; Hua et al., 2008 ; Angelov et al., 2008; Berrin et al., 2008). En effet (Falleh et al., 2008) a montré que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration des polyphénols, mais également de la nature et la structure des antioxydants dans l'extrait. Généralement, les polyphénols ayant un nombre élevé des groupements hydroxyles présentent une activité antioxydante très importante (Heim et al., 2002; Torres et al., 2007).

L'effet scavenger des composés phénoliques sur les radicaux libres dépend de la présence d'un ou plusieurs groupes hydroxyles (OH) libres, fixés sur un cycle benzénique. Il est

généralement admis que les composés phénoliques peuvent agir comme des antioxydants par leur capacité de piégeage des radicaux libres, ils brisent la chaîne de ces derniers grâce à leur effet donneur d'atome d'hydrogène (Simić et al., 2007; Heim et al., 2002).

II. Etude de l'effet préventif de l'EAERM sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine

➤ RESULTATS

II. 1. Le dosage plasmatique des enzymes CKMB, LDH, ALAT et ASAT

Les résultats de l'effet de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante médicinale *R. montana* (100 mg/kg p.o. pendant 15 jours) sur l'activité des enzymes plasmatiques (CKMB, ASAT, ALAT et LDH) 48 heures après la fin du traitement des animaux par la DOX (15 mg/kg i.p) sont rassemblés dans les **figures 34, 35, 36 et 37**.

II.1. 1. Dosage de l'activité de CKMB

La **figure 34** met en évidence l'effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R. montana* sur l'activité de l'enzyme CKMB chez des rats traités par la DOX.

Nos résultats révèlent que le traitement des rats par la DOX (15 mg/kg) induit une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de l'activité de CKMB (3870.5 ± 113.73 UI/L) par rapport aux rats du lot témoins (2831 ± 467.65 UI/l). En effet nous constatons que pour les rats prétraités par l'extrait acétate d'éthyle 100 mg/kg pendant 15 jours puis traités par la DOX l'activité de CKMB est diminuée (2950.25 ± 453.92 UI/l) d'une façon significative ($p \leq 0.05$) comparée avec celle des rats traités par la DOX.

Par contre l'activité de CKMB chez les rats traités par l'extrait acétate d'éthyle (2614.75 ± 204.73 UI/l) présente une baisse non significative ($p > 0.05$) comparés avec les rats du lot témoin.

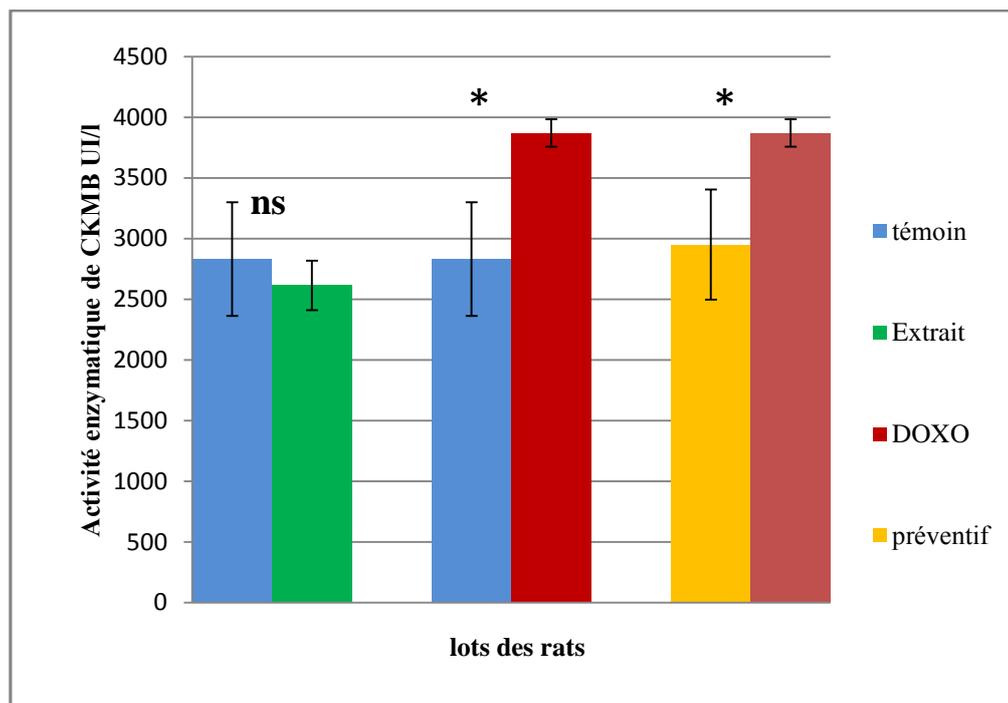


Figure 34: Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R. montana* (100 mg/kg p.o. pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de CKMB chez des rats wistar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype, $n=6$ rats dans chaque lot. Les résultats du lots extrait et DOX sont comparés avec ceux du lot témoin puis les résultats du lot DOX sont comparés avec ceux du lot préventif; (ns) désigne un effet non significatif ($p \geq 0.05$); (*) désigne un effet significatif ($p \leq 0.05$).

II. 1.2. Dosage de l'activité de LDH

L'effet de l'extrait acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante médicinale *R. montana* sur l'activité de l'enzyme plasmatique LDH 48 heures après la fin du traitement des rats par la DOX (15 mg/kg i.p) est représenté dans la **figure 35**.

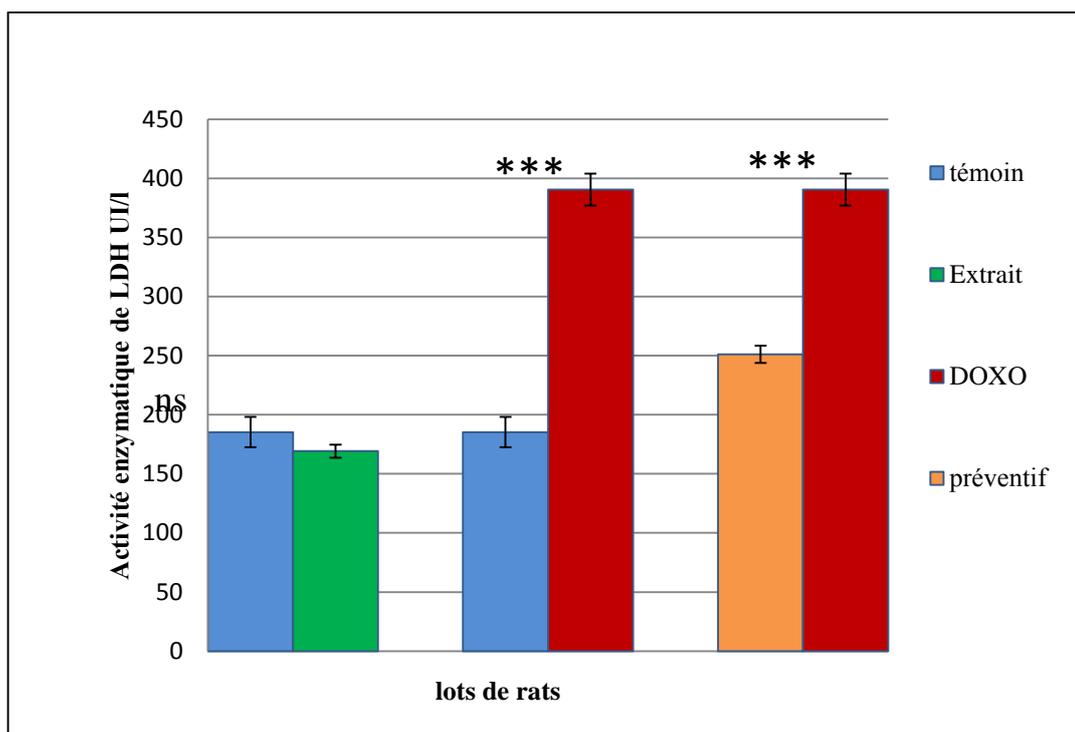


Figure 35 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R.montana* (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de LDH chez des rats wistar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. Test ANOVA : $n=6$ rats dans chaque lot. Les résultats du lots extrait et DOX sont comparés avec ceux du lot témoin puis les résultats du lot DOX sont comparés avec ceux du lot préventif ; (ns) désigne un effet non significatif ($p \geq 0.05$); (***) désigne un effet hautement significatif ($p \leq 0.001$)

Sur la figure ci -dessus on constate une élévation hautement significative ($p \leq 0.001$) du niveau plasmatique de LDH chez les rats traités par la DOX (390.5 ± 13.4 UI/ml) contre (185.3 ± 12.9 UI/ml) pour les rats du groupe témoin. Par ailleurs, le prétraitement des animaux par l'extrait acétate d'éthyle (100 mg/kg) associés avec la DOX montrent une diminution hautement significative ($p \leq 0.001$) de la teneur plasmatique de l'enzyme (251.1 ± 7.2 UI/ml) comparés au groupe DOX. Par contre, nous avons remarqué une élévation de l'activité de LDH chez les animaux prétraités par l'extrait acétate d'éthyle par rapport au groupe témoin, mais d'une manière non significative ($p \geq 0.05$). En effet, l'activité de LDH diminue d'une façon non significative ($p > 0.05$) chez les rats du lot extrait (169.2 ± 5.6 UI/ml) par rapport au lot témoin.

II.1.3. Dosage de l'activité de l'ALAT

Les résultats de la figure ci-dessous (**Figure 36**) montrent que l'administration de la DOX (15 mg/kg) provoque une augmentation hautement significative ($p \leq 0.001$) de la teneur plasmatique de l'enzyme ALAT chez les rats du lot DOX (180 ± 4.08 UI/l) comparés aux rats du lot témoin (68 ± 8 UI/l), tandis que l'activité enzymatique de l'ALAT presque reste la même ($p \geq 0.05$) aussi bien chez les animaux traités par 100 mg/kg de l'extrait acétate d'éthyle (65 ± 1.15 UI/l) que chez les animaux témoins. Cependant l'activité de l'ALAT chez les animaux du lot préventif (141.75 ± 6.13 UI/l) montre une diminution hautement significative ($p \leq 0.001$) comparés aux animaux du lot DOX. Néanmoins, on remarque l'élévation non significative ($p \geq 0.05$) de cette activité chez les rats prétraité par l'extrait par rapport aux rats témoins.

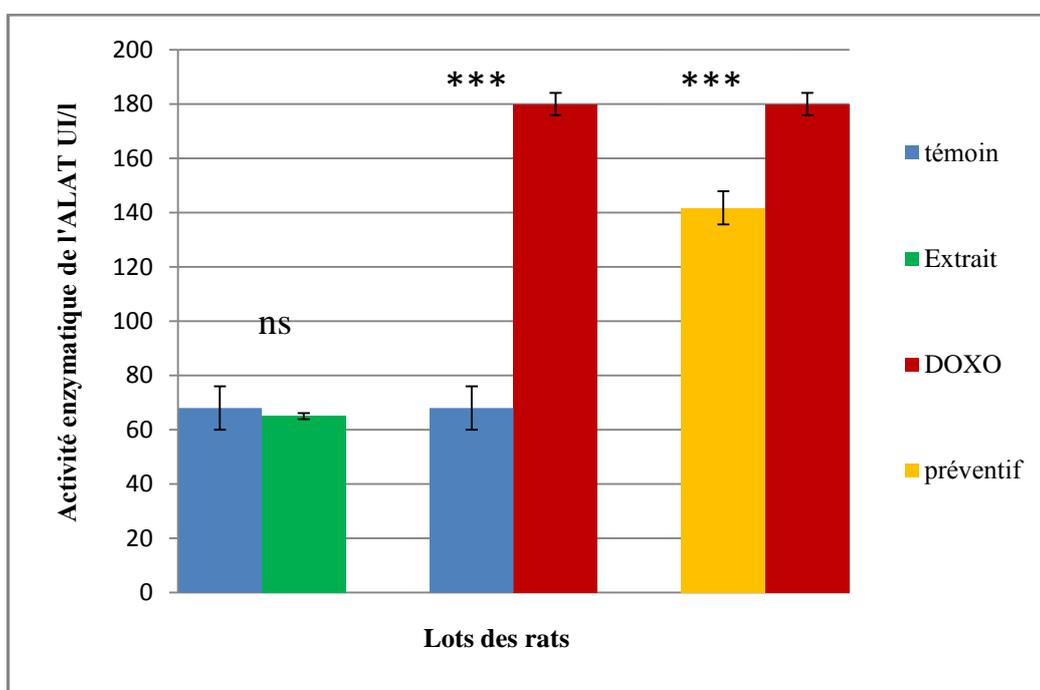


Figure 36 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R.montana* (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de l'ALAT chez des rats wistar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype, $n=6$ rats dans chaque lot. Test ANOVA Les résultats du lots extrait et DOX sont comparés avec ceux du lot témoin puis les résultats du lot DOX sont comparés avec ceux du lot préventif ; (ns) désigne un effet non significatif ($p \geq 0.05$); (***) désigne un effet hautement significatif ($p \leq 0.001$)

II.1. 4. Dosage de l'activité de l'ASAT

Les variations des activités de l'ASAT plasmatique 48 heures après la fin du traitement des rats des quatre lots, sont regroupées par la **figure 37**.

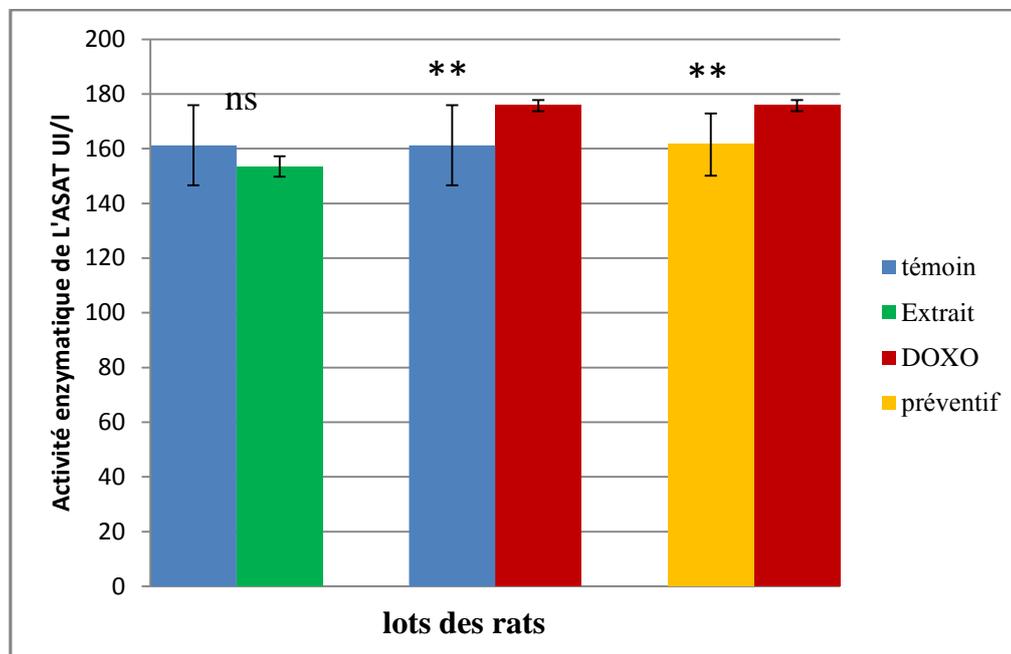


Figure 37: Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R.montana* (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de l'ASAT chez des rats wistar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. $n=6$ rats dans chaque lot. Les résultats du lots extrait et DOX sont comparés avec ceux du lot témoin puis les résultats du lot DOX sont comparés avec ceux du lot préventif ; (ns) désigne un effet non significatif ($p \geq 0.05$) ; (**) désigne un effet très significatif ($p \leq 0.01$)

Nous constatons d'après les résultats obtenus dans la **figure 37** qu'il y a une réduction très significative ($p < 0.01$) de l'activité plasmatique de l'ASAT (161.5 ± 11.35 UI/l) chez les rats du lot préventif par rapport aux rats traités par la DOX seul (175.75 ± 2.06 UI/l). Ainsi, l'activité de l'ASAT du lot préventif augmente d'une façon non significative ($p \geq 0.05$) comparée avec celle des rats du lot témoin (161.25 ± 14.63 UI/l). Par ailleurs, comparés avec les rats du lot témoin, les rats traités par la DOX présentent une augmentation très significative ($p < 0.01$) de l'activité de l'ASAT, tandis que cette activité diminue d'une façon non significative ($p \geq 0.05$) chez les rats traités par l'extrait acétate d'éthyle (153.5 ± 3.69 UI/l) comparée aux rats témoins.

II.2. Effet de l'EAERM sur le taux des biomarqueurs de stress oxydant dans le tissu cardiaque

II.2.1. Variation des concentrations en molonydialdéhyde (MDA)

Le dosage de l'MDA permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur le plus utilisé pour déterminer le stress oxydatif. La **figure 38** met en évidence les variations du niveau de production du MDA cytosolique cardiaque 48 heures après la fin du traitement des rats des quatre lots.

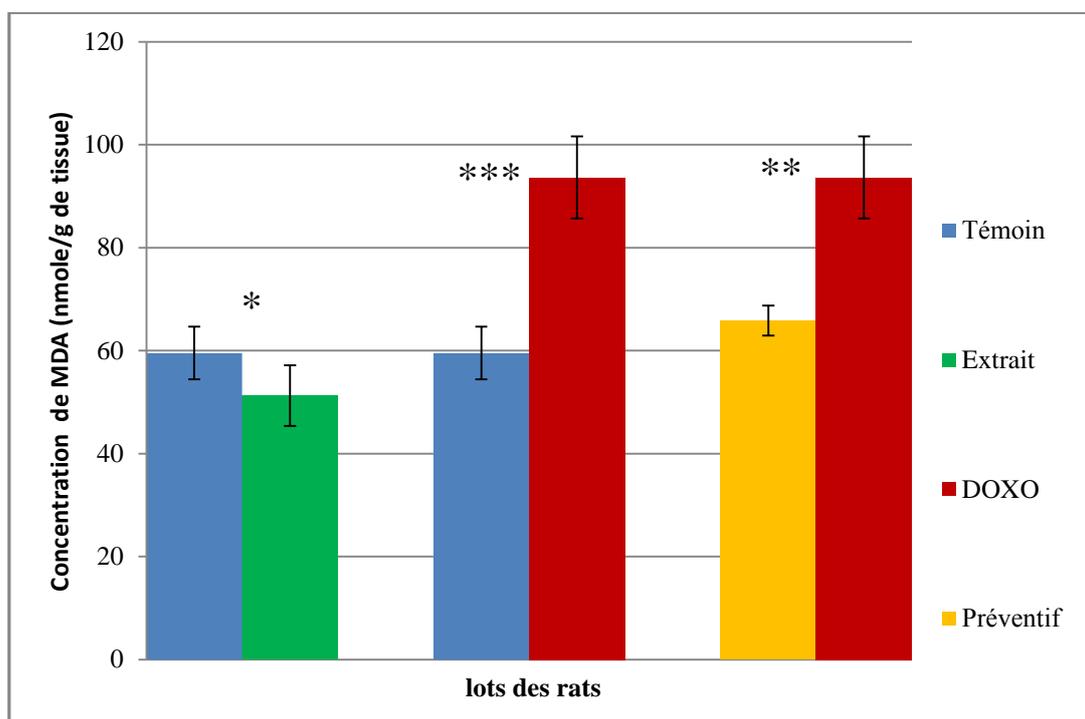


Figure 38 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R.montana* (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur le taux du MDA cytosolique cardiaque chez des rats wistar traités par la doxorubicine (15 mg/kg i.p).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. Test ANOVA, $n=6$ rats dans chaque lot. Les résultats du lots extrait et DOX sont comparés avec ceux du lot témoin puis les résultats du lot DOX sont comparés avec ceux du lot préventif; (*) désigne un effet significatif ($p \leq 0.05$); (**) désigne un effet très significatif ($p \leq 0.01$); (***) désigne un effet hautement significatif ($p \leq 0.001$)

Les résultats montrent une augmentation hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux du MDA chez les rats traités par la DOX (93.65 ± 7.96 nmole/g tissu) par rapport aux rats du lot témoins (59.52 ± 5.12 nmole/g de tissu). En effet nous constatons que le taux de l'MDA était très significativement ($p \leq 0.01$) diminué chez les rats du lot prétraités par l'extrait acétate

Résultats et Discussion

d'éthyle (65.83 ± 2.92 nmole/g tissu) par comparaison au lot DOX (93.65 ± 7.96 nmole/g tissu). Toutefois, la concentration du MDA chez les rats traités par l'extrait acétate d'éthyle montre une diminution significative ($p \leq 0.01$) comparés aux rats du lot témoin.

II.2.2. Variation des taux cardiaque en glutathion réduit GSH

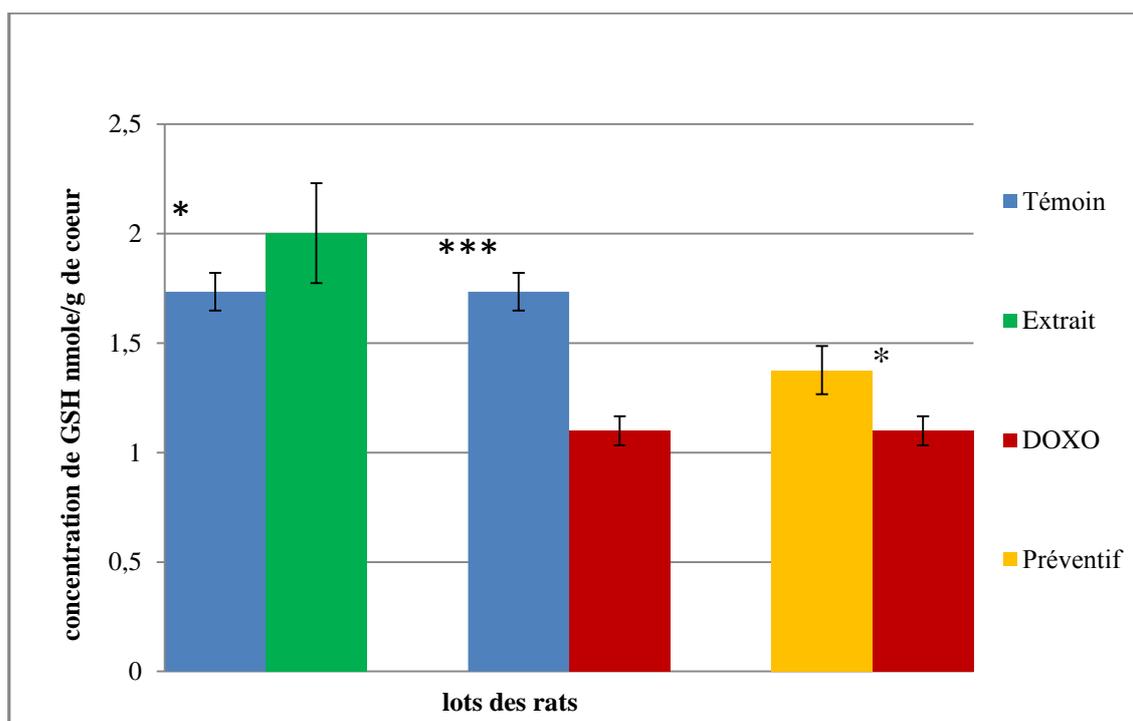


Figure 39 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R.montana* (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur le taux du GSH cytosolique cardiaque chez des rats wistar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype Test ANOVA , $n=6$ rats dans chaque lot. Les résultats du lots extrait et DOX sont comparés avec ceux du lot témoin puis les résultats du lot DOX sont comparés avec ceux du lot préventif ; (*) désigne un effet significatif ($p \leq 0.05$); (***) désigne un effet hautement significatif ($p \leq 0.001$).

Le dosage de la forme réduite du glutathion tissulaire a montré qu'il a subit une baisse hautement significatif ($p \leq 0.001$) au niveau du cœur, chez les rats traités par la DOX (1.09 ± 0.06 $\mu\text{mol/g}$ tissu) par rapport aux rats témoins (1.73 ± 0.08 $\mu\text{mol/g}$ tissu) (Figure 45). Le traitement des rats avec l'extrait acétate d'éthyle a significativement ($p \leq 0.05$) augmenté le taux de GSH (2.003 ± 0.22 $\mu\text{mol/g}$ tissu) au niveau du cœur par rapport au lot témoin (1.73 ± 0.08 $\mu\text{mol/g}$

tissue). Cependant les rats du lot préventif présentent une augmentation significative ($p \leq 0.05$) de la concentration du GSH ($1.37 \pm 0.11 \mu\text{mol/g}$ tissu) comparés aux rats du lot DOX.

II.3. Effet de l'EAERM sur l'activité des enzymes antioxydants cardiaque

II.3.1. Dosage de l'activité enzymatique du catalase

La **figure 40** montre l'activité enzymatique du catalase, au niveau du cœur des rats des différents lots.

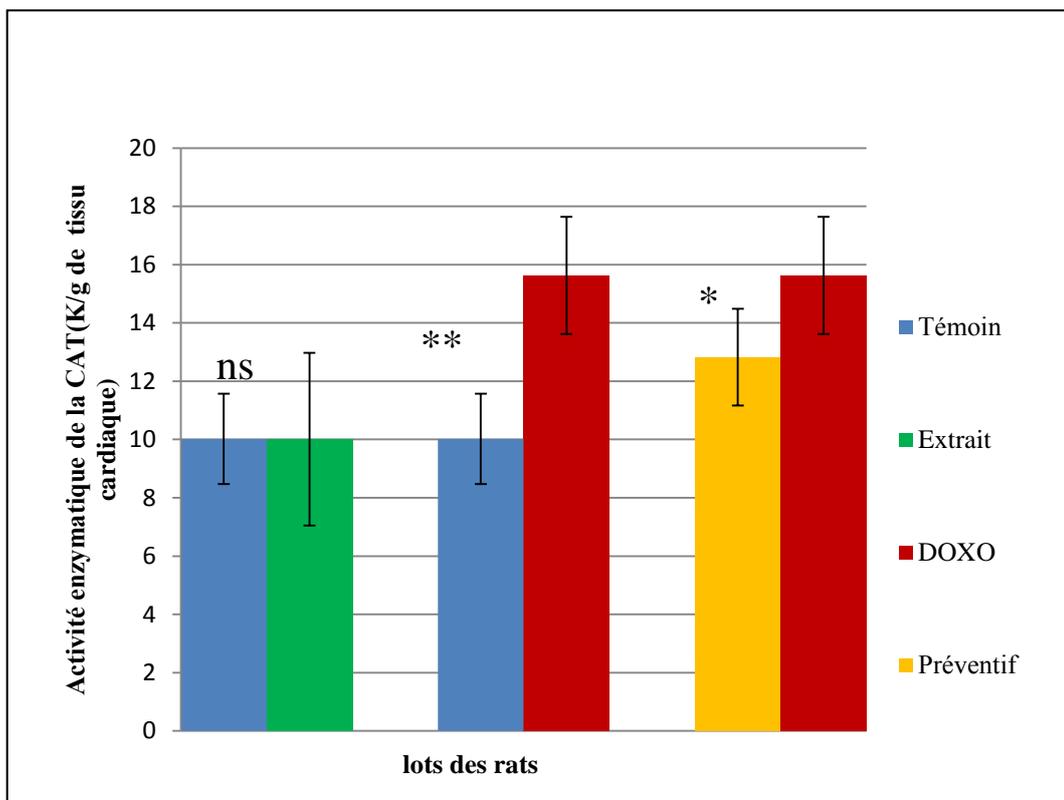


Figure 40: Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R. montana* (100 mg/kg p.o. pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de la CAT chez des rats wistar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).

Les résultats du lots extrait et DOX sont comparés avec ceux du lot témoin puis les résultats du lot DOX sont comparés avec ceux du lot préventif ; (*) désigne un effet significatif ($p \leq 0.05$) ; (**) désigne un effet très significatif ($p \leq 0.01$) ; désigne un effet non significatif ($p > 0.05$).

Résultats et Discussion

Nous avons constaté une augmentation très significative ($p \leq 0.01$) de l'activité de la catalase chez les rats de lot DOX (15.63 ± 0.01 K/g de tissu) par rapport à celles de lot témoins (10.02 ± 1.55 K/g de tissu). D'une autre part, l'activité de la CAT chez les rats traités par l'extrait acétate d'éthyle ne montre pas de changement par comparaison au groupe témoins. Par ailleurs nous avons constaté une réduction significative ($p \leq 0.01$) de l'activité de la CAT chez les rats prétraités par l'extrait acétate d'éthyle ($12,83 \pm 1,66$ K/g de tissu) par comparaison aux rats traités par la DOX.

II.3.2. Dosage de l'activité enzymatique du Glutathion- S-transférase (GST)

L'activité de GST cytosolique cardiaque mesurées chez les rats des quatre lots, sont représentées par la **figure 41**.

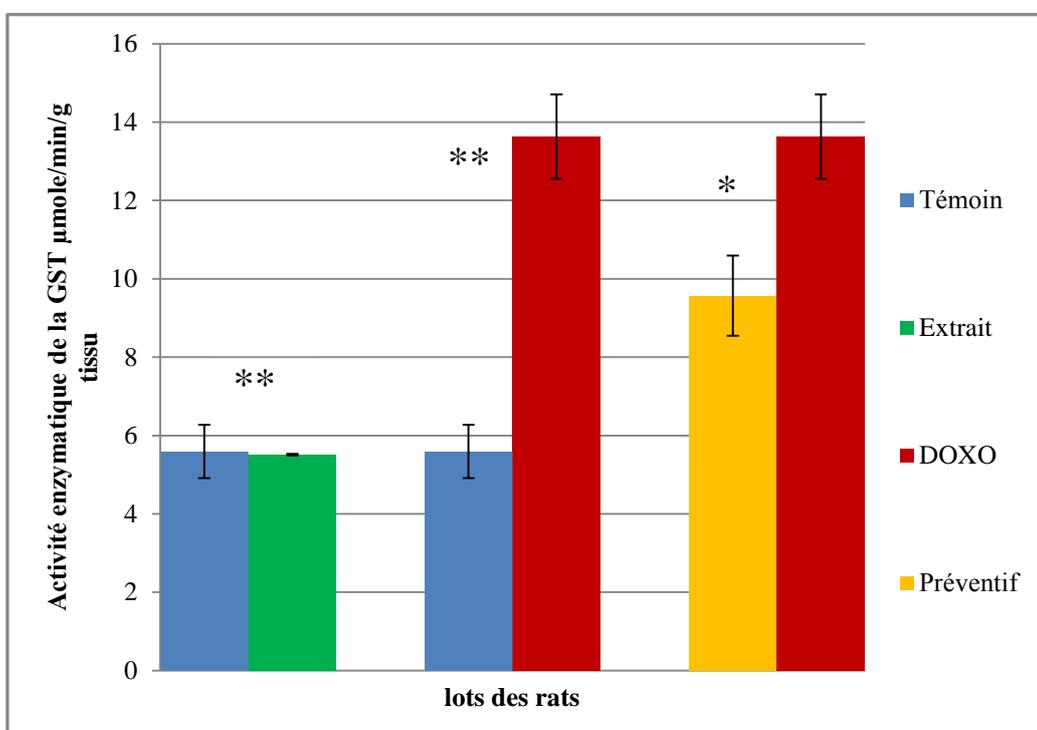


Figure 41: Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *R.montana* (100 mg/kg p.o.pendant 15 jours) sur l'activité enzymatique de la GST chez des rats wistar traités par la DOX (15 mg/kg i.p).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. Test ANOVA ; $n=6$ rats dans chaque lot. Les résultats du lots extrait et DOX sont comparés avec ceux du lot témoin puis les résultats du lot DOX sont comparés avec ceux du lot préventif ; (*) désigne un effet significatif ($p \leq 0.05$); (**) désigne un effet très significatif ($p \leq 0.01$).

Les résultats ci-dessus montrent clairement que le traitement des rats par la DOX seule (15mg/kg i.p) a causé une augmentation très significative ($p \leq 0.01$) de l'activité enzymatique de la GST (13.63 ± 1.08 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$ tissu) par rapport aux rats témoins (5.59 ± 0.68 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$ tissu). Toutefois, l'activité enzymatique de la GST reste la même ($p \leq 0.01$) aussi bien chez les rats traités par l'extrait acétate d'éthyle (05.51 ± 0.02 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$ tissu) que chez les rats témoins (05.59 ± 0.68 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$ tissu). Cependant les rats du lot préventif montrent une diminution significative ($p \leq 0.05$) de l'activité de GST ($9,57 \pm 1,02$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{g}$ tissu) comparée avec celle des animaux traités par la DOX seule.

II. 4. L'analyse histopathologique

L'observation microscopique des coupes histologiques réalisées en section longitudinale sur le tissu cardiaque, sont figurés dans les **figures 42, 43, 44 et 45**.

L'histologie du myocarde des rats appartenant au lot témoin montre une morphologie intacte (**Figure 42 A et B**); Les cardiomyocytes contiennent des noyaux allongés (N) avec membrane bien définie et ils sont séparés par un tissu conjonctif remplissant l'espace intercellulaire (TC) (**Figure 42 A**). L'architecture de l'endocarde (EN) couche la plus interne du cœur apparaît normale (**Figure 42 B**).

Chez les rats traités par la DOX seule, la coupe histologique du myocarde montre des cardiomyocytes déformées (paraient arrondie) (CD) (**Figure 43 A**), une hémorragie (H) (**Figure 43 B et D**) et un œdème interstitiel (OI) séparant les cardiomyocytes (**Figure 43 D et E**) ainsi qu'une congestion de sang vasculaires (CV) (**Figure 43C**). Plusieurs vacuolisations cytoplasmiques (V) (**Figure 43 F**) étaient également évidentes dans le groupe traité par la DOX. Le tissu du myocarde apparaît fortement endommagé par comparaison à l'histologie du myocarde du lot témoin (**Figure 42 A**). Néanmoins aucune altération n'a été observée dans l'histologie du myocarde chez le lot des rats traités par l'EAERM (**Figure 44**), Son architecture est identique à celui des rats témoins (**Figure 42**). Pour le lot des rats prétraités par l'extrait de plante l'histologie a montré que Les dommages sévères du cœur distingué chez les rats traités par la DOX ont radicalement diminué. En fait, l'extrait a provoqué une diminution de remaniement oedémateux, une réduction de l'hémorragie et une atténuation de la congestion cellulaire ainsi les cardiomyocytes paraient normale avec des noyaux centré (**Figure 45**). En générale

Résultats et Discussion

l'architecture du myocarde apparaît presque intacte en comparaison avec les rats du lot DOX (**Figure 43**).

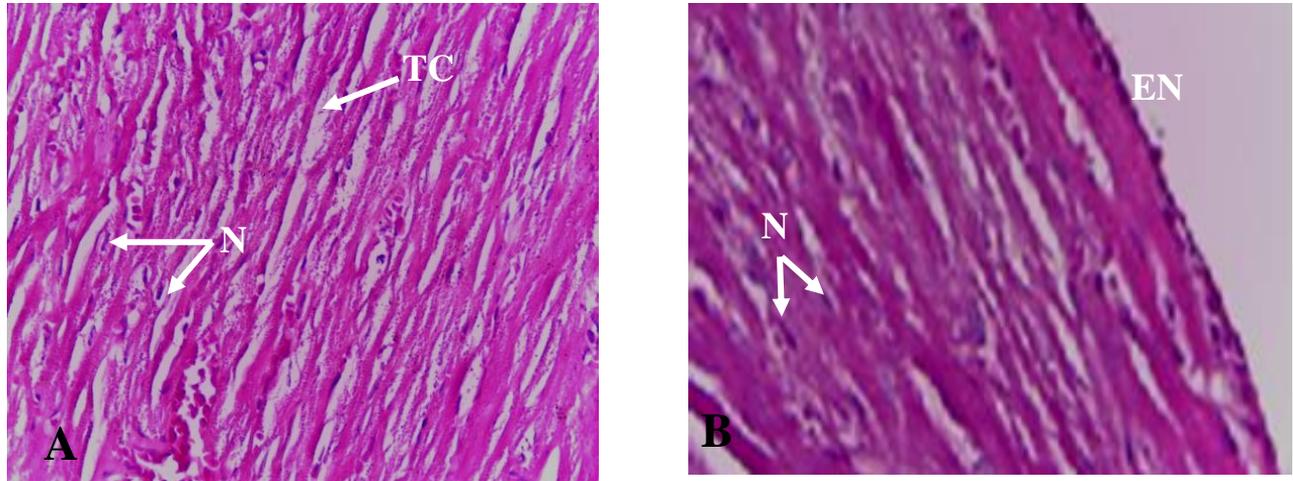


Figure 42 : Photomicrographe de l'histologie du myocarde des rats du lot témoin. G (10x40).

TC: Tissu conjonctif

N: Noyau

EN : Endocard

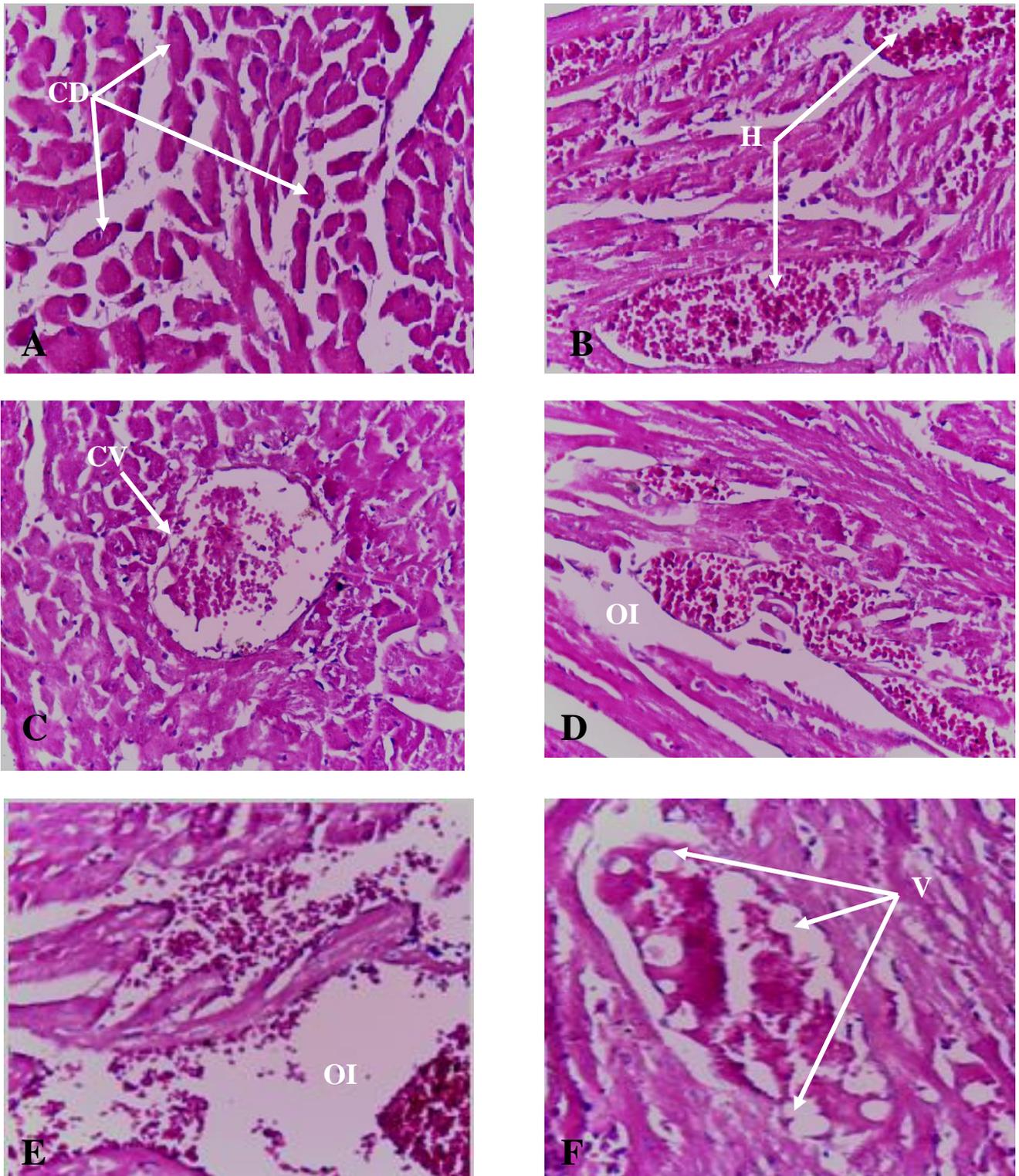


Figure 43: Photomicrographe de l'histologie du myocarde des rats du lot DOX. G (10x40).

SH : Hémorragie

OI : Œdème interstitiel

CV : Congestion vasculaire

V : Vacuolisation cytoplasmique

CD: Cardiomyocytes Déformés

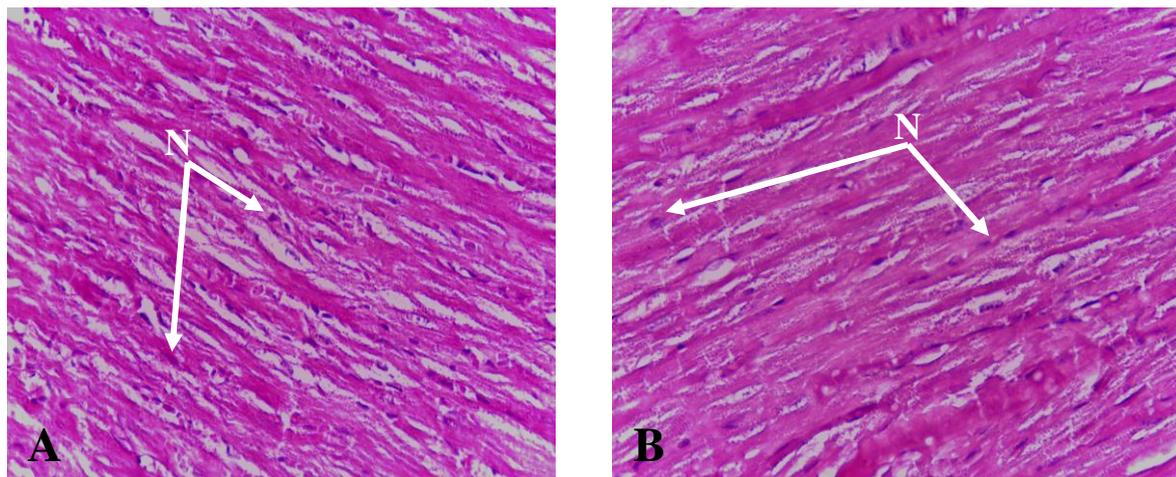


Figure 44 : Photomicrographe de l'histologie du myocarde des rats du lot traité par EAERM. G (10x40).

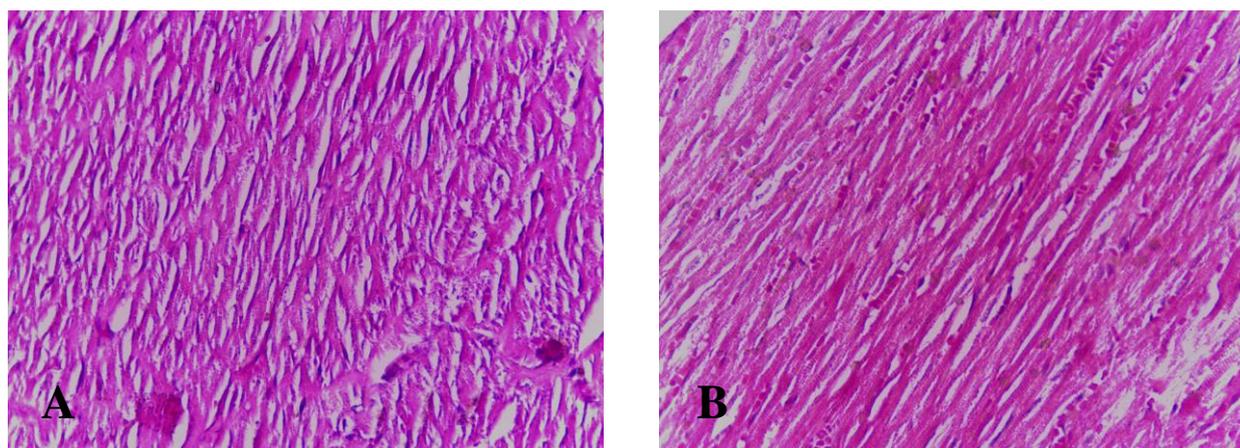


Figure 45: Photomicrographe de l'histologie du myocarde des rats du lot préventif G. (10x40).

➤ DISCUSSION

Le traitement de chimiothérapie implique l'usage d'agents toxiques dans le but de tuer les cellules tumorales. Cependant, dans certains cas, le traitement peut aussi affecter les cellules saines. Par exemple, les anthracyclines qui sont des agents anti-tumoraux très largement utilisés en oncologie sont connus pour être la cause d'effets secondaires importants. Dans le cas de la DOX, ces effets secondaires se traduisent principalement par le développement d'une toxicité cardiaque (Nathalie et al., 1999 ; Kim et al., 2003; Pereira et al., 2011).

Étant donné que l'une des principales causes de la cardiotoxicité par la DOX est le stress oxydant causé par une production excessive des radicaux libres. En fait, plusieurs études ont été menées afin de trouver des agents protecteurs contre cette cardiotoxicité; combinant à la fois un pouvoir anti-radicalaire et chélateur d'ion métalliques. La première molécule découverte avec un potentiel cardioprotecteur réel et utilisée en clinique est le dexrazoxane (Hasinoff & Herman, 2007). Cependant, des études ont démontré que l'utilisation du dexrazoxane lors de chimiothérapie, chez les jeunes enfants, augmente le risque de développer des cancers secondaires et des infections graves (Magnano et al., 2014). En conséquence, l'utilisation du dexrazoxane comme cardioprotecteur est limitée à des cas particulier comme le cancer du sein à un stade métastatique (Hershman & Shao, 2009).

En fait les études de l'utilisation des certains antioxydants pour contrer les effets nocifs de la doxorubicine comme la vitamine E ou la coenzyme Q, ont démontré des résultats très intéressants *in vitro*. Cependant, les conclusions des études *in vivo* démontrent une activité cardioprotectrice limitée (Oliveira et al., 2004).

De ce fait, il devenait important de trouver de nouvelles substances qui auraient un meilleur potentiel cardioprotecteur, et ce, sans diminuer l'activité anti-tumorale de la DOX sur les cellules cancéreuses.

Par ailleurs, les flavonoïdes qui sont des composés phénoliques des végétaux, sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (Van Acker et al., 1995). Ils sont utilisés pour la protection contre la cardiotoxicité de la doxorubicine (Bast et al, 2007; Kaiserová et al., 2007). C'est dans ce contexte que l'utilisation des plantes médicinales riches en flavonoïde fait actuellement l'objet de nombreuses recherches pour la prévention contre la cardiotoxicité induite par la DOX.

Résultats et Discussion

R. montana (Rutacées) communément appelé “Fidjel el djbel “ est une plante utilisée depuis longtemps pour des usages thérapeutique et culinaires, ainsi que des études antérieures ont révélé la présence de nombreux métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les phénols, les triterpènes secondaires connues par leurs activités biologiques, y compris la capacité antioxydante (Raghav et al.,2006; Mejrib et al.,2010). Néanmoins, aucune étude n’a été faite sur l’effet préventif des extraits de *R. montana* sur la cardiotoxicité de la DOX.

C’est pourquoi cette présente étude se veut d’étudier l’effet antioxydant et cardioprotecteur des flavonoïdes de l’extrait acétate d’éthyle de la plante médicinale *R. montana* contre la cardiotoxicité induite par la DOX.

Notre choix s’est porté sur l’extrait acétate d’éthyle parce que les résultats de l’activité anti oxydante *in vitro* ont montré clairement que c’est l’extrait qui possède l’effet antioxydant le plus puissant. C’est résultats nous a encouragé à estimé cette activité *in vivo* chez des rats wistar contre le stress oxydant induit par la DOX.

Afin d’évaluer la cardiotoxicité engendrée par la DOX sur des rats, le médicament est administré à une dose unique de 15mg/kg par voie intra péritonéale pour assurer une toxicité aigue (Bandari et al., 2013; Abdulhakeem al-majed et al., 2002, Praveen et al., 2008) Au cours de cette toxicité les activités enzymatiques de l’ASAT, l’ALAT, LDH et La CKMB sont les biomarqueurs les plus sensibles, directement impliqués dans l’étendue des dommages cardiaques et de la toxicité, car ils sont cytoplasmiques et libérés dans la circulation après l’atteinte cellulaire (Kamoun et al., 2003; Walker,2006).

Nos résultats ont révélé une augmentation de l’activité enzymatique de l’ALAT, l’ASAT, LDH et la CKMB chez les rats traités par la DOX (15 mg/kg). L’augmentation de l’activité de ces enzymes cardiaque dans le sang peut être due pratiquement à la formation massive des radicaux libres issus de métabolisme de la DOX qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire et provoque la peroxydation lipidique qui conduit aux altérations structurales des membranes et par conséquent affaiblit le fonctionnement des membranes par la baisse de la fluidité et l’augmentation de sa perméabilité et par la diminution de l’activité des enzymes et des récepteurs liés aux membranes. (Pallavi et al., 2003). Tous ces dommages structurels et fonctionnels des membranes sont associés à lyse des cellules cardiaques et par conséquent la libération de ces enzymes cytoplasmiques dans la circulation sanguine. Ces

Résultats et Discussion

résultats sont en accord avec les résultats de (Sayed-Ahmed et al., 2001; Yagmurca et al., 2003; Abdulhakeem Al-Majed, 2002, Ioanna et al., 2007) qui ont suggéré que l'augmentation de l'activité plasmatique des enzymes l'ALAT, l'ASAT, la LDH et la CKMB constitue un marqueur indiquant clairement la toxicité cardiaque induite par la DOX.

D'après les résultats obtenus, l'administration préventive de l'extrait acétate d'éthyle à la dose de 100 mg/kg en association avec la DOX a atténué l'effet provoqué par la DOX et normalise l'activité de ces enzymes. Cela révèle que l'EAERM a pu réduire l'activité enzymatique de l'ALAT, l'ASAT, la LDH et la CKMB par la réduction de la peroxydation lipidique par des principes actifs présents dans l'extrait, qui ont pu provoquer une augmentation de la capacité de détoxification par l'amélioration de la capture des radicaux libres ce qui empêche le nécrose des cellules cardiaque et par conséquent évité la libération de ces enzymes dans la circulation sanguine.

Plusieurs études antérieures ont montré l'effet préventif des extraits de plante contre la toxicité cardiaque induite par la DOX avec diminution significative des niveaux d'ALAT d'ASAT de l'LDH et de CKMB (El Boghdady, 2013 ; Praveen et al., 2008; Gurvinder , 2008) Kara Ali, 2016) .

Comme il a été décrit auparavant, le stress oxydant est le principal mécanisme par lequel la DOX induit une cardiotoxicité. En effet, Le stress oxydatif peut être produit par deux voies différentes, soit par la réduction de la structure quinone de la DOX par l'enzyme NADH déshydrogénase en une semi-quinone radicalaire, Cette réaction réduit la molécule d'oxygène et forme des radicaux superoxydes (Delemasure et al., 2006), soit par l' association directe entre la DOX et les ions fer afin de former un complexe organométallique qui peut être réduit et par la suite former des radicaux libres (Xu et al., 2005). C'est pourquoi nous avons donc investi les marqueurs du stress oxydatif généré par la DOX dans le tissu cardiaque par mesure du taux du mlonyldialdéhyde (MDA) et du Glutathion réduit (GSH) ainsi que le statut antioxydant par l'évaluation de l'activité des enzymes antioxydants cardiaque (CAT et GST).

Dans notre étude, on a enregistré une augmentation hautement significative du taux du MDA cytosolique cardiaque chez les rats traités par la DOX avec une diminution hautement significative du GSH et une augmentation très significative de l'activité des enzymes antioxydants de CAT et GST.

Nos résultats sont en accord avec ceux présentés par Abdel-Wahab et al., 2003; Seval et al., 2006 ; Bandari et al., 2013 qui ont rapporté que lors d'une cardiotoxicité induite par la DOX la surproduction des ERO peut conduire à une perturbation du système de défense antioxydant dans la cellule.

La peroxydation lipidique est un processus causé par les radicaux libres, conduisant à la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés des membranes et la génération des aldéhydes réactifs comme le malondialdéhyde (MDA) (Mazunder et al., 2005) qui est cytotoxique par la formation des adduits et des pontages inter et intrabins avec la molécule de l'ADN et peut donc être considéré comme bio-marqueur principal du stress oxydant (Milane, 2004; Favier, 2003).

Dans la présente étude nous avons constaté une augmentation du taux du MDA cytosolique cardiaque, chez le groupe des rats traités par la DOX, traduisant une augmentation de la lipoperoxydation par le traitement à la DOX, Abdel-Wahab, Alyane, et El Boghdady ont trouvé des résultats similaires et suggèrent que l'augmentation de la concentration du MDA dans le cœur des rats traités par DOX par rapport au groupe des rats témoins est probablement due à l'augmentation des radicaux libres issus de métabolisme de la DOX qui attaquent les acides gras polyinsaturés de la membrane des cellules cardiaques et provoque la peroxydation lipidique et par conséquent des dommages tissulaires (Abdel-Wahab et al., 2003 ; Alyane, 2008 ; El Boghdady, 2013).

On outre, notre étude révèle qu'un traitement de 15 jours par l'extrait acétate d'éthyle de *R.montana* avant le traitement par la DOX a permis de diminuer d'une manière très significative la concentration de l'MDA par comparaison aux rats traités par la DOX.

Ces résultats suggèrent que l'extrait acétate d'éthyle de *R.montana* a pu protéger le tissu cardiaque contre le stress oxydant et l'action cytotoxique induite par la DOX et maintient l'équilibre du système redox intra-cardiotcytaire par inhibition de la peroxydation lipidique. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Gurvinder et al, qui ont constaté une nette diminution du taux cardiaque en MDA après un traitement par l'extrait butanolique de *Terminalia arjuna* (Gurvinder et al., 2008).

En outre, le pouvoir chémoprotecteur de l'extrait acétate d'éthyle de cette plante peut être dû à l'augmentation du statut antioxydant, car l'extrait de la plante a présenté une augmentation de

Résultats et Discussion

la concentration du GSH par rapport aux groupes témoins ou l'inhibition de la peroxydation lipidique par les flavonoïdes de l'extrait connus pour leur propriétés anti-radicalaire ou bien à la captation des molécules du MDA par les métabolites secondaires de l'extrait (Cosset, 1998, Lahouel et al., 2004).

Le glutathion réduit (GSH), antioxydant non enzymatique, est le plus important, il constitue la première ligne de défense contre les radicaux libres (Sathishsekar MSc & Subramanian, 2005). En effet le GSH joue leur rôle de défense antioxydant par différents mécanismes; C'est un piègeur direct des radicaux libres, un co-substrat nécessaire pour l'activité des enzymes antioxydants le GPx et GST (Ravi et al., 2004) et participe dans la détoxifications des métabolites réactifs (Gerard-Monnier & Chaudière J, 1996). De ce fait le taux du GSH cellulaire peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible du stress oxydant (Taleb-Senouci et al., 2009).

La présente étude a révélé une réduction importante du taux de glutathion au niveau du cœur, chez les rats traités par la DOX par rapport aux rats témoins. La déplétion en GSH dans le cœur des rats traités par la DOX est probablement due d'une part à un accroissement de son utilisation par les cellules cardiaques dans la détoxification des métabolites réactifs toxiques de la DOX, et d'autre part à une diminution de la synthèse du GSH ou une augmentation de son oxydation en GSSG oxydé par les radicaux libres au cours du stress oxydant causé par la DOX. Le même résultat que le notre a été mentionné par Bandari et El Boghdady, où ils ont suggéré la diminution de la concentration du GSH cardiaque chez les rats traités par la DOX (Bandari et al., 2013; El Boghdady, 2013).

Les résultats obtenus dans notre étude ont révélé que le prétraitement des rats par l'extrait acétate d'éthyle a augmenté d'une manière significative la teneur de GSH dans les cardiomyocytes par rapport aux rats traités par la DOX. Ces résultats sont clairement indicatifs du pouvoir chémoprotecteur de l'extrait contre la chute du GSH cardiaque induite par la DOX. Cet effet protecteur de l'extrait contre la déplétion du GSH peut être dû soit à l'augmentation de sa biosynthèse (Sathishsekar & Subramanian, 2005), la stimulation de sa régénération à partir de GSSG oxydé (Martin, 2003) soit par la réduction de l'utilisation de sa forme réduite suite à la neutralisation des radicaux libres et les métabolites réactifs issus du métabolisme de la DOX par les flavonoïdes de cet extrait.

Résultats et Discussion

Nos résultats concordent avec plusieurs d'autres études comme celle publiée par Praveen (Praveen et al, 2008) qui ont constaté que, chez des rats traités par la DOX, un traitement de 7 jours par l'extrait éthanolique de *Phyllanthus maderaspatensis* provoque une augmentation significative du taux cardiaque en GSH.

En plus de l'activité antioxydante assurée par le glutathion (système non enzymatique), les cardiomyocytes possèdent plusieurs enzymes antioxydants contre les radicaux libres issus de métabolisme de la DOX.

Dans notre étude, l'administration de la DOX (15mg/Kg ip), a provoqué après 48 h une augmentation très significative de l'activité de la CAT et GST cardiaque. L'augmentation de l'activité de la CAT peut expliquer par une production intensive du H₂O₂ suite à la dismutation de l'anion superoxyde généré en grande quantité lors du biotransformation de la DOX. Nos résultats concordent avec plusieurs d'autres études comme celle publiée par Seval (Seval et al., 2005) qui ont constaté que l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydants comme la CAT et GSH-px est considérée comme un signe d'un état de stress oxydant. De même, dans une autre étude, Ayaz et ses collaborateurs (Ayaz et al., 2005) ont constaté une augmentation de l'activité de la CAT après l'administration de la DOX.

En effet, l'augmentation de l'activité du GST qui est une enzyme de la détoxification des xénobiotiques cytotoxiques par la réaction de conjugaison avec le glutathion (Anjum et al., 2012) est probablement expliqué par la conjugaison de la doxorubicinole - métabolite très toxique de la DOX- avec le glutathion, qui aboutit à la formation de conjuguées, hydrosolubles et donc facilement éliminées par les reins. Plusieurs recherches soutiennent l'hypothèse que le stress induit par la DOX dans le tissu cardiaque, entraîne une augmentation dans l'activité de la GST ainsi qu'une augmentation de l'oxydation de GSH (Paranka & Dorr, 1994). On outre, notre étude révèle qu'un prétraitement des rats pendant deux semaines par l'extrait acétate d'éthyle de *R.montana* riche en flavonoïdes a permis de réduire d'une manière significative l'activité des deux enzymes -CAT et GST- dans le cœur par rapport à celle des rats traités par la DOX.

Ces résultats expliquent la propriété antioxydante des flavonoïdes de l'EAERM qui remplace le rôle détoxifiant joué par la catalase dans le piégeage de peroxyde d'hydrogène ou bien l'anion superoxyde qui peuvent stimuler l'augmentation de l'activité de cette enzyme. Tandis que l'atténuation dans l'activité de GST est probablement due à l'inhibition de l'activité de carbonyl réductase qui est une enzyme responsable dans la biotransformation de doxorubicine

Résultats et Discussion

en doxorubicinole par les flavonoïdes de l'extrait (Forrest& Gonzalez, 2000 ; Huang et al., 2010).

Afin de confirmer les résultats des dosages plasmatiques et tissulaires des biomarqueurs de la toxicité cardiaque de la DOX en a réalisé une étude histologique du cœur des rats des quatre lots par l'utilisation de la coloration par l'hématoxyline & éosine selon la méthode décrite par Houlot (Houlot ,1984). Les résultats ont montrée que l'administration de la DOX en une dose unique aux rats a provoqué des altérations sévères accompagnées par des changements histologiques. En fait, la DOX causé un changement de la structure des cardiomyocytes, une congestion vasculaire, une vacuolisation cytoplasmique, une hémorragie et des d'œdèmes interstitiels. Ces modifications histopathologiques confirment les résultats des dosages des paramètres biochimiques et peuvent être vraisemblablement dues aux lésions induites par la production excessive des radicaux libres et à la suite de la peroxydation lipidique induite par la biotransformation de la DOX.

Des lésions histologiques identiques dans la morphologie de tissu cardiaque chez les rats traités par la DOX ont été aussi rapportées par plusieurs études antérieures (Debasis et al., 2003; Seval, 2006; Baohong et al.,2008; Osama et al., 2011; Ahmed El Boghdady, 2013).

Par ailleurs, une amélioration significative des dommages histologiques a été notée pour les rats du lot prétraité par l'EAERM. Ces résultats peuvent être dus à l'effet antioxydant des flavonoïdes de cet extrait qui réduit le stress oxydant provoqué par le DOX, en piègeant les ERO permettant ainsi la diminution des altérations histologiques. Il a été précédemment démontré que les flavonoïdes des plantes peuvent exercer un effet protecteur contre les dommages du stress oxydant au niveau des tissus (Atangwho et al., 2007).

L'étude faite par Kara Ali a révélée que l'extrait butanolique de *Globularia alypum* riche en flavonoïdes est bénéfique dans la restauration des dommages tissulaires induit par l'administration de la DOX dans le cœur des rats (Kara Ali et al., 2016). D'une autre part d'autres études expérimentales démontrent l'effet protecteur des flavonoïdes contre les lésions induites par la DOX dans le tissu cardiaque (van Acker et al., 1993; Yasuyuki et al., 1997; Bast et al., 2007).

Résultats et Discussion

En outre, l'observation microscopique des coupes histologiques des rats traités par l'EAERM seule a montré qu'il n'y avait pas d'altérations néfastes au niveau cardiaque. Ce résultat est clairement indicatif de l'effet non-toxique à l'échelle histologique de cet extrait.

Ces résultats ne font que prouver que l'EAERM a un effet bénéfique dans la prévention du stress oxydant et de la cardiotoxicité causés par la doxorubicine par diminution de l'activité des enzymes cardiaque dans le plasma et du stress oxydant au niveau cardiaque. Toutefois, de nouvelles études sont nécessaires pour identifier les molécules biologiquement actives afin de donner avec précision le/les mécanisme(s) moléculaire(s) responsable(s) de cet effet antioxydant.

III. Effet des extraits de la plante *R.montana* sur la réversion de la résistance multiple à la DOX des lignées cellulaires A2780 DX3

➤ RESULTATS

Les extraits éther de pétrole, acétate d'éthyle et butanolique de la plante médicinale *R.montana* sont testés pour la réversion de la résistance multiple à la DOX des cellules A2780 DX3 par le test de viabilité cellulaire (MTT). Le facteur de réversion de la résistance et le pourcentage des cellules vivantes en présence de différentes concentrations (0.625, 2.5, 10, 40 mg/ml) des extraits de *R.montana* en présence de 7 μ M de la DOX sont représentés dans le **tableau 16** et la **figure 46**.

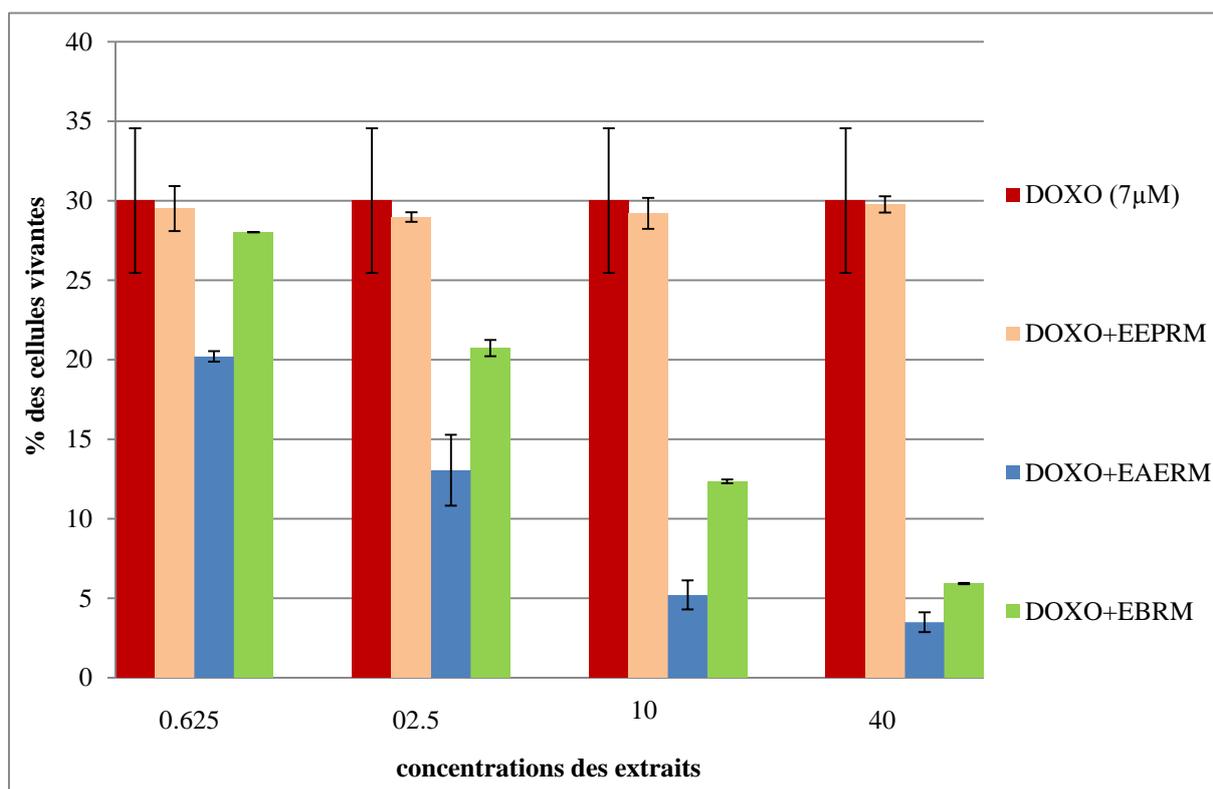
Tableau 16 : Le facteur de réversion de la résistance multiple des cellules A2780 DX3 par l'EEPRM, EAERM et EBRM

Les composés	% des cellules vivantes	facteur de réversion (FR)
DOX 7 μ M	30.01 \pm 4.55	-
DOX +EEPRM (0.625mg/ml)	29.50 \pm 1.41	01.01
DOX +EEPRM (2.5 mg/ml)	28.97 \pm 0.31	01.03
DOX +EEPRM (10 mg/ml)	28.20 \pm 0.97	01.06
DOX + EEPRM (40 mg/ml)	27.77 \pm 0.51	01.08
DOX +EAERM (0.625mg/ml)	20.20 \pm 0.33	01.48
DOX +EAERM 2.5 mg/ml	13.04 \pm 2.23	02.30
DOX +EAERM 10 mg/ml	05.20 \pm 0.91	05.77
DOX + EAERM (40 mg/ml)	03.48 \pm 0.62	08.62
DOX +EBRM (0.625mg/ml)	28.02 \pm 0.015	01.07
DOX +EBRM 2.5 mg/ml	20.72 \pm 0.51	01.45
DOX +EBRM 10 mg/ml	12.34 \pm 0.12	02.43
DOX + EBRM (40 mg/ml)	5.92 \pm 0.041	05.07

Chaque valeur représente la moyenne \pm écartype (n = 3).

Résultats et Discussion

Les valeurs des facteurs de réversion (**Tableau 16**) et les % des cellules vivantes (**Figure 46**) des différents extraits de la plante *R.montana* en présence de 7 μ M de la DOX pour les cellules A2780 DX3 résistantes à la DOX montrent que l'extrait acétate d'éthyle semble avoir l'effet de réversion de la résistance le plus puissant, parmi les trois extraits, d'une manière dose-dépendante avec des facteur de réversion de 8.62, 05.77 et 02.30 respectivement pour les concentrations 40mg/ml, 10 et 02.5 mg/ml, cela est traduit par le % des cellule vivantes le plus faible (3.48 pour la concentration, 40mg/ml) suivi par l'extrait butanolique (FR=05.07 et 02.43 respectivement pour les concentrations 40 et 10 mg/ml) avec un % des cellules vivantes de 05.92 pour la concentration 40mg/ml , alors que l'extrait éther de pétrole est le plus faible dans la réversion de la résistance qui a un % des cellules vivantes (29.5 à la concentration de 0.625 mg/ml) qui est presque similaire à celui obtenue en présence de la DOX seul (30.01 a la même concentration) avec un faible FR allant de 1.01 à 1.08.



Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écartype. Test ANOVA :

Figure 46: Le test MTT pour la réversion de la résistance multiple des cellules A2780 DX3 par différentes concentrations des extraits de la plante médicinale *R.montana*.

➤ DISCUSSION

La résistance pléiotropique aux agents chimiothérapeutiques (Multidrug Resistance ou MDR) est la diminution de la sensibilité des cellules cancéreuses, et par conséquent la réduction de l'efficacité du traitement, C'est une obstacle majeur pour le traitement de nombreuses pathologie malignes, notamment pour ceux qui ne peuvent pas être traités par chirurgie ou radiothérapie, dont les leucémies, les lymphomes, les sarcomes et la plupart des carcinomes, en particulier hépatiques, rénaux, surrénaux et coliques (Gerhard& Gerhard, 1993; Meschini *et al.*, 2000).

Les différents mécanismes qui peuvent induire la résistance sont très complexes et très divers, et pourrait être due à l'altération du métabolisme du médicament, l'altération de la cible du médicament, l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN et la modification de l'expression des gènes apoptotiques (Dominique,1991 ;Lehnert, 1996; Baggetto, 1997; Meschini,2000; Manju, 2013).

De plus, Cette résistance multi-drogues (MDR) pour cette large catégorie de chimiothérapies est associée a une diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments soit par la diminution de l'entrée du médicament dans la cellule ou l'augmentation de l'efflux du médicament de la cellule par l'augmentation de l'expression du produit d'un gène fortement conservé, le gène MDR, codant pour des transporteurs membranaires de la famille des protéines ABC « ATP Binding Cassette » comme le P-gP, MRP1 (Multidrug Resistance Protein2) et ABCG2 ou BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), qui sont des protéines responsables d'un efflux cellulaire actif et énergie dépendant (Bant, 1992), Ce dernier mode de résistance est le mécanisme principal par lequel de nombreux cancers développent une résistance aux médicaments chimiothérapeutiques (Twentyman, 1992 ; Hamada, 1986; Genoux 2006; Manju, 2013).

De nombreuses molécules chimio-sensibilisateurs ou agents réversant, c'est-à-dire capable de lever cette résistance, issues de classes pharmacologiques très diverses utilisés en thérapeutique pour d'autres indications, sont capables de moduler *in vitro* le phénotype MDR. Ces agents réversant, incluent le vérapamil, utilisé comme hypotenseur, la ciclosporine A, utilisée comme immunosuppresseur, la quinidine, utilisée comme antiarythmique, et bien d'autres se sont montrés actifs sur la réversion de la résistance. Ces composés "de première génération" se sont rapidement révélés inutilisables en raison précisément de leurs propriétés

Résultats et Discussion

pharmacologiques propres, qui apportaient une toxicité inopportune (Volm,1998; Krichna, 2000 ; Robert, 2011).

En conséquence, plusieurs efforts sont investis dans l'identification de produits naturels ayant des propriétés réversantes, permettant d'inhiber les transporteurs membranaires, de renverser le phénotype MDR envers différentes médications, et de sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie conventionnelle sans les effets secondaires rapportés avec les inhibiteurs classiques des transporteurs membranaires. C'est dans ce contexte que l'utilisation des extraits des plantes fait actuellement l'objet de nombreuses recherches (Fong, 2007; Helga, 2008; Lei, 2011; Shu-Qi, 2011; Hengru, 2012; Victor, 2013).

En fait, plusieurs études ont été prouvées la réversion de la résistance multi-drogues dans les cellules tumorales *in vitro* par différents métabolites bioactifs des plantes tels que le curcumin, un polyphénol naturel retrouvé dans les rhizomes de *Curcuma longa* (Songyot, 2002), la chelidonine un alcaloïde de *Chelidonium majus* (Mahmoud Zaki, 2013) et les alkaloides de *stemona aphylla* et *stemona burkillii* (Wisinee, 2011), Plusieurs études ont prouvé l'effet inhibiteur des triterpenoids sur nombreuses lignées cellulaires résistantes (Xiao-Jian, 2014) tel que les ginsenosides, de la famille du Ginseng qui inhibe le transporteur p-gp chez les lignées cellulaire K BV20C (Lim, 2008), l'acide Oleanolique qui inhibe le transporteur MRP1 chez les lignées cellulaire Ma104 (Braga, 2007) et l'acide Glycyrrhétique qui inhibe le transporteur BCRP chez les lignées cellulaire LLC-PK1 (Yoshida, 2008). Certains sesquiterpene coumarines tel que farnesiferole A de *Ferula persica* et l'acide galbanique de *Ferula szowitsiana* (Mohammad Yahya, 2011) et les coumarines de *Cicuta virosa* (Shu-Qi Wang, 2011).

Ainsi L'effet chimiosensibilisateurs des flavonoides sur de nombreux lignées cellulaires a été apporté par plusieurs travaux (Imai et al., 2004; van Zanden et al., 2005; Zhang et al., 2005; Morris and Zhang, 2006, Sylwia Borska 2012; Victor Kuete 2014). *R.montana* est une plante largement utilisée dans la pharmacopée traditionnelle; elle est fréquemment utilisée pour ses propriétés stimulantes, antiseptiques, émménagogue, diurétiques, antispasmodique, rubéfiant, abortives, antirhumatismal, antiparasitaire, et antalgique. Néanmoins, aucune étude n'a été faite sur la réversion de la résistance multiple à la DOX par les extraits de *R.montana*.

Résultats et Discussion

C'est pourquoi, notre étude réalisée a visé l'expérimentation de l'effet des extraits de la plante *R. montana*, riche en différents métabolites bioactifs tels que les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes et les coumarines sur la réversion de la résistance multiple à la DOX des lignées cellulaires A2780 DX3. Nous avons utilisé la méthode basée sur la détection colorimétrique de l'activité de l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase dans la réduction du «MTT» dans les cellules viables. De nombreuses études publiées ont mis en évidence la réversion de la résistance multiple en s'appuyant, en partie, sur le test MTT de viabilité cellulaire (Fong, 2007; Sung-Tsai, 2007; Harshita, 2013).

Nos résultats ont démontré que l'extrait acétate d'éthyle semble avoir l'effet de réversion de la résistance le plus puissant d'une manière dose-dépendante suivi par l'extrait butanolique. La réversion de la résistance des cellules A2780 par ces deux extraits de *R. montana* est peut-être attribuée à la présence des flavonoïdes qui sont les majeurs constituants de ces deux extraits. Ceci est en accord avec plusieurs travaux qui ont prouvé la réversion de la résistance des différentes lignées cellulaires par les extraits flavonoidiques de différentes plantes (Katarzyna, 2006).

Conseil et ses collaborateurs (Conseil et al., 1998) ont déterminé le mécanisme d'action par lequel les flavonoïdes inhibent les transporteurs ABC de la résistance à la chimiothérapie. Ils ont montré que les flavonoïdes comme kaempferide sont des modulateurs à effet bifonctionnel, ils sont capables d'interagir à la fois avec le site ATP et aussi avec une région hydrophobe avoisinante d'interaction potentielle avec les stéroïdes, localisée au niveau du domaine cytosolique du transporteur.

Les chalcones, les flavones et les flavonols soient capables d'inverser le phénotype MDR en se fixant avec une forte affinité à la Pgp (Critchfield et al., 1994; Scambia et al., 1994; Shapiro et al., 1994).

Kitagawa et ses collaborateurs (Kitagawa, 2005) ont déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leurs activités inhibitrices de la P-gp. Ils ont montré l'importance de la double liaison entre les carbones C2 et C3 dans le cycle C dans l'interaction entre les flavonoïdes et les transporteurs MRP1 et MRP; par exemple, Le Naringénine qui n'a pas la double liaison 2, 3 dans le cycle C n'a eu aucun effet. Ils ont aussi montré que la structure plane des flavonoïdes semble être importante pour leur intercalation entre les acides aminés hydrophobe de la P-gp. Ainsi ils ont prouvé que l'hydrophobie des flavonoïdes est importante pour l'inhibition de P-gp.

Résultats et Discussion

On peut conclure que l'effet de réversion de la résistance le plus puissant de l'EAERM et l'EBRM est probablement expliqué par la richesse de ces deux extraits en différents type des flavonoïdes qui ont pu inhiber les transporteurs membranaires responsables de l'efflux cellulaire de la DOX.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La doxorubicine est un puissant agent chimio-thérapeutique permet de traiter plusieurs types de cancer, Cependant le développement des effets secondaires qui se traduisent principalement par une cardiotoxicité et la diminution de la sensibilité des cellules tumorales a cause d'une résistance pléiotropique (MDR limite son efficacité dans le traitement du cancer).

Dans le but de contrecarrer la cardiotoxicité et la résistance induite par la doxorubicine, nous avons conçu à étudier l'effet de la plante médicinale: *Ruta montana* sur le stress oxydant impliqué dans la pathogénèse de la cardiotoxicité et sur la réversion de la résistance des lignées cellulaire cancéreuses des ovaires humaine A2780 DX3.

Il nous est apparu important de commencer notre travail par une étude de quelques propriétés phytochimique sur la plante *R.montana* et l'évaluation de leur activité antioxydante *in vitro*. Nos résultats indiquent la richesse de cette plante en différents métabolites secondaires actif. L'extraction des flavonoïdes de la partie aérienne de la plante a permis d'obtenir des rendements qui diffèrent en fonction des solvants utilisés, alors que l'analyse quantitative des composés phénoliques et des flavonoïdes était conséquente et l'analyse qualitative par CCM prouve la richesse de cette plante en différents classe des flavonoïdes qui sont dotées d'un pouvoir anti-radicalaire.

L'estimation de l'activité antioxydante *in vitro*, des différents extraits de *R. montana* montre que l'extrait acétate d'éthyl est le plus actif comparé aux différents extraits ceci nous a encouragé dans une deuxième partie, à évaluer l'activité antioxydante de cet extrait contre le stress induit dans le cœur par la doxorubicine *in vivo* sur des rats Wistar albinos. Les résultats de cette partie prouve l'effet bénéfique et intéressant de cet extrait dans la prévention du stress oxydant et de la cardiotoxicité causés par la doxorubicine en modulant les biomarqueurs de stress oxydant (MDA et GSH), et en régulant l'activité des enzymes antioxydantes (CAT et GST) dans le tissu cardiaque et en diminuant l'augmentation des activités des enzymes cardiaques (CKMB, ASAT, ALAT et LDH) dans le plasma. D'autre part, les résultats de l'étude histologique montrent clairement que le prétraitement par l'extrait acétate d'éthyle a pu améliorer les dommages histologiques cardiaques provoqués par la doxorubicine.

Conclusion et perspectives

Dans une troisième partie de ce travail, nous avons évalué l'activité des différents extraits de la plante sur la réversion de la résistance multiple à la DOX des lignées cellulaires résistantes -adénocarcinome ovarien humaines (A2780 DX3)- par le test MTT. Il a été conclu de cette partie que l'extrait acétate d'éthyle semble avoir l'effet de réversion de la résistance le plus puissant, parmi les autres extraits d'une manière, dose-dépendante.

En effet, l'ensemble des résultats obtenus dans ce travail laissent un grand espoir pour l'avenir avec le rôle protecteur que peuvent conférer la plante médicinale *Ruta montana* dans la prévention du stress oxydant induit par la doxorubicine dans le tissu cardiaque et dans la réversion de la résistance des cellules tumorales.

Par ailleurs, les résultats de cette étude restent préliminaires et ne constituent qu'une première étape dans la recherche des substances d'origine naturelle biologiquement active, donc, de nombreuses perspectives expérimentales découlent de cette recherche. En fait, des études plus approfondies nécessaires concluant plusieurs points à savoir:

- L'isolement, la purification et l'identification des principes actifs du *R. montana* impliqués dans les effets révélés en utilisant des méthodes plus précises telles que High Performance Liquid Chromatography (HPLC) et Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)
- La détermination, des mécanismes moléculaires qui peuvent être intervenant dans les effets pharmacologiques observés.
- Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur la réversion de la résistance multiple à la DOX des différents extraits de cette plante.
- La réalisation d'une étude toxicologique serait une étape substantielle afin de pouvoir cerner tout effet indésirable.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdulhakeem al-majed A , Ali.gado M, othman A. al-shabanah, mahmoud mansour A (2002). Alpha-lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. *Pharmacological Research*, **46(6)** : 549-503.

Abidli N (2004). effect of verapamil on resistance to doxorubicin in mice bearing Ehrlich Ascites Carcinoma cells.Its influence on dox-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity. thèse de doctorat de l'université de mentouri de Constantine, Algérie, 28-39.

Abuja P.M and Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* **306**: (1-17).

Achille R (1980). Botanique médicale, 4^{ème} Ed. Paris: l'imprimerie de Rignoux, 32.

Ahmad S (1995). Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. 1st Ed. *Chapman & Hall*. New York, 1-457.

Ahmed El Boghdady NA (2013). Antioxidant and antiapoptotic effects of proanthocyanidin and ginkgo biloba extract against doxorubicin-induced cardiac injury in rats. *Cell Biochem Funct*; **31**: 344–351.

Alan L, Miller ND (1996). Antioxidant flavonoids : Structure, function and clinical usage. *Alt Med Rev*, **1(2)**: 103-111.

Albano E, French S, Ingelmann-Sundberg M. (1999). Hydroxethyl radicals in ethanol. Hepatotoxicity. *Frontiers in Bioscience*, 4: 533-540.

Alberts B, Alexander J, Julian L, Martin R, Keith R, Peter W (2002). *Molecular biology of the cell*, 4th. New York: Garland Science, 1616.

Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M (1998). A human placentaspecific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res*, **58 (23)**: 5337-5339.

Almquist Kc, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG (1995). Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drugselected and transfected human tumor cell. *Cancer Res*, **55 (1)** : 102-10.

Andrieu AN (2004). Cardiotoxicity of anthracyclines: mechanisms and pharmacologic targets for prevention]. *Thérapie*, **59 (1)**: 121-126.

Références bibliographiques

Andrieu-Abadie N, Levade T, Laurent G, Hatem S, Mercadier JJ (1999). Le céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicine. *Médecine Sciences*, **15**: 1322-4.

Angelov G, Boyadzhiev L, Georgieva S (2008). Antioxydant properties of some Bulgarian wines. *Journal of International Scientific Publication: Materials, Methods and Technologies*, **3(1)**:143-150.

Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E, Umar S, Ahmad A, Khan NA, Iqbal M (2012). Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids- a review. *Environ. Exp. Bot*, **75**: 307-324.

Arimboor R, Arumughan C (2011). Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) proanthocyanidins inhibit in vitro enzymatic hydrolysis of protein. *Journal of Food Science*, **76(6)**: 130-7.

Arola OJ, Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Parvinen, Voipio-Pulkki LM (2000). Acute Doxorubicine Cardiotoxicity involves Cardiomyocyte Apoptosis. *Cancer Research*, **60** : 1789-1792.

Arozal W, Sari FR, Watanabe K, Arumugam S, Veeraveedu PT, Ma M, Thandavarayan RA, Sukumaran V, Lakshmanan AP, Kobayashi Y, Mito S, Soetikno V, Suzuki K (2011). Carvedilol-Afforded Protection against Daunorubicin-Induced Cardiomyopathic Rats *In Vivo*: Effects on Cardiac Fibrosis and Hypertrophy. *ISRN Pharmacology*, 430549.

Association Française des Enseignants de chimie thérapeutique (2004).

Atangwho IJ, Ebang PE, Eteng MU, Eyoung EU, Obi AU (2007). Effects of *Vernonia amygdolina* Del Leaf on Kidney function of diabetic rats. *International journal of pharmacology*, **3(2)**:193-48.

Athamena S (2009). Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminum Cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis*, Mémoire de magister en biochimie appliquées. Université Hadj Lkhder-Batna, 17-39.

Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, **89**: 27-36.

Avissar N, Whitin JC, Allen PZ (1989). Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem*, **2**: 15850-15855.

Baba Aissa F (1999). Encyclopédie des plants utiles EDAS ed. Librairie moderne. Rouiba, 234-244.

Références bibliographiques

Baggetto LG (1997). Biochemical, genetic and metabolic adaptations of tumor cells that express the typical MDR phenotype. Reversion by new therapies. *J. Bioenerg. Biomemb*, **29** (4) : 401-413.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**,483-495.

Ban T (1992). Pleiotropic, mult idrug-resis tant phen otype and Pglycoprotein: a review.*Chemotherapy*, **38**: 191-196.

Bandari U, Shweta S, Madhusudhana K, Bidya DS, Challa VS, Rajeswara RP, Naidu VGM, Ramakrishna S (2013). Ethanolic extractof *Boswellia ovalifoliolata* bark and leaf attenuatesdoxorubicin-inducedcardiotoxicity in mice. *Environmental toxicology and pharmacology*, **36**: 840–849.

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

Baohong J, Lin Z, Ming L, Wanying W, Min Y, Junchen W, De-an G (2008). Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*.

Barnabé N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB (2002). Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free radical biology and Medicine*, **33** (2): 266-275.

Barouki R (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Médecine/Sciences*, **22** : 266-72.

Bast A, Kaiserov H., den Hartog GJM, Haenen GRMM, van der Vijgh WJF (2007). Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: Flavonoids. *Cell Biol Toxicol*, **23**: 39–47.

Bast, A, Haenen Guido RMM, Bruynzeel Anna ME, Van der Vijgh Wim JF (2007). Protection By flavonoids against anthracycline cardiotoxicity : from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol*, **7** : 154-159.

Beaudeau JL, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J, Legrand A (2006). Sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Implication dans la transcription et la régulation des gènes. *Ann Pharm F*, (**64**) : 373-381.

Beck WT (1989). Unknotting the complexities of multidrug resistance : the involvement of DNA topoisomerases in drug action and resistance. *J Natl Cancer Inst*, **81**: 1683-5.

Beckman j, Beckman T, Chen j, Marshall P and Freeman B (1990) .Apparent hydroxyl radical production by peroxyxynitrite : implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxyde. *Proc Natl Acad Sci, USA*. **87** :1620-4

Références bibliographiques

- Belkassam A, Zellagui A, Gherraf N, Lahouel M, Rhouati S (2011).** Essential oil composition of Algerian *Ruta montana* (Clus.) L. And it's antibacterial effects on microorganisms responsible for respiratory infections. *Advances in Natural and Applied Sciences*, **5(3)**: 264-268.
- Belpomme D (1991).** Diversité des mécanismes de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses. *médecine/sciences*, **7**: 465-72.
- Belviranlı M, Gökbel H (2006).** Acute exercise induced oxidative stress and antioxidant changes. *Eur. J. Gen. Med*, **3**: 126-131.
- Bénard J, Rixe O (1996).** Résistance aux drogues anticancéreuses. *Press Med. (Paris)*, **25** (35): 1724-1730.
- Benkiki N (2006).** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*. Thèse de doctorat d'état en chimie, université El-Hadj Lakhdar Batna, 12-75.
- Benmahdi A (2001).** Identification des Principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie*, **6**: 11-27.
- Benziane MM (2007).** Screening photochimique de la plante Ruta Montana. Extraction de l'huile essentielle et de la rutine. Activité antioxydant de la plante. Thèse de Magister en Chimie Organique ; Université D'oran ES-SENIA, 41.
- Berrin B, Goksel T, Derya O (2008).** Study on polyphenol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxydant activity. *Food chemistry*, **209**: 426-430.
- Besle JM, Lamaison JL, Pradel P, Fraisse D, Viala D, Martin B(2004).** Les flavonoïdes des fourrages au lait. *Renc. Rech. Ruminants*, **1(1)** : 67-70.
- Beta T, Nam S, Dexter JE, Sapirstein HD (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem*, **82**, 390-393.
- Biedler JL, Riehm H (1970).** Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res*, **30**:1174-84.
- Bielack SS, Erttmann R, Winkler K, Landbeck G (1989).** Doxorubicin : effect of different schedules on toxicity and anti-tumor efficacy. *Eur J Cancer Clin Oncol*, **25**: 873-82.

Références bibliographiques

- Bilia AR, Eterno F, Bergonzi MC, Vincieri GMF (2007).** Evaluation of the content and stability of the constituents of mother tinctures and tinctures : The case of *Crataegus oxyacantha* L. and *Hieracium pilosella* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **44** : 70-78.
- Boharun T, Gressier B, Trotin F, Bruner C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luyckx M, Gazin M (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res*, 1-6.
- Bonnaillie C, Salacs M, Vassiliova E, Saykova I (2012).** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de génie industriel*, **7**: 35-45.
- Bonnefont RD, Beaudeau JL, Théron P, Peynet J, Legrand A, Delattre J(2004).** Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Ann Pharm Fr*, **62** : 147-157.
- Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Delattre J (2003).** Radicaux libres et anti-oxydants. In "Delattre J, Durand G, Jardillier JC. (Eds.), Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires". *Médecine-sciences, Flammarion*. Paris, 59-81.
- Booser DJ, Hortorbagyi GN (1994).** Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs*, **47** (2) : 223-58.
- Borg J.M., Reeber A (2008).** Biochimie métabolique, *Ellipses*, France, 257-269.
- Bossard R, Cuisance P (1981).** Arbres Et Arbustes D'ornement Des Régions Tempérées Et Méditerranéennes, Paris, France
- Boumendjel A (2009).** *ABC transporters and multidrug resistance*. Hoboken N.J.: John Wiley & Sons,
- Bozin B, Mimica- dukic N, samojlik I, Goran A, Igic R (2008).** Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L., *Alliaceae*). *Food Chemistry*, **111**:925-9.
- Braga F (2007).** Oleanolic acid inhibits the activity of the multidrug resistance protein ABCC1 (MRP1) but not of the ABCB1 (P-glycoprotein): possible use in cancer chemotherapy. *Cancer Lett*, **248**: 147–152
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **28**, 25-30.
- Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelker DR, Day BJ (2010).** Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J. Biol. Chem*, **285** (22):16582-16587.
- Brown GA, McPherson L Gu, Hedley DW, Toso KL, Deuchars MH, Freedman, Goldenberg G1 (1995).** Relationship of DNA topoisomerase II alpha and beta expression to cytotoxicity of antineoplastic agents in human acute lymphoblastic leukemia celllines. *Cancer Res*, **55** (1): 78-82.

Références bibliographiques

Bruneton (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 3ème Ed. Editions médicales internationales, *éditions Tec & Doc Lavoisier*. Paris, 1120.

Bruneton J (1999). Pharmacognosie, Photochimie Des Plantes Médicinales, 3ème Ed. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 366.

Bruneton J (1993). Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *La Voisier TEC et DOC*, Paris. 2ème édition, 268-277.

Burk RF (2002). Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care* , **5** : 47-49. *DOC*, Paris. 2ème édition, 268-277.

Campos FC, Panis C, de Rossi T, Victorino vj, Cecchini A, Cecchini A, Cecchini R (2012). Aspects related to oxidative stress-mediated toxicity of doxorubicin during chemotherapy treatment. *Applied Cancer Research*, **32**(1).

Cerutti PA (1994). Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, **344**, 862.

Chaudhry PS, Cabrera J, Juliani HR, Varma SD (1983). Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem. Pharmacol.* **32**: 1995.

Chauffert B, Correia M, Sergent C(1999). Actualité sur les mécanismes d la chimiorésistance. *Bull. Cancer (paris)*, **86** (1): 97-103.

Chebil L, Humeau C, Falcimaigne A, Engasser JM, Ghoul M (2006). Enzymatic acylation of flavonoids (Review). *Process Biochemistry*, **41** : 2237-2251.

Chen L, HU JY, Wang SQ (2012). The rôle of antioxdants in photoprotection : a critical review. *Journal of American Academy of Dermatology*, **67**(5), 1013-1024.

Chen SH, Chan NL, Hsieh TS (2013). New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*, **82** :139-170.

Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, Clair DKS (2007). Collateral Damage in cancer Chemoterapy: Oxidative stress in Nontargeted Tissues. *Molecular interventions*; **7** (3): 147-156.

Childs AC, Phaneuf SL , Dirks AJ, Phillips T and Leeuwenburgh C (2002). Doxorubicin treatment in vivo causes cytochromes C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl- 2 : Bax ratio. *Cancer Res*, **62** : 4592-82002.

Ciulei J (1982). Methodology for analysis of vegetable drugs. *Ed. Ministry of Chemical Industry. Romania*, 67.

Clairborne A (1985). Catalase activity.In : CRC Handbook of methodds for oxygen radical research. Eds Greenwald RA, CRC Press, Boca Raton, 283-284.

Claisse R (1993). Plante à usage dermatologique de la pharmacopée traditionnelle marocaine. Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique, **24**(27) : 172-173.

Références bibliographiques

Clevely A, Richmond K (1997). Plantes Et Herbes Aromatiques, Connaître Et Préparer, Larousse, Paris.

Cole S, Bhardwaj G, Gerlach J, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM (1992). Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **258 (5088)**:1650-1654.

Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM, Deeley RG (1994). Pharmacological characterization of mu Itidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res*, **54 (22)**: 5902-5910.

Collins L, Zhu T, Guo j, Xiao ZJ and Chen CY (2006). Phellinus linteus sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, **95** : 282-288.

Colombo A, Cipolla C, Beggiato M, Cardinale D (2013). Cardiac toxicity of anticancer agents. *Current Cardiology Reports*, **15 (5)**: 362.

Comhair SAA, Erzurum SC (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **283**: 246 - 255.

Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A (1998). Flavonoids: a class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**: 9831-9836,

Corinne B (2001). distribution intracellulaire des anthracyclines : implication dans le processus de mort cellulaire induite et le phénotype de résistance pleiotrope. Thèse de doctorat. Université henri poincaré-nancy 1: 5-36.

Cosset JM (1998). Chimioradiothérapie : rappel historique et état des lieux. *Cancer Raadioher*, **2**: 653-6.

Cotelle N (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr.Top. Med. Chem*, **1**:569-590.

Cousin P (1999). La Grande Encyclopédie De La Nature, Ed., Bordas, Paris / Montréal, 216.

Couto N, Malys N, Gaskell S, Barber J (2013). Partition and Turnover of Glutathione Reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research*, **12 (6)**: 2885–94.

Crapo JD (1997). Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **17**: 393 - 403.

Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Denigne C, Remesy C (2004). Comparaison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr*, **131**: 2109-2114.

Creté P (1965). Systématique Des Angiospermes, Masson Cie Editeurs, Paris VIe, France.

Références bibliographiques

Critchfield JW, Welsh CJ, Phang JM, Yeh GC (1994). Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT-15 colon cells. Activation of P-glycoprotein as a putative mechanism. *Biochem Pharmacol*, **48**: 1437-1445.

Cummings J, Willmott N, Smyth J (1991). The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer*, **27**

Cutts SM, Phillips DR (1995). Use of oligonucleotides to define the site of interstrand cross-links induced by doxorubicin. *Nucleic Acids Res*, **23 (13)** : 2450 -2456.

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

Dal Ben, D, Palumbo M, Zagotto G, Capranico G, Moro S (2007). DNA topoisomerase II structures and anthracycline activity: insights into ternary complex formation. *Current Pharmaceutical Design*, **13(27)** : 2766-2780.

Dalloz F, Maingon P, Cottin Y, Briot F, Horiot JC, Rochette L (1999). Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defences in the rat. *Free Radic Biol Med*, **26**:785– 800.

Daoudi, Hrouk H, Belaidi R, Slimani I, Ibijbijen J, Nassiri L (2016). Valorisation de *Ruta montana* et *Ruta chalepensis*: Etude ethnobotanique, Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *J. Mater. Environ. Sci*, **7 (3)**: 926-935.

Darley-USmar V, Wiseman H, Halliwell B (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters*, **369**: 131-135.

De Jussieu AL (1789). Genera Plantarum, 296.

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

Debasis B, Chandan KS, Sidhartha DR, Dipak KD, Manashi B, Harry GP, Joe AV (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract, *Mutation Research*, **524**: 87–97.

Del Corso L, Pastine F, Protti MA, Romanelli AM, Moruzzo D, Ruocco L, Pentimone F (2000). Blood zinc, copper and magnesium in aging. A study in health home-living elderly. *Panminerva Med*, **42** : 273-7.

Delattre J (2005). Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris –new. york.p :620.

Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot (2005). Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris*, 1 - 405.

Références bibliographiques

Delemasure S, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L (2006). Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines : approche fondamentale des mécanismes mis en jeu ; relations avec les données cliniques. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, **55** : 104-112.

Delphine W. (2009). Effets ototoxiques du toluène et ses spécificités métaboliques (phase I et II) chez le rat et le cobaye ; thèse de doctorat. Université Henri Poincaré – Nancy.

Depeille P, Cuq S, Mary I, Passagne A, Evrard D, Cupissol Vian L (2004). Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. *Mol Pharmacol.* **65(4)**: 897-905.

Desport JC, Couratier P (2002). Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16** : 253-259.

Deuchars K, Ling V (1989). P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Semin Oncol*, **16** : 156-65.

Di Marco A, Gaetani M, Dorigotti L, Soldati M, Bellini O (1963). Studi sperimentali sull'attività antineoplastica del nuovo antibiotico daunomicina. *Tumori*, **49** : 20317- 52. DjemaiZoueglache S, 2008).

Dominique B (1991). Diversité des mécanismes de résistance aux chimiothérapies anticancéreuses. *médecine/sciences*, **7**: 465-72.

Dröge W (2002). Free Radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* , **82(1)** : 47-95.

Durackova Z, Djrolo F, Houngbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M (2008). Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. *Mitochondrial medicine*.

Durande (1782). Notions Élémentaires de Botanique, 284.

Ece A, Gurkan F, Celik F, Boşnak M, Yel S, Balik H, Erel O (2007). Paraoxonase, total antioxidant activity and peroxide levels in marasmic children: relationships with leptin. *Clin Biochem*, **40 (9-10)**: 634-9.

Edeaga HO, Okwu DE, Mbaebie BO (2005). Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology*, **4 (7)**:685-688.

Eenester L, Daliner G, (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *BBA*, 1271 : 195-204.

El Boghdady NA (2013). Antioxidant and antiapoptotic effects of proanthocyanidin and ginkgo biloba extract against doxorubicin-induced cardiac injury in rats. *Cell Biochem Funct*, **31**: 344–351.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82: 70-77.

Références bibliographiques

El-Readi MZ, SafaaYE, Mohamed LA, Ahmad T, Michael W(2013). Modulation of multidrug resistance in cancer cells by chelidonine and Chelidonium majus alkaloids. *Phytomedicine*, **20**: 282– 294.

Endicot JA, Ling V (1989). The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*, **58**: 135-71.

Erlund I (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* **24** : 851-874.

Ernes S (1995). Arbres, arbustes et arbrisseaux en Algérie. Office des publications universitaires Alger-Ed, 686.

Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdely C (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*. **331**: 372-379.

Favier A (1997). Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Ann Biol Clin*, **55 (1)** : 9 - 16.

Favier A (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, 108 - 115.

Fellah S, Romdhane M, Abderraba M (2006). *J. société algérienne de Chimie*, **16**: 193.

Feng Z , Hu W, Tang M-s (2004). Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: A possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *PNAS*, **101 (23)**: 8598-860

Ferhoum F (2001). Analyse physico-chimique de la propolis locales selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (*Apis mellifica intermissa* et *Apis mellifica sahariensis*), mémoire de magister en technologie alimentaire. Université de M'hamed Bougara Boumerdès, 23-25.

Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugerini L, Ciccoli L, Giachetti D (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett*, **416**, 123-129.

Ferrari CKB (2001). Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal*, **8**, 175-184.

Flintoff WF, Essani K (1980). Methotrexat resistant Chinese hamster ovary cells contain a dihydrofolate reductase with an altered affinity for methotrexate. *Biochemistry*, **19** : 4321 - 7.

Fong WF, Wang C, Zhu GY, Leung CH, Yang MS, Cheung HY (2007). Reversal of multidrug resistance in cancer cells by *Rhizoma Alismatis* extract. *Phytomedicine*, (**14**) : 160– 165.

Références bibliographiques

Forment M & Roques H (1941). Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie, Ed. OFALAC, 59.

Fornari FA, Randolph JK, Yalowich Jc, Ritke MK, Gewirtz DA (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol*, **45 (4)** : 649-56.

Forrest GL, Gonzalez B (2000). Carbonyl reductase. *Chem. Biol. Interact*, **129** : 21-40.

Fournier P (1948). le livre des plantes médicinales et vénéneuses en France Ed Paul Lechevalier,tome III, paris, 356-361.

Francis C, Devergnas A (2012). Identifier les fleurs du Maroc Atlantique par leurs couleurs, *fiches botaniques des fleurs. Professeur agrégé de biologie aux lycées Lyautey de Casablanca*, **1-185**.

François CD, Niestlé SA (2000). *Dictionnaire Etymologique de Botanique*, Ed.Lausane (Switzerland), Paris.

FrontQuer P (1962). *Plantes Médicales El Discorides Renovado*, Ed Hebon S.A Barcelona, 426.

Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*, **2(3)** : 377-87.

Gambliel HA, Burke BE, Cusack BJ, Walsh GM, Zhang YL, Mushlin PS, Olson RD (2002). Doxorubicin and C-13 Deoxydoxorubicin Effects on Ryanodine Receptor Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **291** : 433-438.

Gammella E, Maccarinelli F, Buratti P, Recalcatti S, Cairo G (2014). The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, **5**: 25.

Ganther HE (1999). Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxinreductase. *Carcinogenesis*, **20 (19)**: 1657- 1666

Gardès-Albert M, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 91-96.

Gascon S (2015). Développement d'un modèle de suivi en imagerie TEP de la cardiotoxicité induite par chimiothérapie chez la souris. Mémoire du grade de maître en sciences des Radiations et imagerie biomédicale. Université de Sherbrooke: 1-15.

Gatti L, Zunino F (2005). Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. *Methods. Mol Med*, **111**: 127-148.

Références bibliographiques

Geisberg CA, Sawyer DB (2010). Mechanisms of anthracycline cardiotoxicity and strategies to decrease cardiac damage. *Current Hypertension Reports*, **12 (6)**: 404-410.

Genoux E (2006). Dérivés de flavonoïdes et de vérapamil comme ligands des transporteurs mrp1 et abcg2 : de la conception à l'activité anticancéreuse. Thèse de doctorat. Université de Grenoble : 7-29.

Gerard-Monnier D, Chaudiere J (1996). Metabolisme and antioxydant function of glutathion. *pathol.biol*, **44** : 77-85.

Gerhard R (1993). Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. *Lavoisier Tec and Doc*, 333-339.

Gerhard T, Gerhard H (1993). Rôle de la résistance multi-drogues dans les tumeurs génito-urinaires. *Progrès en Urologie*, **3**: 385-392.

Gerlach JH, Endicott JA, Juranka PF, Henderson G, Sarangi F, Deuchars KL, Gewirtz DA (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, **57** : 000-015

Ghedira, K (2005). Les flavonoides : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4** : 162-169.

Ghestem A, Seguin E, Paris M, and Orecchioni AM (2001). Le préparateur en pharmacie dossier 2èmeEd TEC&DOC. Paris, 275

Goskowicy MO, Friedlander MO, Eichenfield LF (1994). Endemic « lime » disease :phytodermatitis in San Diaego Country, **93**: 830.

Gottesman MM., Pastan1 (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter». *Annu Rev Biochem*, **62** :385-427.

Graham HD (1992). Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**: 801-805

Green PS, Leeuwenburgh C (2002). Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin- induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1588**: 94-101.

Griffiths, AJF, Suzuki DT (2002). Introduction à l'analyse génétique; traduction de la 7e édition américaine par Chrystelle Sanlaville ; révision scientifique de Denise Aragnol et Dominique Charmot, 3e éd. Paris ; Bruxelles: DeBoeck, 860.

Grotewold E (2006). The Science of Flavonoids, Springer, United States of America,1.

Gurvinder S, Anu TS, Aji A, Beena B, Ashok M, Ritu V, Shiv KA, Shivesh J, Rama M, Anand CB (2008). Protective effects of *Terminalia arjuna* against Doxorubicin induced Cardiotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, **117** : 123-129.

- Habig WH, Jakoby WB (1981).** Assays for differentiation of glutathion S-transferase. *Methods enzymol.* **77**: 398.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989).** Free radical in biology and medicine. 2nd Ed. *Clarendon Press*, Oxford University.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 2007.** Free Radicals in Biology and Medicine. 4 th ed. *Oxford university Press*, 20-31.
- Hamada H , Tsuruo T (1986).** Functional role for the 170-180-kDa glycoprotein specific to drug resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Nat l. Acad .Sci. USA*, **83**:7785-7789.
- Hamanaka RB, Chandel NS (2010).** Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*, **35**(9) : 505-13.
- Hamlat LN (2006).** Flavonoïdes et acides phenoliques de Pistacia lentiscus. Thèse de Magister. Ecole normale supérieure Kouba, Alger: 153.
- Hamm CW (1994).** New serum markers for acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, **331** :607-8.
- Hande KR (1998).** Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta*, **1400 (1-3)**: 173-184.
- Harrison R (2002).** Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now, *Free Radic-bio-med*, **33**: 774-797.
- Harshita C, Prasant KJ, Sriram S (2013).** Evaluation of Hydro-Alcoholic Extract of Eclipta alba for its Multidrug Resistance Reversal Potential: An In Vitro Study. *Nutrition and Cancer*, **65**(5): 775–780.
- Hasinoff BB, Herman EH (2007).** Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? *Cardiovascular Toxicology*, **7 (2)**: 140-144.
- Haslam ET (1998).** Bitterness and astringency. In: *Practical polyphenolics* (from structure to molecular recognition and physiological action) *Cambridge University Press*, 178-225.
- Hassan MH, El-Beshbishy HA, Aly H, Attia SM, Bahashwan SA, Ghobara MM (2014).** Modulatory effects of meloxicam on cardiotoxicity and antitumor activity of doxorubicin in mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **74 (3)**: 559-569.
- Haute Autorité de Santé (2010).** Service évaluation des actes professionnels. *Marqueurs cardiaques*, **5**.
- Hayes JD, Pulford DJ (1995).** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **30 (6)**: 445-600.

Références bibliographiques

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, **13**: 572–584.

Helga E, Judit H, Geng G, Rozália P, Dóra R, Orsolya K, Zsuzsanna S, Joseph M (2008). Chemoprevention and Inhibition of P-glycoprotein in Cancer Cells by Chinese Medicinal Herbs. *Phytother. Res.* **22**:1671–1676.

Hengrui Z, Zulong L, Lisha T, Junhua L, Mei Z, Fang X, Zheng W, Yuqi W, Sida S, Lihong H, Long Y (2012). Reversal of P-gp and MRP1-mediated multidrug resistance by H6, a gypenoside aglycon from *Gynostemma pentaphyllum*, in vincristine-resistant human oral cancer (KB/VCR) cells, **696**: 43–53.

Hennessy M, Spiers JP (2007). A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res*, **55**(1): 1-15.

Hershman DL, Shao T (2009). Anthracycline cardiotoxicity after breast cancer treatment. *Oncology (Williston Park)*, **23** (3): 227-234.

Heywood VH (1996). Les plantes à Fleurs, Ed. Nathan, Paris

Higgins CF, Linton KJ (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct. Mol. Biol.*, **11**(10): 918-926.

Hipfner DR, Deeley RG, Cole SP (1999). Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta*, **1461**(2) :359-376.

Hirose M (2002). Biology and modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies. *Int J Hematol*, **76** (2): 206-211.

Hollman PCH, Katan MB (1998). Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol. suppl*, **25**:237-239.

Hollman PCH, Van Trijp JMP, Gaag MVD, Mengelers MJB, Katan MB (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett*, **418**:152-156.

Hortobágyi GN (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs*, **54** : 1-4

Houlot R (1984). Techniques d'histologie et de cytologie. Paris : Edition Maloine

Hsiu-Chuan Y, Oberley TD, Vchitbandha S, Ye-Shih HO and StClair DK (1996). The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest*, **98** :1253-1260.

Hua L, Xiaoyu W, Peihong L, Yong L, Hua W (2008). Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, **16** (6): 67-73.

Références bibliographiques

Huang W, Liya D, Qiang H, Hairong H, Shan L, Xianmei Y, Xiaohui H, Yongjun D, Suqin S, Jie L, Xiaona J, Songmin J, Jun OL, Long Y (2010). Carbonyl Reductase 1 as a Novel Target of (2)-Epigallocatechin Gallate Against Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, **52** (2): 703-714.

Huang Y, Sadée W (2006). Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Letters*, **239**: 168-182.

Iarussi DP, Indolfi F, Casale P, Coppolino MA, Tedesco, MTDi Tullio (2001). Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood. *Curr Med Chem*, **8**, (13): 1649-1660.

Imai Y, Tsukahara S, Asada S, Sugimoto Y(2004). Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res.* **64**: 4346–4352.

Ioanna A, Fragiska S, Efstathios KI, Maria P, Constantinos S, Nektarios A, Paraskevi S, Vassilis G, Efstathios P, Dimitrios ThK (2007). Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **42** : 549–558.

Isaacs RJ, Davies S1, Wells NJ, Harris A1 (1995). Topoisomerase Ha and 13 as therapy targets in breast cancer. *Anti-Cancer Drugs*, **6** : 195-211.

Jacques B, André R (2004). *Biochimie métabolique* Ed ellipses .Paris: 217-225.

Jain D (2000). Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives. *Nuclear cardiology*, **7**:53-62.

Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, Keppler D (1994). ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance- associated proteun. *Cancer res (baltimore)*, **54**(18) : 4833-4836.

Jokić S, Velić D, Bilić M, Bucić-Kojić A, Plan inić M, Tomas S (2010). Modelling of the Process of Solid-Liquid Extraction of total Polyphenols from Soybeans. *Journal of Food Science*, **28**:206- 212.

Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG (1994). Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc*, **116**: 4846-4851.

Juliano RL, Ling V (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, **455** (1): 152-162.

Jung, K, Reszka, R (2001). Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **49** (2) :87-105.

Références bibliographiques

Kaiserová H, Šimůnek T, Van der Vijgh WJF, Bast A, Kvasničková E (2007). Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: Role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1772** :1065-1074.

Kamoun P, Lavoinne A, De Verneuil (2003). Biochimie et biologie moléculaire. EDS Flammarion Médecine-sciences, 114-115.

Kara Ali W, Ihoual S, Abidli N (2016). The Combination Therapy of Medicinal Plant *Globularia Alypum*, with *Adriamycin* Limits Free Radical Mediated Cardiac Injury in Rats. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, **36(1)**: 1-8.

Karumi Y, Onyeyili PA, Ogugbuaja VO (2004). Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam Apple) leaf extract. *J Med Sci*, **4(3)**:179-182.

Katarzyna S, Jan OS, Dorota KN, Jolanta T (2006). In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Cancer Letters*, **236** : 282–291.

Kerbel RS (2001). Molecular and physiologie mechanisms of drug résistance in cancer: an overview. *Cancer Metastasis Rev*, **20 (1-2)**: 1-2.

Kim Y, Ma AG, Kitta K, Fitch SN, Ikeda T, Ihara Y, Simon AR, Evans T, Suzuki YJ (2003). Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol*. **(63)2** : 368-377.

Kirtikar KR, Bsu BD (1984). Indian Medicinal plants. Ed Loit Bssu Mohan ,Alla hadd. India, 690-1173.

Kitagawa S, Tomohiro N, Tomoharu T, Yutaka N, Hiromi S, Hiromi T, Midori H, Go T (2005). Structure–Activity Relationships of the Inhibitory Effects of Flavonoids on P-Glycoprotein-Mediated Transport in KB-C2 Cells; *Biol. Pharm. Bull*, **28(12)** : 2274—2278

Koechlin RC (2006). Oxygene, stress oxydant et supplementations antioxydantes ou un aspect different de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr Clin Metab*, **20(4)** : 165–77.

Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 620-650.

Koivusalo R, Krausz E, Helenius H, Hietanen S (2005). Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA-mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs. *Mol Pharmacol*, **68(2)** :372-382.

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, de Groot A, Evstatieva LN (2002). Screening of plant Extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*, **13**: 8-17.

Références bibliographiques

Krippeit-Drews P, Lang F, Haussinger D, Drews G (1994). H₂O₂ induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch*, **426**:552-554.

Krishna R, Mayer LD (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. phrm. Sci*, **11 (4)** : 265-283.

Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R, Gansler T, Holland J, Frei E (2003). Cancer Medicine, 6TH EDITION American Cancer Society, BC Decker, Hmliton.

Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre JP (2004). Effet protecteur des flavonoides contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, **52** : 314-322.

Laikangbam S, Takhenchangbam DS, Wungyong K, Lalmuan K, Thokchom SDS (2015). Chemotherapy – Induced Cardiotoxicity. *Indian Medical Gazette*.

Larousse (1997). Encyclopédie des plantes médicinales. Bordas Ed, 262-263.

Lauzon C (2008). Etude des mécanismes de toxicité induite par l'adriamycine et sensibilisation des cellules cancéreuses par le choc thermique. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en chimie. Université du québec à montreal: 1-18.

Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY (2003). Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem*, **51**: 7292-7295.

Lefrak E, Pit'ha J, Rosenheim S, Gottlieb JA (2006). Clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity, **32(2)**: 302-314.

Lehnert M (1996). Clinical Multidrug Resistance in Cancer : A Multifactorial Problem. *Eur. J. Cancer*, **32 (6)**: 912-920.

Lei Y, Dan-Dan W, Zhong C, Jun-SW, Ling-Yi K (2011). Reversal effects of traditional Chinese herbs on multidrug resistance in cancer cells, **25 (19)**:1885–1889.

Leier, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG, Keppler D (1994). The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J.biol.obem*, **269 (45)**: 27807-27810.

Lesgards JF, Durand P, Lassarre M, Stocker P, Lesgards G, Lanteaume A, Prost M, Lehucher- Michel MP (2002). Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. *Environmental Health Perspectives*, **110**: 479-486.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2001). Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRPI (ABCCI) and related transporters. *Toxicology*, **167 (1)** : 3-23.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2001). Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRPI (ABCCI) and related transporters. *Toxicology*, **167(1)**: 3-23.

Références bibliographiques

Leslie EM, Oeeley RG, Cole SP (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP 1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*, **204 (3)**: 216-237.

L'espérance S (2008). Déterminants moléculaires de la chimiorésistance dans les cancers ovariens avancés. Thèse de doctorat en biologie cellulaire et moléculaire. Université laval Québec : 19-62.

Li T, Singal PK (2000). Adriamycin induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation*, **102**: 2105–10.

Lim JC (2008). Activation of beta-catenin signalling by GSK-3 inhibition increases p-glycoprotein expression in brain endothelial cells. *J. Neurochem.* **106**: 1855–1865

Lindau-Sehpard B, Shaffer J (1993). Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. *Free Rad Biol Med*, **15** : 581 - 8.

Ling V (1997). Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol*, **40**: 3-8.

Ling V (1986). Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature*, **324**: 485-489.

Linton KJ (2007). Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology*, **22(2)**:122-130.

Linton KJ, Higgins CF (1998). The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol. Microbiol*, **28 (1)**: 5-13.

Liu X (2003). Protection of Pifithrin- α and Melatonin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Thesis of doctor of philosophy. East Tennessee State University*, 13-24.

Liu X, Chen Z, Chua CC, Ma YS, Youngberg GA, Hamdy R, Chua BHL (2002). Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**: 254-263.

Lockhart AC, Tirona RG, Kim RB (2003). Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy». *Mol Cancer Ther*, **2 (7)**: 685-698.

Lodish B, Matsudaira K, Krieger S, Zipursky D (2005). Biologie moléculaire de la cellule. Edition DeBoeck.

Longley DB, Johnston PG (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*, **205**: 275-292.

Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T (1994). P53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science*, **266 (5186)**: 807-810.

Magnano LC, Martinez CN, Andrade Gonzalez X, Bosch X (2014). Cardiac complications of chemotherapy: role of prevention. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, **16 (6)**: 312.

Références bibliographiques

- Mahmoud N, Pizza C, Aquino R, De Tommasi N, Piacente S, Colman S, Burke A, Makris DP, Boskou G, Andrikopoulos NK (2007).** Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*, **98**: 2963-2967.
- Maluf FC, Spriggs D (2002).** Anthracyclines in the Treatment of Gynecologic Malignancies. *Gynecologic Oncology*, **85**: 18-31.
- Manach C, Morand C, Texier O, Favier ML, Agullo G, Regerat F, Remesy C (1995).** Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*, **125**: 1911-1922.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesty C, Jimenez L (2004).** Polyphenols: Sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, **79 (5)**: 727-747.
- Manju S, Shaoqin G (2013).** Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer. *Biotechnology Advances*, **31**: 1397-1407.
- Marcot I, Migeon C, Parache RM, Marchal S, Virion JM (1997).** Comparative evaluation of quantitative immunocytochemical and biochemical assays for hormone receptors in breast cancer. *Bulletin du Cancer*, **84**: 613-18
- Marie JP (1990).** Le phénomène de résistance multiple aux anticancéreux : les gènes MDR et la pGp. *médecine/sciences*, **6**: 443-8.
- Markham KR (1982).** Techniques of flavonoids identification. *Academic press, London*. Chap. 1 and 2: 1-113.
- Marnett LJ (1987).** Peroxyl free radicals: potential mediators of tumor initiation and promotion. *Carcinogenesis*, **8**: 1365.
- Martin F (2003).** Vannin-1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de Doctorat de l'Université de la Méditerranée, centre de l'immunologie de Marseille- Luminy NCERM U 136-CNRS MR6102, 17-19.
- Mason JW, Bristow MR, Billingham ME, Daniels JR (1978).** Invasive and noninvasive methods of assessing adriamycin cardiotoxic effects in man : superiority of histopathologic assessment using endomyocardial biopsy. *Cancer Treat Rep*, **62**: 857-64.
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999).** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, **32**: 595-603.
- Mazvet M, Moulin M, Llach-Martinez A, Chargari C, Deutsch E, Gomez AM, Morel E (2013).** Complications of chemotherapy, a basic science update. *Presse Medicale (Paris, France* : 1983), **42 (9 Pt 2)** : 352-61.
- Mazunder UK, Gupta M, Rajeshwar Y 2005.** Antihyperglycemic effect and antioxidant potential of *phyllanthus niruri* (euphorbiaceae) in streptozotocin induced diabetic rats.

Références bibliographiques

European Bulletin of Drug Research, **13 (1)** : 13 - 23.

Meddour A, Yahia M, Benkiki N, Ayachi A (2013). Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa* L. *Lebanese Science Journal*, **14**: 1.

Medic-Saric M, Jasprica I, SmolcicBubalo A, Momar A (2003). Optimization of chromatographic conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. *Croatica Chemica Acta*, **77 (1-2)**:361-366.

Mejrib J, Manef A, Mejria M (2010). Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L. Influence of drying, hydrodistillation duration and plant parts. *Industrial Crops and Products*, **32**: 671-673.

Meschini S, Calcabrini A, Monti E, Del Bufalo D, Stringaro A, Dolfini E, Arancia G (2000). Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*, **87(5)**: 615-628.

Metzger FWR (1932). Efficacy to the Japanese beetle of extracts made from plants immune to attack. USDA Technical Bulletin N° 299.

Middleton, Elliott J (1996). Biological properties of plant flavonoids an overview. *Int. J. Pharmacol.* **34 (5)**: 344-348.

Milane H (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur*: 13-36.

Minotti G, Cairo G, Monti E (1999). Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J*, **13**:199-212.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L (2004). Anthracyclines : molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*, **56** : 185-229.

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE (1999). Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res*, **59 (1)**:8-13.

Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S (2005). Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci*, **76 (13)** : 1439-1453.

Mohammad YHB, Mehrdad I, Fatemeh M, Shahireh OT, Fatemeh K, Javad B (2011). Farnesiferol A from *Ferula persica* and Galbanic Acid from *Ferula szowitsiana* Inhibit P-Glycoprotein-Mediated Rhodamine Efflux in Breast Cancer Cell Lines. *Planta Med*, **77**: 1590-1593.

Références bibliographiques

Molyneux P (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J.Sci. Technol*, **26** : 211-219.

Monsuez JJ, Charniot JC, Vignat N, Artigou JY (2010) .Cardiac side-effects of cancer chemotherapy.*Int Cardiol*, **144** : 3-15.

Moon YJ, Wang X, Morris ME (2006). Dietary flavonoids : Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro*,**20** :187-210.

Morel Y, Mermoud N, Barouki R (1999). An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H₂O₂ and NFI. *Mol. Cell. Biol*, **19**: 6825-6832.

Moridani MY, Pourahmad J, Bui H, Siraki A, O'Brien PJ (2003). Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 243-253.

Morin PJ (2003). Drug résistance and the microenvironment: nature and nurture. *Drug Resist Updat*, **6(4)**: 169-172.

Morris CJ, Earl JR, Trenam CW, Blake DR (1995). Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **27**, 109-122.

Morris ME, Zhang S (2006). Flavonoid–drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci*, **78**: 2116–2130.

Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, **72** :145-171.

Moure A, Franco D, Sineiro J, Dominguez H, Nunez MJ, Lema JM (2000). Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 3890-7.

Mross K, Mayer V, Hamm K, Burk K, Hossfeld DK (1990). Pharmacokinetics and metabolism of iodo- doxorubicin and doxorubicin in humans. *European . Journal of Clinical pharmacology*, **39** :507-513.

Müller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL (1994). Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance- associated protein results in increased ATP- dependent glutathion S- conjugate transport. *Pror. Natl. Acad. Sci. U. S.A*, **91 (26)**: 13033-13037.

Mussett S (2002). Etude bibliographique de l'expression du phénotype MDR dans les espèces humaine et canine. Thèse de doctorat de vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire de Lyon:19-152 ;

Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Phamacology*, **33** : 2-16.

Références bibliographiques

Nathalie Andrieu-Abadie, Thierry Levade, Guy Laurent, Stéphane Hatem, Jean-Jacques Mercadier (1999) ; Le céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicine ? *médecine/sciences*, (15) : 1322-4

Nathalie C (2014). Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique, Université de REIMS CHAMPAGNE- ARDENNE Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé et Université LIBANAISE, 18.

Newman PR, Timmerman BN, Marby TJ (1974). Laboratory manual for the systematic identification of flavonoids.

Nicolas JP(1999). Plantes médicinales des MAYAS K'ICHE, 203-204.

Nijveldt RJ, Nood EV, Hoorn DECV, Boelens PG, Norren KV, Leeuwen AMV (2001). Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 74 : 418-25.

Nohl H, Gille L, Staniek K (2004). The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration. *Biochemical Society Transactions*, 51 : 223 - 229.

Nur Alam Md, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143–152.

Obermeier M. T., White R. E., Yang C. S., 1995. Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Pharm. Res.* 25(6): 575-84.

OctaviaY, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, 52 (6): 1213-1225.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*. 95(2): 351-358.

Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK, Moreno AJ, Wallace KB (2004). Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 200 (2): 159-168.

Olson RD, Mushlin PS (1990). Doxorubicin cardiotoxicity : analysis of prevailing hypotheses. *FABSEB J*, 4 : 3076-86.

Olson RD, Mushlin PS, Brenner DE, Fleischer S, Cusack BJ, Chang B, Boucek RJ (1998). Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, Doxorubicinol. *Medical Sciences*, 85 : 3585-3589).

Références bibliographiques

- Organisation Mondiale de la Santé (2006).** Le cancer, Aide-mémoire.
- Organisation Mondiale de la Santé (2013).** Le cancer, Aide-mémoire.
- Osama M, Ashour AA, Elberry AM, Alahdal AM, Al Mohamadi AA, NagyAB, Abdel-Naim EA, Abdel-Sattar AMM (2011).** Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *Med Sci Monit*, **17(4)**: 110-115.
- Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J (2007).** Adriamycin-induced myocardial toxicity: New solutions for an old problem. *International journal o cardiology*, **117**: 6-15.
- Ozenda P (1958).** Flore du Sahara Septentrional et Central. C.N.R.S, Paris.
- Ozenda P (2000).** Les Végétaux : Organisation et diversité biologique, Ed. Dunod, 425.
- Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, Ruggiero FM, Petrosillo G (2014).** Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta*, 1837 (4) : 408-417.
- Paranka NS, Dorr RT (1994).** Effect of doxorubicin on glutathione and glutathione-dependent enzymes in cultured rat heart cells. *Anticancer Res*, **14 (5A)**:2047-52.
Pédiatriques, **2(10)** : 988-999.
- Pein F, Vassal G, Sakiroglu C, Tournade MF, Lemerle J (1995).** Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention. *Archives Pédiatriques*, **2(10)** : 988-999.
- Pelmont j (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. *Presses universitaires de Grenoble*.
- Peluso MR (2006).** Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp. Biol. Med*, **231** : 1287- 1299.
- Pereira GC, Silva AM, Diogo CV, Carvalho FS, Monteiro P, Oliveira PJ (2011).** Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: from doxorubicin to carvedilol. *Current Pharmaceutical Design*, **17 (20)** : 2113-2129.
- Peter N, Campbell A, Anthony D (2002).** Biochimie illustrée. *Maloine éd*, 213-238.
- Petit T (2004).** Toxicité cardiaque des anthracyclines. *Bull Cancer*, **91** : 59-65.

Références bibliographiques

- Pietta PG (2000).** Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035-1042.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, **16**: 233–239.
- Podsdek A (2007).** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT*. **40**:1-11.
- Potter A1, Gollahon KA, Palanca BJ, Harbert, MJ, Choi YM, Moskovitz, AH, Potter JD, Rabinovitch PS (2002).** Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin. *Carcinogenesis*, **23** (3) : 389-401
- Potter AI, Rabinovitch PS (2005).** The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs». *Mutat Res*. **572**(1-2) : 27-44.
- Praveen B, Chandrasekar MJN Nanjan M J, Satishkumar MN, Suresh B. (2008).** *Phyllanthus maderaspatensis*, a dietary supplement for the amelioration of adriamycin-induced toxicity and oxidative stress in mice. *J Nat Med*, (**62**):149–154.
- Price MP, Butler LG (1977).** Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **25**: 1268-1273.
- Priebe W, Perez SR (1993).** Design and tumor targeting of anthracyclines able to overcome multidrug resistance: a double-advantage approach. *Pharmacol Ther*, **60** (2) : 215-34.
- Priyadarsini KI (2005).** Molecular Mechanisms Involving Free Radical Reactions of Antioxidants and Radioprotectors. *Founder's Day Special*: 1-6.
- Quezel p, Santa S (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome II, Ed. CNRS, Paris, 590-593.
- Quiles JL, Huerta JR, Battino M, Mataix J, Ramirez-Tortosa MC (2002).** Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, **180**: 79-95.

Références bibliographiques

- Raghav SK, Gupta B, Agrawal C, Goswami K, Das HR (2006).** Anti-inflammatory effect of *Rutagraveolens* L. in murine macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, **104**: 234-239.
- Rahman K (2007).** Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, **2(2)** : 219–36.
- Raja S, Nazeer Ahamed KFH, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadyay A, Mukherjee PK, (2007).** Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of ethnopharmacology*, **109**: 41-47.
- Rajnerayanama K, Reddy M, Charluvadi MR, Krishna DR (2001).** Bioflavonoids: Classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal*
- Ramos S (2007).** Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemopreventive. *Journal of Nutrition Biochemistry*, **18** :427-442.
- Rao AV, Rao LG (2007).** Carotenoids and human health. *Pharmacol Res*; **55(3)**: 207-16.
- Rao VA (2013).** Iron chelators with topoisomerase-inhibitory activity and their anticancer applications. *Antioxidants & Redox Signaling*, **18 (8)** : 930-955.
- Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S (2004).** Effect of *Eugenia Jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sciences*, **75** : 2717 – 2731.
- Rechner AR, Spencer JPE, Kuhine G, Rice-Evans C (2000).** Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid and derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med*, **30**: 1213-
- Rehman A, Nourooz J, Moller W (1999).** Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett*, **448**: 120-122.
- Remesy C, Manach C, Demigne C, Texier O, Regeat F (1996).** Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* **32 (1)** :17-27.
- Reyes JE, de Vries G, Jansen P1, Muller M (2000).** The (patho)physiological functions of the MRP family. *Drug Resist Updat*, **3**: 289-302.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20**: 933-956.
- Riou JF, Pommier Y (1994).** La résistance pléiotropique liée aux topo-isomérases. *Bull. Cancer (Paris)*, **81(2)**: 62-68.
- Robert J (2011).** Réversion de la « multidrug resistance » des cancers : espoirs et déceptions. *Bull Acad Vét.* **164** :32011

Références bibliographiques

Robert J 2011. Réversion de la *MultiDrug Resistance* par inhibition de la glycoprotéine P. La Lettre du Pharmacologue, **25** (4) .

Robert J, Gianni L (1993). Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surveys*, **17** : 219-51.

Robert J, Jarry C (2003). Multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem, Sciences*, **46**: 4805-4817. **75** : 2717 – 2731.

Salvayre AN, Salvayre R (2005). Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : implication en physiopathologie vasculaire. *OCL*, **12** (5) : 433-438.

Sasaki Y(2006). Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma?. *J Gastroenterol*, **41**:1135–1148.

Sathishsekar D, Subramanian S (2005). Antioxidant properties of *Momordica Charantia* (bitter gourd) seeds on Streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr* ,**14** (2) : 153 - 158.

Sayed-Ahmed MM, Khattab MM, Gad MZ, Osman AM (2001). Increased plasma endothelin-1 and cardiac nitric oxide during doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Pharmacol Toxicol*, **89**: 140–144.

Scambia G, Ranelletti FO, Panici PB, De Vincenzo R, Bonanno G ,Ferrandina G, Piantelli M, Bussa S, Rumi C, Cianfriglia M (1994). Quercetin potentiates the effect of adriamycin in a multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cell line: P-glycoprotein as a possible target. *Cancer Chemother Pharmacol*, **34**: 459-464.

Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs*, **21**(1) : 24-8.

Schinkel AH, Smit JJM, Van Tellinge O (1994). Disruption of the mouse *mdr 1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*, **77**: 491-502.

Schisler NJ, Singh SM (1989). Effect of ethanol *in vivo* on enzymes which detoxify oxygen free Radicals. *Free Radical Biol. Med*, **7**: 117-123.

Schrder P, Krutmann J (2005). Environmental Oxidative Stress Environmental Sources of ROS. *The Handbook of Environmental Chemistry*, **2** :19-31.

Schwartz RG, McKenzie WB, Alexander J, Sager P, Souza A, Manatunga A (1987). Congestive heart failure and left ventricular dysfunction complicating doxorubicin therapy : seven-year experience using radionuclide angiocardiology. *Am J Med*, **82** : 1109-18.

Seghiri R (2008). Recherche et Détermination Structurales des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*, Thèse Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat d'Etat En Chimie Organique-Option Phytochimie. Université Mentouri-Constantine, 53.

Références bibliographiques

Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandol E, Yeşilbursa D, Serdar A (2006). Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Clin Biochem*, **39(8)**: 794-803.

Servais S (2004). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3, *Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1*, France, 19-35.

Seval Y, Ahmet A, Engin S, Izzet K, Songul O (2006). Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, **218**: 164–171

Shapiro AB, Ling V (1994). ATPase activity of purified and reconstituted Pglycoprotein from Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **269**: 3745-3754.

Shu-Qi W, Xia L, Xiao-Ning W, Na-Na W, Hong-Xiang L (2011). Coumarins from *Cicuta virosa* and their modulating effects on multidrug-resistant (MDR) tumors. *Phytochemistry Letters*, **4**: 97–100.

Simić A, Manojlović D, Šegan D, Todorović M (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, **12**: 2327-2340

Singal PK, Deally CM, Weinberg LE (1987). Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *Journal of Molecular & Cellular Cardiology*, **19 (8)**: 817-828.

Singal PK, Iliskovic NT, Li Kumar D (1997). Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *Faseb J*, **11 (12)** : 931-936.

Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N (2000). Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular & Cellular Biochemistry*, **207 (1-2)**: 77-86.

Singal PK, Petkau A, Gerrard JM (1988). Free Radicals in health and disease. *Mol. Cell.*

Sinha BK, Mimnaugh EG, Myers CE (1989). Adriamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells. *Cancer Res*, **49** : 3844-3848.

Sinha BK, Mimnaugh EG, Myers CE. (1989). Adriamycin activation and oxygen free Radical formation in human breast tumor cells. *Cancer Res*, **49** : 3844-3848.

Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK (1995). Probucol protects against Adriamycin Cardiomyopathy Without interfering with its antitumor effect. *Circulation*, **91** : 10-15.

Songyot A, Pranee L, Melissa MS, Suresh VA, Porn-ngarm L (2002). Modulation of P-glycoprotein expression and function by curcumin in multidrug-resistant human KB cells. *Biochemical Pharmacology*, **64**: 573-582.

Références bibliographiques

Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA (2004). ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res*, **53** (3): 235-243.

Sung-Tsai Y, Tzer-Ming C, Shih-Yun T, Yen-Hui C (2007). Tryptanthrin inhibits MDR1 and reverses doxorubicin resistance in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **358** : 79–84

Swain, SM, Whaley FS, Gerber MC (1997). Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol*, **15** : 1318-32 .

Sylwia B, Magdalena C, Teresa W, Malgorzata DZ, Maciej Z, Piotr D (2012). In vitro effect of quercetin on human gastric carcinoma: Targeting cancer cells death and MDR. *Food and Chemical Toxicology*, **50**: 3375–3383.

Szent-Györgyi A (1938). Therapeutic properties of vitamins. *Presse Medicale*, **46** (995):

Szulawska A, Czyz M (2006). Molecular mechanisms of anthracyclines action. *Postepy Hig Med Dosw*, **60** :78-100.

Tabar TJ (2011). Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire et étude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. Thèse de doctorat, Académie Universitaire Wallonie-Europe, 29

Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR (2013). Doxorubicine: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*, **65**(2) :157-70.

Takemura G, Fujiwara H (2007). Doxorubicine-induced Cardiomyopathy. From the Cardiotoxic Mecanisme to Management. *progress in cardiovascular Diseases*, **49**: 330-352.

Takemura G, Fujiwara H (2007). Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **49** (5) : 330-352.

Taleb-Senoucia D, Ghomaria H, Kroufa D, Bouderalaa S, Prostb J, Lacaille-DuboisMA, Bouchenaka M (2009). Antioxidant effect of Ajuga iva aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, **25** : 221-235.

Taleb-Senoucia D, Ghomaria H, Kroufa D, Bouderalaa S, Prostb J, Lacaille-Dubois MA, Bouchenaka M (2009). Antioxidant effect of Ajuga iva aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*, **25** : 221-235.

Tannock, Ian, et Richard P. Hill (1998). *The basic science of oncology*, 3éd. New York: McGraw-Hill Health Professions Division, 539.

Tew KD (1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res*, **54** (16): 4313-20.

Références bibliographiques

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol*, **279**: L1005- L1028

Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U (2006). New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetic. *Journal o Molecular and Cellular cardiology*, **41**: 389-405.

Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M (2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis.*J.Periodontol*, **80 (11)** :1799-808.

Torres de pinedo A, Pen alver P,Morales JC. (2007). Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidant : structureactivity relationship. *Food Chemistry*, **103**: 55-61.

Tsuruo TM, Naito A, Tomida N, Fujita, Mashima T, Sakamoto H, Haga N (2003). Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sei*, **94 (1)**:15-21.

Twentyman PR (1992). MDRI (P-glycoprotein) gene expression - implications for resistance modifier trials. *J. Natl .Cancer Inst*, **84**:1458-1460.

Valérie B (2008). Les propriétés antiangiogéniques des flavonoïdes, mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en chimie. Université du Québec à Montréal, 37-44.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39** : 44-84.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological interaction*, **160**: 1-40.

Van Acker S, Tromp M, Haenen GRMM, van der Vijgh W, Bast A (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochem. Biophys. Res. Co*, **214(3)** :755-9.

van Acker S, Voest EE, Beems DB (1993). Cardioprotective properties of *O*-(beta hydroxyethyl)-rutosides in doxorubicinpretreated BALB/c mice. *Cancer Res*, **53**:4603 7.

Van Acker SABE, van den Berg D.J, Tromp MNJ.L, Griffioen DH, van Bennekom W.P, van der Vijgh W.J.F., Bast A (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med*, **(20)**: 331-342.

van Zanden J.J, Wortelboer HM, Bijlsma S, Punta A., Ustab M, van Bladeren P.J, Rietjens IMCM, Cnubben, NHP(2005). Quantitative structure activity relationship studies on the flavonoid mediated inhibition of multidrug resistance proteins 1 and 2. *Biochem. Pharmacol*, **69**: 699–708.

Références bibliographiques

Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ (2007). Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Heart Metab*, **35**:1-4.

Vanessa C, Christine M, Catherine B, Nicole C (2003). The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of compound. *Am J Physiol*, **284**:G980-988.

Vasquez-Vivar j, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA and Kalyanaraman B. (1997). Endothelial nitric oxide synthetase dependent superoxyde generation from adriamycin. *Biochemistry*, **36** :11293-7.

Victor K, Igor KV, Roger T, Armelle TM, Benjamin W, Veronique PB, Thomas E (2013). Cytotoxicity of *Elaeophorbium drupifera* and other Cameroonian medicinal plants against drug sensitive and multidrug resistant cancer cells. *Complementary and Alternative Medicine*, **13**:250.

Victor K, Antoine HL, Nkuetec AT, Mbavengb BW, Hippolyte K, Pierre T, Thomas E (2014). Cytotoxicity and modes of action of 4-hydroxy-2,6-dimethoxychalcone and other flavonoids toward drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cell lines. *Phytomedicine*, **21**: 1651–1657.

Volkova M, Russell R (2011). Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current Cardiology Reviews*, **7**(4) : 214-220.

Volm M (1998). Multidrug resistance and its reversal. *Anticancer res*, **18** (4): 2905-2917.

Walker DB (2006). Serum Chemical Biomarkers of Cardiac injury for Nonclinical Safety Testing. *Toxicologic Pathology*, 34:94-104.

Wallace KB (2003). Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacology & Toxicology*, **93**(3): 105-115.

Wang IK, Lin-Shiau SY, Lin JK (1999). Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome C release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60. *cells European Journal of Cancer*, **35**, 1517-25.

Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C(2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules ?. *Free Radical Biology & Medicine*, **36**: 838-849.

Wisinee C, Chadarat A, Harald G, Pornngarm L (2011). *Stemona* alkaloids, from traditional Thai medicine, increase chemosensitivity via P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Phytomedicine*, **18**: 199–204.

Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K (2000). Anthracycline induced cardiotoxicity : Clinical course, risks factors, pathogenesis, detection and prevention : review of the literature. *Med Sci Monit*, **6** :411-20 .

Xiao-Jian Y, Li-Hua G, Fei-Yun Z, Ke-Jun C, Zhe-Sheng C, Zhi S (2014). Triterpenoids as reversal agents for anticancer drug resistance treatment. *Drug Discovery Today*, **19** (4)

Références bibliographiques

Xu X, Persson HL, Richardson DR (2005). Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Molecular Pharmacology*, **68 (2)**: 261-271.

Xu X., Persson HL, Richardson DR (2005). Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. *Molecular Pharmacology*, **68 (2)**, 261-27.

Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK (2003). Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacol Res*, **48(4)**: 377–382.

Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S (2014). Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1845 (1)**: 84-89.

Yang CJ, Horton JK, Cowan KH, Schneider E (1995). Cross-Resistance to Camptothecin Analogues in a Mitoxantrone-resistant Human Breast Carcinoma, Cell Line Is Not Due to DNA Topoisomerase I Alterations. *Cancer Res*, **55 (18)**: 4004-4009.

Yao N, Eisfelder B, Marvin J, Greenberg JT (2004). The mitochondrion—An organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **40**: 596–610.

Yasuyuki S, Tomomi S, Kayoko S, Naohide Kinae, Sadao H (1997). Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology Letters*, **92** : 1-7.

Yi Z, Yan Y, Liang Y, Zeng B (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of PericarpiumCitriReticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. *LWT*, **41**: 597 603.

Yoshida N (2008). Inhibitory effects of terpenoids on multidrug resistance-associated protein 2-and breast cancer resistance protein-mediated transport. *Drug Metab. Dispos*, **36**: 1206–1211.

Zellagui A, Belkassam A, Belaidi A, Gherraf N (2012). Environmental impact on the Chemical Composition and yield of essential oils of Algerian *Ruta Montana* (Clus.) L and their antioxidant and antibacterial activities. *Advances in Environmental Biology*, **6(10)**: 2684-2688,

Zeshaan AR, Rubin EH (2003). Mechanisms of résistance to topoisomérase I-targeting drugs. *Oncogene*, **22**: 7296-7304.

Zhang S, Yang X, Coburn RA, Morris ME (2005). Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol*, **70**: 627–639.

Références bibliographiques

Zhang S, Yang X, Coburn RA, Morris ME (2005). Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochem. Pharmacol*, **70**: 627–639.

Zheng X, Zhang L, Wang W, Wu Y, Zhang Q, Feng W (2011). Anti-diabetic activity and potential mechanism of total flavonoids of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in rats induced by high fat diet and low dose STZ. *J. of Ethnopharmacol*, **137**: 662-668.

Zhou Q, Chowbay B (2002). Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30**: 1063-1074.

Zucchi R, Danesi R (2003). Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents*, **3**: 151-71.

Effet des extraits de la plante médicinale *Ruta montana*(الفيجل) sur la cardiotoxicité induite par la doxorubicine et sur la multi-drug résistances (MDR) des cellules cancéreuses ovarien (A2780)

Résumé

L'objectif principal de cette étude est l'évaluation de l'effet préventif de la plante médicinale *Ruta montana*, sur le stress oxydant induit par la DOX et de ses propriétés pour la réversion de la résistance à la doxorubicine des lignées cellulaire cancéreuses des ovaires humaine (A2780 DX3). Les extraits organiques ont été obtenus par macération en utilisant trois solvants: éther de pétrole, acétate d'éthyle et butanolique. Les rendements respectifs sont : 15.04%, 3.55% et 25.14%. Le screening phytochimique sur l'extrait méthanolique a montré que cette plante contient ; des flavonoïdes, des saponosides, des tanins, des coumarines, des composés réducteurs, et des alcaloïdes sels. l'étude quantitative a révélé que l'extrait butanolique (EBRM) est le plus riche en flavonoides ($80.85 \pm 0.78 \text{ mgEQ/g}$ extrait sec) suivie par l'extrait acétate d'éthyle (EAERM) ($15.27 \pm 0.62 \text{ mgEQ/g}$ extrait sec), puis l'extrait éther de pétrole (EEPRM) qui représente la teneur le plus faible ($9.71 \pm 1.13 \text{ mgEQ/g}$ extrait sec), alors que la teneur totale en composés phénolique est de 687.5, 595.83 et 146.33 mg EAG/g E dans EBRM, EAERM et EEPRM respectivement. Qualitativement, l'analyses effectuées par CCM des trois extraits brut a montré la présence des anthocyanidin 3-glycosides, flavones et flavonols glycosides (hétérosides), flavonols avec 3-OH libre, flavonones ou aurones, isoflavones, des acides phénols, Flavonols et 4-OH chalcones. L'évaluation de l'activité antioxydante par la méthode de réduction de radical libre DPPH a montré que l'EAERM est le plus actif comparé aux différents extraits ($\text{IC}_{50} = 0.126 \pm 0.002 \text{ mg/ml}$), suivi par l'EBRM ($\text{IC}_{50} = 0.135 \pm 0.0006 \text{ mg/ml}$) puis l'EEPRM ($0.185 \pm 0.002 \text{ mg/ml}$). L'étude de l'effet préventif de l'EAERM, sur le stress oxydant induit par la DOX chez des rats wistar montre clairement que la DOX (15 mg/kg i.p) induit chez l'animal une cardiotoxicité caractérisé par une augmentation de l'activité des enzymes cardiaque (CKMB, LDH, l'ALAT et l'ASAT) dans le plasma, Une augmentation du taux du mlonyldialdéhyde (MDA) et de l'activité des enzymes antioxydants catalase (CAT) et Glutathion- S-transférase (GST) cytosolique cardiaques et une diminution du taux de glutathion réduit (GSH) cytosolique avec différents altérations histologiques au niveau du cœur. Cependant, le prétraitement des rats par EAERM (100 mg/kg par voie orale pendant 15 jours) a provoqué une diminution des activités des enzymes cardiaques de 24 %, 35, 69%, 21,25 % et 8,10 % respectivement pour le CKMB, LDH, l'ALAT et l'ASAT. D'autre part, le prétraitement par l'extrait a également entraîné une nette amélioration du statut antioxydant dans le cœur par la diminution du taux de MDA de 29,7 % et de l'activité des enzymes antioxydants de 17,91% et 29,78% respectivement pour la CAT et la GST.

De plus, le prétraitement des rats par l'extrait a augmenté le taux du GSH de 83,76 % comparé aux rats traités par la DOX seule. L'étude histologique a montré que l'extrait a provoqué une diminution des dommages sévères du cœur distingué chez les rats traités par la DOX. La réversion de la résistance multiple à la DOX des cellules d'adénocarcinome ovarien (A2780 DX3) par le test (MTT) a montré que EAERM semble avoir l'effet de réversion de la résistance le plus puissant, d'une manière dose-dépendante avec des facteur de réversion (FR) de 8.62, 05.77 et 02.30 respectivement pour les concentrations 40, 10 et 2.5 mg/ml, suivi par EBRM (FR=05.07 et 02.43 respectivement pour les concentrations 40 et 10 mg/ml), puis EEPRM qui est le plus faible dans la réversion de la résistance avec un faible FR allant de 1.01 à 1.08. La présente étude suggère que l'EAERM peut atténuer le stress oxydatif impliqué dans la pathogénèse de la cardiotoxicité induite par la DOX et peut reverser la résistance multiple à la DOX.

Mots clés: *Ruta montana*, Doxorubicine, Cardiotoxicité, Multi-drug résistance, Stress oxydant, Antioxydant, Flavonoides.

Effect of medicinal plant extracts *Ruta montana* (الفجل) on cardiotoxicity induced by doxorubicine and their effect on multi-drug resistance (MDR) for DOX in ovarian cancer cells (A2780 DX3)

Abstract

This study was conducted to search for the preventive effect of medicinal plant *Ruta montana* extract on oxidative stress induced by doxorubicine (DOX) and its properties to reverse doxorubicin resistance in ovarian cancer cell line (A2780). Organic extracts were obtained by maceration with three solvents: petroleum ether, ethyl acetate and butanol. The yields were: 15,04%, 3,55% and 25,14%. respectively. A phytochemical screening in methanol extract revealed that the plant contain the flavonoids, saponins, tannins, coumarins, reducing component and the alkaloids. The quantitative study showed that the butanolic extract (BERM) has significant amount of flavonoids (80.85 ± 0.78 mg EQ / g dry extract), followed by ethyl acetate extract (AEERM) (15.27 ± 0.62 EQ / g dry extract) and petroleum ether extract has the lowest flavonoids content (PEERM) (9.71 ± 1.13 mgEQ/g dry extract). When the total phenolic contents was: 687.5, 595.83 and 146.33 mg EGA / g dry extract, in the BERM, AEERM and PEERM respectively. The qualitative analysis of the three methanolic crude extract via thin layer chromatography (TLC) has shown the presence of the anthocyanidin 3-glycosids, flavons et flavonols glycosids (hétérosids), flavonols avec 3-OH libre, flavonons ou aurons, isoflavons, the phénolic acids, Flavonols et 4-OH chalcones. The évaluation of antioxidant activity by the reduction of free radical DPPH method showed that The highest DPPH radical scavenging activity was observed with AEERM ($IC_{50} = 0.126 \pm 0.002$ mg/ ml), followed by BERM (0.135 ± 0.0006 mg/ ml) and PEERM ($IC_{50} = 0.185 \pm 0.002$ mg/ ml). The study of preventive effect of AEERM on oxidative stress induced by DOX in wistar rats clearly show that DOX (15 mg/kg i.p) induced animal cardiotoxicity characterized by an increase of cardiac enzyme activity (CKMB, LDH, l'ALAT et l'ASAT) in serum, the increase in the concentration of malondialdéhyde (MDA), antioxydant enzyme activity, catalase (CAT) and Glutathion- S-transférase (GST) and a decrease of cardiac cytosolic reduced glutathione (GSH) with a different pathological changes in the heart. However pretreated animals with EAERM (100 mg/kg orally during 15 days), showed a decrease of cardiac enzymes activities 24 %, 35, 69%, 21,25 % et 8,10 % respectively to CKMB, LDH, l'ALAT and l'ASAT. The pretreatment with the extract improved antioxidant status in the heart by a decrease in the cardiac MDA concentration by 29,7 % and activity of antioxydants enzymes by 17,91% et 29,78% respectively to CAT et la GST. In addition, the pretreated rats by the extract showed an increase of GSH level (83,76 %) compared with DOX-treated animals. Histological study shows that the extract resulted in a reduction of severe cardiac damages observed in DOX-treated animals. The reversal of multidrug resistance for DOX in human ovarian adenocarcinoma, cell lines (A2780 DX3) using MTT assay showed that AEERM was very effective at reversing the resistant in dose dependent manner with the Reversion Factor (RF =8.62, 05.77 and 02.30 respectively for the concentrations 40, 10 and 2.5 mg/ml) followed by BERM (FR=05.07 and 02.43 for the concentrations 40 and 10 mg/ml respectively), then the PEERM had the lowest reversal resistance effect (RF between 1.01 to 1.08). The present study suggests that AEERM can ameliorate the oxidative stress involved in the pathogenesis of doxorubicine- induced cardiotoxicity and can reverse the multidrug resistance for DOX.

Key words : *Ruta montana*, Doxorubicine , Cardiotoxicity, Multidrug resistance, Oxidative stress, Antioxidant, Flavonoids.

دراسة تأثير مستخلصات النبتة الطبية (*Ruta montana*) (الفيجل) علي السمية الناتجة عن المعالجة بالدوكسوروبيسين وتأثيرها علي إلغاء مقاومة الخلايا السرطانية للمبيض (A2780 DX3)

الملخص

يتمثل الهدف الأساسي من هذا البحث في دراسة تأثير النبتة الطبية *Ruta montana* للوقاية من الاجهاد التاكسدي والسمية القلبية الناتجة عن المعالجة بالدوكسوروبيسين وكذا خصائصها في إلغاء مقاومة السلالات الخلوية السرطانية للمبيض البشري لهذا الدواء. تم الحصول على المستخلصات العضوية بواسطة النقع وذلك باستعمال ثلاث مذيبات عضوية: اثير البترول , اسيتات الايتيل و البيتانول فكان المردود: 15.04% , 3.55% , 25.14% على الترتيب. اثبت التقصي الفيتوكيميائي احتواء المستخلص الميثانولي للنبتة على: الفلافونويدات, الصابونينات, التينينات, الكومارينات, المركبات المرجعة وأملاح القلويدات. أظهرت الدراسة الكمية للأجزاء الناتجة عن المستخلص الخام الميثانولي احتواء المستخلص البيتانولي على التركيز الأعلى من الفلافونويدات (80.85 ± 0.78 مغ ما يعادل الكرسيتين/غ مستخلص), يتبع بمستخلص اسيتات الايتيل (15.27 ± 0.62 مغ ما يعادل الكرسيتين/غ مستخلص على الترتيب) ثم مستخلص اثير البترول (9.71 ± 1.13 مغ ما يعادل الكرسيتين/غ مستخلص). في حين قدر التركيز الفينولي الكلي بـ 687.5, 595.83, 146.33 مغ ما يعادل حمض القاليك/غ مستخلص لكل من المستخلص البيتانولي , اسيتات الايتيل و اثير البترول على الترتيب). بينت الدراسة النوعية باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للمستخلصات الثلاثة على الانتوسيانيدين 3-جليكوزيد , الفلافون و الفلافونولات السكرية. الفلافونول بوضيفة 3-OH حرة, الفلافونون او الاورون, ايزوفلافون , الاحماض الفينولية , الفلافونول و 4-OH شالكون. بين تقييم النشاط المضاد للأكسدة بطريقة إرجاع الجذر الحر DPPH* أن مستخلص الاسيتات هو الأكثر نشاطا مقارنة بباقي المستخلصات (0.002 ± IC50 = 0.126 مغ/مل) متبوع بالمستخلص البيتانولي (IC50 = 0.135 ± 0.0006 مغ/مل) ثم مستخلص الايثير (IC50 = 0.185 ± 0.002 مغ/مل). النتائج المحصل عليها من دراسة التأثير الوقائي لمستخلص الاسيتات على الإجهاد التاكسدي المحرض بالدوكسوروبيسين بجرعة (15 mg/kg i.p) اطهرت جليا بان هذا الدواء أدى إلى سمية قلبية عند الجرذان تميزت بزيادة في نشاط الإنزيمات القلبية (CKMB, LDH, l'ALAT et l'ASAT) في البلازما , زيادة في معدل MDA وكذا زيادة في نشاط الإنزيمات السيتوزولية القلبية المضادة للأكسدة (GST) و(CAT بالإضافة إلى انخفاض في معدل GSH السيتوزولي المرجع و عدة اختلالات في نسيج القلب, غير أن المعالجة المسبقة للجرذان بمستخلص الاسيتات بجرعة (100 مغ/كغ عن طريق الفم مدة 15 يوم) أدت إلى خفض في نشاط الإنزيمات القلبية CKMB, LDH, l'ALAT و l'ASAT بنسبة 8,10% , 24%, 35.69% , 21,25% من جهة أخرى قام المستخلص أيضا بتحسين واضح في النظام المضاد للأكسدة لنسيج القلب وذلك بخفض في معدل MDA بنسبة 29,7% و كذلك خفض في نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة (GST) و(CAT بنسبة 17.91% و 29,78% على الترتيب. بالإضافة أدت المعالجة المسبقة للجرذان بالمستخلص إلى رفع معدل GSH بنسبة 83,76% وكل هذا مقارنة بالجرذان المعالجة بالدوكسوروبيسين. كما بينت الدراسة النسيجية للقلب فعالية المستخلص في خفض الاختلالات الحادة الظاهرة عند الجرذان المعالجة بالدوكسوروبيسين. أظهرت نتائج إلغاء مقاومة الخلايا السرطانية للمبيض (A2780 DX3) للدوكسوروبيسين بواسطة اختبار MTT أن تأثير مستخلص الاسيتات كان الأكبر في إلغاء المقاومة بطريقة معتمدة على الجرعة حيث قدر معامل إلغاء المقاومة (FR) بـ 0,08.62 و 05.77 لكل من التراكيز 40, 10 و 02.50 مغ/مل متبوع بالمستخلص البيتانولي حيث قدر FR بـ 05.07 و 02.43 لكل من التراكيز 40 و 10 مغ/مل على الترتيب ثم مستخلص الايثير والذي كان تأثيره بإلغاء مقاومة الخلايا الأضعف حيث قدر FR من 1.01 الى 1.08 أثبتت نتائج هذه الدراسة أنه يمكن لمستخلص الاسيتات لنبات *Ruta montana* القضاء على الإجهاد التاكسدي و السمية القلبية الناتجين عن المعالجة بالدوكسوروبيسين كما يمكنه إلغاء مقاومة الخلايا لدوكسوروبيسين .

الكلمات المفتاحية: *Ruta montana* ، الدوكسوروبيسين ، السمية القلبية، المقاومة المتعددة للأدوية ، الإجهاد التاكسدي، النشاط المضاد للأكسدة ، الفلافونويدات.