

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

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



N° d'ordre : 90/DS/2018

N° de série : 03/BA/2018

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: **IHOUAL Safia épouse Fethi**

Thème

Effet d'extrait méthanolique de la plante médicinale
Phlomis samia (الخياطة) sur l'apoptose des cellules
cancéreuses HepG2 et MDA MB 468 et sur la
cardiotoxicité induite par la Doxorubicine.

Jury d'évaluation :

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

Directeur de thèse: Mme **ABIDLIN** Prof. ENS. Kouba–Alger

Examineurs: Mr **Khennouf S** Prof. Univ. Ferhat-Abbas– Sétif

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

Mr **Benrebai M** MCAUniv 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.

Je voudrais remercier Madame : Abidli Nacira , Professeure ENS, El Kouba Alger . pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et son équipe et pour ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.

Je remercie Monsieur NAcibe youcef, Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université les frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté d'être présidente du jury de mon thèse

Je tiens à remercier Monsieur Khenouf sedik, Professeur au département de Biologie, Université F.A. de Sétif, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse .

J'adresse également mes remerciements à Mme.dahamna saliha , Professeure au département de Biologie, Université F.A. de Sétif, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse .

Je remercie également, Mr benrebai mouad Maître de Conférences à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université les frères Mentouri de Constantine 1, d'avoir accepté de juger ce travail.

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 pour la réalisation des cultures cellulaires.

Je tiens à remercier le Professeur Maria Derme d' université la sapienza Rome, Italie , de m'avoir permis de réaliser les tests cellulaires au sein de son unité. Je remercie également Luciana Mosca, gorga ,giorgana , antonio pour leur disponibilité et leur aide dans la réalisation des tests d'apoptose .

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements a

Toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes parents Ihoual Ahcène et Nemmour samia , qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.

Amon chère Mari.

A ma chère fille Djana mirale qui m'a apporté du bien depuis sa naissance et a illuminé ma vie ,je demande à Dieu de te protéger et de t'aider a devenir un forum de sciences et d'éducation .

A mes soeurs et mes frères : Abdel djebbar ,sara, khaoula ,chamsse edine , imade edine , et à toute la famille.

A tous mes Amies ET collègues.

A ma belle mère

A tous ceux que j'aime.

SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Revue bibliographique :

Chapitre 1 L'Apoptose

1. Définition	3
2. Différents types de mort cellulaire : nécrose et apoptose.....	3
2.1 Nécrose.....	3
2.2. Apoptose.....	4
3. Modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose.....	4
3.1. Cytoplasme.....	4
3.2. Organites intracellulaires.....	5
3.3. Noyau.....	5
3.4. Membrane cytoplasmique.....	5
4. Phases et mécanismes généraux de l'apoptose.....	5
4.1. La phase d'initiation (ou de signalisation).....	6
4.2. La phase de régulation (ou de décision).....	6
4.3. La phase d'exécution (ou de dégradation).....	6
5. Identification d'un programme moléculaire de mort cellulaire	7
Les caspases : acteurs principaux dans l'étape d'exécution.....	7
5.1. Définition	7
5.2 Classification fonctionnel et structural	7
5.3. Structure	8
5.4. Caspases initiatrices / caspases effectrices.....	9
5.4.1. Mécanisme d'activation des caspases	10
6. Les mécanismes généraux de l'apoptose	13
6.1. Voie des récepteurs de mort cellulaire	14
6.2. Voie intrinsèque: voie mitochondriale	16

7. La famille BCL-2.....	17
7.1. Le pore de perméabilité transitoire (PPT).....	20
7.2. La formation de canaux ioniques non spécifiques.....	20
7.3. Phagocytose des cellules apoptotiques	20
7.4. Molécules d'origine mitochondriale	21
7.5. Rôle de p53 dans la voie intrinsèque.....	22

Chapitre 2

Systeme oxydant, systeme antioxydant et stress oxydant

1. Définition du stress oxydant	23
2. Radicaux libres biologiques.....	23
2. 1 Définition.....	23
2.2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène	23
2.2.1 Le radical anion superoxyde.....	23
2.2.2 Le peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂ ou eau oxygénée	23
2.2.3 Le radical hydroxyle HO•.....	24
2.2.4 L'oxygène singulet : ¹ O ₂	24
2.3 Caractéristiques des interactions: radicalaire.....	24
2.4 Origine des radicaux libres	24
2.4.1 Sources exogènes	24
2.4.2 Sources endogènes	25
a- La mitochondrie	25
b- Chaîne respiratoire mitochondriale	25
c- Le Peroxysome	26
d- Les cellules phagocytaires	26
e- la NAD(P)H oxydase	26
F- Les ions métalliques.....	26
3 . Stress oxydant et ses Cibles biologiques.....	27
3.1 L'oxydation des lipides.....	27
3.2 Oxydation des protéines.....	27

3.3 Dommage de l'ADN.....	27
5. Systèmes de défenses antioxydants.....	28
5.1 Définition des antioxydants	28
5.2 Différents types d'antioxydants	28
5.3 Les antioxydants enzymatiques.....	28
5.3.1 La superoxyde dismutase (SOD).....	28
5.3.2 Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)	28
5.3.3 La catalase	28
5.4 Les antioxydants non enzymatiques	29
5.4.1 Le glutathion (GSH).....	29
5.4.2 Thiorédoxine réductases.....	29
5.4.5 La vitamine E	30
5.4.6 La vitamine C.....	30
5.4.7 Les caroténoïdes	30
7 les flavonoïdes comme antioxydants.....	31
7.1. Structure et classification des flavonoïdes.....	31
7.2. Localisation, distribution et biodisponibilité des flavonoïdes.....	31
7. 3. Effets biologiques des flavonoïdes	32
7.3.1 Activités biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes.....	32
7.3.2. Effets antioxydant et pro-oxydant	32
7.3.4 Activité anti-tumorale	33

Chapitre 3

La Doxorubicine et la cardiotoxicité

La Doxorubicine.....	34
1. Généralité	34
2. Définition de la doxorubicine	34
3. Structure moléculaire.....	35
4. La pharmacocinétique de la Doxorubicine	36

4.1 L'absorption et distribution	36
4.2. Métabolisme hépatique	36
4.3. L'élimination	37
5.Mode d'action.....	37
5.1. L'interaction avec les bases azotées de l'ADN.....	37
5.2. Inhibition de l'enzyme topo-isomérase II.....	37
5.3. Inhibition de l'enzyme helicase.....	37
5.4. Production des radicaux libres.....	37
5.5. Transport nucléaire	38
5.6. L'apoptose	38
6.voies de signalisation impliquées dans l'apoptose des myocytes cardiaques induite par la doxorubicine	38
La cardiotoxicité	39
1. La cardiotoxicité aiguë et subaiguë	39
2. Toxicité chronique.....	39
3. Aspects biochimiques de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	39
3.1. Inhibition de la topoisomérase II.....	39
3.2. Induction d'un stress oxydant.....	40
3.3. Apoptose	42
4. Hypothèse des métabolites toxiques issus du métabolisme de la doxorubicine.....	42
5. Aspects histologiques des lésions cardiaques induites par les anthracyclines	43
6. Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	43
6.1. Diminution de la dose cumulée totale de la doxorubicine	43
6.2. Nouvelles Anthracyclines et formes galéniques.....	44
6.3. Protection pharmacologique.....	44

Chapitre 4

La plante médicinale Algérienne *Phlomis bovei* De Noé, syn. *Phlomis samia* Desfontaines

1.Description botanique	45
2.Classification.....	46

3. Phytochimie :	47
4. Place de Phlomis . samia en phytothérapie	48

Matériel et méthodes

1- Matériel	50
I-1- Matériel végétal	50
I-2- Les animaux	50
I-3- Les produits chimiques et les réactifs.....	50
II- Méthodes de travail	51
II-1- Préparation et étude du matériel végétal.....	51
II-1-1- Préparation de l'extrait méthanolique de «Phlomis samia bovie de Noé»	51
II-1-2- Etude phytochimique.....	51
II-1-2-1- Tests phytochimiques	51
Mise en évidence des tanins.....	51
Mise en évidence des saponosides	51
Mise en évidence des flavonoïdes	52
Mise en évidence des composés réducteurs	52
Mise en évidence des alcaloïdes	52
II-1-2-2-Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	53
Dosage des polyphénols totaux	53
Dosage des flavonoïdes	54
II-1-2-3- High performance liquid chromatography (HPLC) analysis	55
II-1-3- Etude pharmacologique.....	56
II-1-3- 1- Etude de la toxicité (Test d'innocuité)	56
II-1-3-2- Propriétés antioxydantes d' extrait de Phlomis samia	
Test de β -carotène / acide linoléique	57

I-1-3-3- Détermination de l'activité anti-radicalaire de extrait de <i>Phlomis samia</i> par la méthode de DPPH (effet scavenger)	57
II -1-3-4-Peroxydation des lipides in vitro	59
-Test 1.....	59
-Test 2	59
II-1-3-5-Test du pouvoir réducteur (Reducing Power Assay)	60
II-1-3-6-Piégeage du radical hydroxyle	60
II-2-Activités anti tumorales in vitro.....	61
II-3 Détermination d'apoptose	63
II-4- Invisitation du cycle cellulaire	64
II-5-Investigations expérimentales sur les animaux.....	64
II-5-1-Le médicament anticancéreux : le doxorubicine	64
II-5-2 Protocole du traitement des rats.....	64
II-5-3- Les groupes des animaux.....	64
II-5-4- Prélèvement sanguin et mesure du poids.....	65
II -5-5- Préparation de la fraction cytosolique de tissus 10%	65
II-5-6-L'analyse histologique.....	66
II-5-7-L'analyse des paramètres biochimiques	68
II-5-7-1- Analyse des paramètres sériques	68
II-5-7-1 a Les Aminotransférases	68
L'aspartate amino transférase (AST) / TGO	68
L'alanine aminotransférase (ALT) / TGP	68
II-5-7-1 b La créatine kinase(CK) ou créatine phosphokinase (CPK)	69
II-5-7-1 c LDH	70
II-5-8 Analyse des paramètres tissulaires	71

II-5-8-1 Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans une fraction cytosolique 10% de cœur	71
II-5-8-2 Dosage du glutathion tissulaire	72
II-5-8-3 Dosage de l'activité enzymatique du catalase	74
III -L'étude statistique	75
Les résultats.....	76
La discussion.....	105
Conclusion	130
Les références.....	132

LIST DES ABREVIATIONS

AA	L'activité antioxydante.
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate.
AFC	7- amino-4- trifluorométhyl coumarine.
AIF	Apoptosis Inducing Factor.
AMC	7- amino-4- méthylcoumarine.
ANT	l'adénine nucléotide translocase.
APAF-1	Apoptosis Protein Activating Factor
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AlCl₃	Trichlorure d'aluminium
ALAT	Alanine amino transférase.
AST	Aspartate transaminase.
AR	L'Aldose Réductase.
ATP	Adénosine triphosphate.
BAD	BCL-2 Antagonist of cellDeath.
BAK	BCL-2-Antagonist /Killer.
BAX	BCL-2-Associated X Protein.
BCL-2	B-Cell Lymphoma Protein 2
Bcl-xL	longer alternatively spliced form of Bcl-x.
Bcl-xS	shorter alternatively spliced form of Bcl-x .
BCLW	BCL-2 like 2 Protein.

BH	Bcl-2 Homology.
Bid	BH3 interacting death domain agonist.
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death.
BIK	BCL2 Interacting Killer.
BIR	Baculovirus IAP Repeat.
BMF	a BH3 only protein.
BOD	BCL-2 homologue of Ovary.
Bax	Bcl (B cell lymphoma).
Bcl-XL	B cell lymphoma-extra large
BHT	Butylhydroxytoluene.
BSA	Albumine bovine serum.
CAT	Catalase.
CAD	Caspase-Activated DNase.
CAD/ICAD	Caspase Activated DNase / Inhibitor of Caspase Activated DNase
CaCl₂	Chlorure de calcium
CARD	Caspase Recruitment Domain.
caspases	cysteiny laspartate-specific proteases
Ced	Coenorhabditis elegans death
c-FLIP	cellular FLICE (FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme)-inhibitory.
cIAP	cellular-IAP.
CrmA	cytokine response modifier gene.
CytC	Cytochrome c.
CHUC	Centre Hospitalo_Universitaire Ben Badis de Constantine.
IC50	Concentration inhibitrice 50%.
CPK	Créatinine Phosphokinase.

Cs	Capillaires sanguins.
CYTp450	Cytochrome p 450.
DAB	3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride.
DD	Death Domain.
DED	Death Effector Domain », domaine effecteur de mort.
DEVD	Asparate-Glutamate-Valine-Aspartate.
DFF	DNA Fragmentation Factor.
Diablo	direct IAP bindingproteinwithlowpI.
DISC	Death-InducingSignallingComplex.
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNase	Désoxyribonucléase.
D.O	Densité optique à la longueur d'onde Å.
DR4	Death Receptor 4.
DR5	Death Receptor 5.
DTT	dithiothretol.
DO	Densité optique.
DOXO	Doxorubicine.
DPPH°	1, 1-diphenyl-2- dipicrylhydrazyl.
Ds	Dystrophie musculaire
ECG	Electrocardiographie.
FMCI	Fibre musculaire cardiaque intacte.
EP	Eau physiologique
FeCl3	chlorure de fer
EBV	Epstein-Barr virus, virus Epstein Barr
EDTA	Ethylene di amine tetra acetic acid », Acide éthylène diamine tétra acétique.

Endo G	Endonucléase G.
ERO	espèces réactives de l'oxygène.
FADD	FasAssociatedDeath Domain protein.
FasL	Fas Ligand.
FITC	fluorescein isothiocyanate.
FLIP	FLICEInhibitoryProtein .
FITC	FluorescéineIsoThioCynate
G	Gramme.
G-6-PDH	Glucose-6-phosphate deshydrogenase.
GPx	Glutathion Peroxydase.
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
GST	Glutathion-s-transférase
HEPES	Acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonique].
HIV	Human Immunodeficiency Virus, VIH.
HI-60	Human promyelocytic leukemia cells.
HRP	horse radish peroxydase.
HSV	Herpes Simplex Virus.
HtrA2	High Temperature Requirement protein A2.
H&E	Hématoxyline et éosine.
H2O2	Peroxyde d'hydrogene.
HK	Hexokinase.
kg	Kilogramme
HDL	Lipoprotéines de haute densité
H.M.W	Composés à poids moléculaire élevé.
I %	Pourcentage d'inhibition

IC50	Concentration inhibitrice de 50 %
IAP	Inhibiteurs des protéines apoptotiques.
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated DNase.
ICE	Enzyme de conversion de l'interleukine 1 bêta.
IETD	isoleucine-glutamate-thréonine-aspartate.
I-kBkinase	Inhibitor of NF-kappaB Kinase.
IL	interleukine.
ISEL	in situ end labeling.
JAK	Janus Kinase.
JAK-STAT	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription.
JNK	Kinase de la partie N-terminal de la protéine c-jun.
kDa	kilo Dalton.
LMA	Leucémiemyéloïde aiguë
LDH	Lactate déshydrogénase.
LDL	Lipoprotéine de basse densité
LFMC	Lyse des fibres musculaires cardiaque.
LO°	Alkoxy radical.
LOO°	Peroxy radical.
LOOH	Organic Hydroperoxide.
L.M.W	Antioxydants à faible poids moléculaire.
MDA	Malonyl di aldéhyde.
MeOH	Méthanol
MCL1	Myeloid-Cell Leukaemia sequence 1.
MCF-7	human breast cancer cell
MDM2	Murine Double Minute 2

MTT	3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide.
N	Noyau de cardiomyocyte.
NAD+	Nicotineamide adenine dinucléotide
NADP+	Nicotineamide adenine dinucléotide phosphate
NOS	Monoxyde d'azote synthase
Nacl	Chlorure de sodium
NFκB	Nuclear Factor of chainκ of B cells.
NGF	Facteur de croissance neuronale
NOXA	BH3-only member of the Bcl-2 family.
1O2	L'oxygène singulet.
O2	L'Oxygène.
O2° -	Le Radical Superoxyde.
OH•	Le Radical Hydroxyle.
OMS	L'Organisation Mondiale de la Santé
ONOOH	Nitroperoxyde.
Omi	HtrA2.
PARP	poly (ADP-ribose) Polymerase-1.
p19ARF	p19 alternative reading frame protein.
Pb	Paires de base.
PBS	Phosphate Buffer Saline », tampon phosphate salin.
PI	Iodure de propidillm.
pNa	<i>p</i> -nitroanilide.
PPT	pore de perméabilité transitoire.
PUMA	P53-Upregulated Modulator of Apoptosis
RAIDD	RIPK1 Domain containing Adapter with DD.
ROS	ReactiveOxygenSpecies.

RL	Radicaux Libres.
ROS	Reactive oxygen species.
SDH	Sorbitol Déshydrogénase.
SOD	Superoxyde Dismutase.
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate.
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
SMAC	Second mitochondria-derived activator of caspase.
SMAC/ DIABLO	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP Binding protein with Low Pi.
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription.
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase.
THP-1	cell line human leukemic monocyte
TNF	Tumor Necrosis Factor.
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1.
TRAF-2	TNF receptor associated factor-2
TRAIL	TNF related apoptosis-inducing ligand.
TRAILR	Récepteur de TRAIL
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.
TBA	Acide thiobarbiturique.
TBARS	Espèces réactives de l'acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloroacétique
TG	Triglycéride.
TGO	Glutamic-oxaloacetic transaminase.
tpm	Tour par minute.

TRX	Thiorédoxine.
Tc	Tissu conjonctif.
UMA	p53 up regulated modulator of apoptosis.
UV	ultra violet.
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel.
Vit C	Vitamine C.
Vit C[°]	Vitamine C radicalaire.
Vit E	Vitamine E.
Vit E[°]	Vitamine E radicalaire.
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité
XIAP	X-chromosome -linked inhibitor of apoptosis protein.
YVADO ou WEHD	Tyrosine-Valine-Alanine-Aspartate

Liste des figures

Figure	Page
Figure 1 : Classification des caspases chez l'humain.	8
Figure 2 : Structure et mécanisme d'activation des caspases	9
Figure 3 : Activation séquentielle des caspases	11
Figure 4 : formation d'apoptosome	13
Figure 5 : A-C : cascade d'activation de l'apoptose extrinsèque	16
Figure 6 : Membres de la famille BCL-2	18
Figure 7 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire	25
Figure 8 : Structure générale du noyau des flavonoïdes	31
Figure 9 : Réaction des flavonoïdes avec les EOR	32
Figure 10 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques	33
Figure 11 : La structure chimique de la doxorubicine	35
Figure 12 : : métabolisme hépatique de la Doxorubicine	36
Figure 13 : Schéma hypothétique des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose des myocytes cardiaques induite par la doxorubicine-	38
Figure 14 : Production des radicaux libres par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines	41
Figure 15 Théorie de métabolites toxiques des anthracyclines	42
Figure 16 : Photo des feuilles et fleurs de la plante <i>Phlomis samia</i>	46
Figure 17 : Certains composants chimiques de <i>Phlomis .s</i>	47
Figure 18 ; les formules chimiques des certains composants.	47
Figure 19 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	53
Figure 20 : Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine.	54
Figure 21 : pourcentage d'inhibition de BHT .	58
Figure 22 : Principe du test MTT.	62
Figure 23 : Formation d'adduit MDA – TBA (1 :2)	71
Figure 24 : courbe d'etalonnage d'MDA .	72
Figure 25 : Courbe d'étalonnage de Glutathion réduit GSH.	73
Figure 26 : Chromatogramme d'un extrait Méthanolique de <i>Phlomis .samia</i> séparé par RP-HPLC.	78

Figure 27: Effet scavenger d' extrait PHSME sur le radical DPPH.	79
Figure 28: La concentration d'extrait PHSME et la molécule BHT qui inhibent 50% de DPPH (mg/ml).	80
Figure 29. Activité antioxydante d'extrait PHSME par rapport au BHT, MeOH et H2O par le test de β -carotène / acide linoléique.	81
Figure 30 : Activité antioxydante des l'PHSME, du BHT, du MeOH et H2O (à 24 h), par le test de β -carotène / acide linoléique.	82
Figure 31 Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique de foie par deux concentration d'PHSME.	83
Figure 32 : le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait PHSME.	83
Figure 33. : Le pouvoir réducteur des concentration d'extrait PHSME comparer avec l'acide ascorbique (Vit C)	84
Figure 34. pouvoire de piégeage de radical hydroxyle par l'extrait PHSME et de la vitamine c (Vit c).	85
Figure 35: Effet du traitement par l'extrait PHSME sur la viabilité des cellules HepG2 et MDA après 48 H.	86
Figure.36 : Effet du traitement par l'extrait PHSME sur la viabilité des cellules HepG2 et MDA après 72 H.	86
Figure 37 : L'effet d'extrait PHSME sur l'apoptose des cellules MDA et HepG2	87
Figure 38: L'Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux: le pourcentage de cellules non traitées dans les phases SG1, G1, S, M du cycle cellulaire après le traitement 48h avec (45mg / ml) PHSME sur les cellules MDA et HepG2	88
Figure39 : Variation de la concentration d 'ASAT sanguin (u/L) chez les rats témoins (T)	89
Figure 40: Variation de la concentration d 'ALAT sanguin (u/L) chez les rats témoins (T)	90
Figure 41: Variation de la concentration de LDL sanguin (u/L)	91
Figure 42: Variation de la concentration de CPK sanguin (u/L)	92
Figure 43 : Dosage de l'MDA tissulaire au niveau du coeur.	93
Figure 44: Dosage de GSH tissulaire au niveau du coeur.	94
Figure 45: L'activité d'enzyme de Catatase au niveau du coeur.	95

Figure 46: L'activité d'enzyme de GST au niveau du coeur.	96
Figure 47 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe Témoin	98
Figure 48 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe (DOXO)	99
Figure 49 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe traité par 200 mg/kg de l'extrait PHSME .	100
Figure 50 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe Doxo+PHSME (Prév)	101

Liste des tableaux

Tableaux	Page
Tableau 1 : Structure chimique de certains flavonoïdes représentatifs de chaque classe	31
Tableau 2 : Molécules testées dans la protection de la cardiotoxicité des Anthracyclines	44
Tableau 3 : Longueurs d'onde utilisées dans l'étude des composés phénoliques	55
Tableau 4 : Étude comparative des temps de rétention entre l'extrait brut de <i>phlomis samia</i> et les mélanges qualitatifs	56
Tableau 5 : Lignes cellulaires et médias utilisés pour leur croissance.	61
Tableau 6 : Résultats des tests phytochimiques de la mise en évidence des quelques	76
Tableau 7 : Résultats du dosage des Polyphénols totaux et des flavonoïdes	77
Tableau 8 : Pourcentage d'inhibition d'PHSME et le BHT	80
Tableau 9 : Les valeurs de IC50 des lignes cellulaire.	86

Introduction

Introduction

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans les pays industrialisés après les maladies cardiovasculaires (Jemalet al., 2011). Plus de 7. 500 cas de cancer sont enregistrés chaque année en Algérie ou l'on dénombre également 3.500 décès des suites de cette maladie. Pour en 2016 ,9.000 nouveaux cas ont été décelés, les fumeurs constituant les premières victimes, ont souligné des intervenants en signal d'alarme. (Benhamouche, 2016)

La mortalité de la plupart des pathologies malignes a continuellement augmenté au cours de ces 20 dernières années, notamment grâce à de meilleurs traitements médicamenteux, les anticancéreux classiques, cytotoxiques, ont des effets indésirables cardiovasculaires tels que dysfonction myocardique, ischémie, hypertension artérielle, thromboses et arythmies (Ewer&Lippman , 2005)

Les anthracyclines sont à la base de très nombreux protocoles de chimiothérapie, pour les pathologies maligne. Leur utilisation est cependant souvent limitée par leur toxicité. La doxorubicine (DOX) est l'un des antibiotiques antitumoraux les plus efficaces appartenant à la classe des anthracyclines. Cependant, son utilisation est limitée par une forte incidence de cardiotoxicité (Hortoba' gyi , 1997) Avec l'augmentation de son utilisation, une cardiotoxicité aiguë a été reconnue Comme une complication sévère de la chimiothérapie DOX (Doroshov,1991) Bien que De nombreux mécanismes ont été proposés, la plupart des études ont été soutenues Qu'une augmentation du stress oxydatif, ainsi que des réductions Dans les niveaux d'antioxydants, qui jouent un rôle clé dans la pathogenèse De la cardiomyopathie induite par DOX (Singal et al., 1987 ;Yen, 1996) Par conséquent, L'utilisation d'antioxydants naturels ou synthétiques pourrait protéger contre Le stress oxydatif causé par le DOX et d'autres médicaments cytotoxiques (Bristow , 1981) Les régimes riches en fruits et légumes ont été associés à La diminution des risques de plusieurs maladies chroniques, telles que les maladies coronariennes Les maladies cardiaques et certains cancers (Block et al .,1993 ; Lamp et al., 1999) Ces effets protecteurs ont été attribué en partie aux divers composés antioxydants, par exemple. Vitamines C et E, b-carotène et polyphénoliques (Diplock et al., 1998) Lycopène, Un caroténoïde se produisant dans les tomates (Yilmaz et al., 2006) et les gingerols dans Zingiber officinale (Ajith et al., 1998) se sont révélés protéger contre DOX induite Néphrotoxicité.

Les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont prouvées pour réduire la toxicité du DOX en raison de leur capacité Chélateur des radicaux libres (Vaclavikova et al., 2008 ; Ashour et al., 2011) , des Enquêtes sur L'activité antioxydantes des herbes utilisées pour

Introduction

traiter le cancer démontre que Les polyphénols sont les porteurs de ces propriétés (Chen, 1997 ;Yizhong, 2004) . On sait que les composés Phénoliques agissent comme des antioxydants non seulement par leur capacité à fournir l'hydrogène ou d'électrons, mais aussi parce que Ce sont des radicaux intermédiaires stables (Maillard et al., 1996) Probablement le plus importants des phénoliques naturels sont des flavonoïdes (Ashour OM et al., 2011) des Rapports sur Les espèces précédentes ont prouvé la présence de flavonoïdes et de phénol Acides (Komissarenko et al., 2007) qui indique que ces plantes possèdent des Activités .antioxydants (Komissarenko et al., 2007).

Le genre *Phlomis* est l'un des plus grands genres de la famille Lamiaceae (I L Ben Amor et al.,2009) *Phlomis bovei* De Noé, syn. *Phlomis samia* Desfontaines (Lamiaceae) est une plante endémique algérienne rare, connue sous le nom de Kayat El Adjarah (Quezel, Santa, 1963) ,C'est l'une des neuf plantes endémiques enregistrées dans le Rapport National Algérienne sur la diversité biologique (Quezel, Santa,1963 ; Liolios et al., 2007).

La présente étude a été réalisée pour évaluer l'effet de certains antioxydants sur quelques paramètres du stress oxydant et les dommages qu'il peuvent provoquer au niveau du coeur pendant le traitement avec la Doxorubicine , Nous l'avons utiliser comme source d'antioxydants, une plante utilisée dans la médecine traditionnelle c'est la *Phlomis samia* , espèce endémique, répandue en algérie et connue sous le nom de « Khiatet el jerah ». Cette plante n'a été jamais étudiée en Algérie. raison pour laquelle nous avons fixé les objectifs suivants :

- 1- Etudes phytochimique et pharmacologique de la plante pour obtenir quelques informations concernant ses constituants et son activité biologique.
- 2- Des tests préliminaires concernant son activité antioxydante in vitro.
- 3- Etudes in vitro sur des lignes cellulaire (MDA et HepG2) pour évaluer l'activité antiproléferative et proapoptotique de la Plante médicinale étudier.
- 4- Etudes d'activité cardio protectrice et antioxydante in vivo d'extrait methanolique de *Phlomis samia*.
- 5- Evaluation des différents paramètres biochimiques concernant les perturbations métaboliques du Doxorubicine et quelques paramètres du stress oxydant au niveau du coeur.
- 6- Une étude histologique sur le coeur pour maître en évidence d'une part l'effet du stress oxydant associé au cardiotoxicité induite par la Doxorubicine et d'une autre part l'efficacité de la plante utilisée comme source d'antioxydants contre les dommages du stress oxydant.

Partie I:

Revue bibliographique

L'apoptose

1. Définition :

Le terme « apoptose » a été utilisé pour la première fois par Kerr, Wyllie, et Currie en 1972 pour décrire une forme morphologiquement distincte de mort cellulaire (Kerr et al., 1972; Kerr, 2002). pouvaient être le résultat d'un programme endogène sous-jacent de mort cellulaire, qu'ils ont appelé « apoptose ». Ce terme vient du grec et fait allusion à la chute des feuilles en automne.

L'apoptose est un phénomène conservé à travers les espèces, elle est retrouvée chez tous les organismes multicellulaires. (Steller & Science, 1995 ; Cikala et al., 1999). C'est un processus actif et physiologique de mort cellulaire se caractérise par une morphologie particulière de la cellule en fin de vie due à la condensation du matériel nucléaire (pyknosis) suivie de sa fragmentation (karyorrhexis), il est utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Lors de ce phénomène, la cellule elle-même dirige le programme de sa propre mort (Dong et al 1997). En effet, l'apoptose joue un rôle primordial dans les mécanismes de défense tels que ceux mis en œuvre dans les réactions immunes ou quand les cellules sont endommagées par des agents nocifs (Norbury & Hickson, 2001 ; Elmore, 2007).

2. Différents types de mort cellulaire : nécrose et apoptose

Il existe deux types de mort cellulaire : la nécrose ou mort accidentelle de la cellule ; l'apoptose ou mort contrôlée par la cellule. L'intensité et la nature du stimulus initial déterminent souvent le choix entre ces deux façons de mourir.

2.1 Nécrose

La nécrose représente une mort accidentelle et rapide de la cellule (Majno & Joris 1995), cette mort correspond à une agonie violente et traumatique de la cellule dès que celle-ci subit une agression extrême par des agents cytotoxiques physiques (UV ou autres radiations), chimiques (H_2O_2 , staurosporine...), ou physiologiques (hypoxie, hypothermie, infection, traumatismes, etc). Cette mort touche un ensemble de cellules d'un tissu, contrairement à l'apoptose qui, la plupart du temps, n'affecte que des cellules individuelles au sein d'un tissu (Bicknell & Cohen, 1995). Au cours de la nécrose, l'ADN nucléaire est dégradé de manière «aléatoire» (Bicknell & Cohen 1995) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong et al., 1997).

La nécrose s'accompagne d'un oedème cellulaire aboutissant à la lyse de la membrane plasmique. les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le noyau gonflent jusqu'à l'éclatement, libérant ainsi le contenu intracellulaire dans le milieu environnant., entraînent le relargage d'enzymes dans le milieu environnant (Bortner & Cidlowski, 1996).

2.2. Apoptose

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est un processus actif et ordonné qui survient lors de l'évolution physiologique d'un organisme (Evan & Little wood, 1998), mais aussi dans certaines situations pathologiques. L'apoptose est caractérisée par des modifications morphologiques et biochimiques, très différentes de celles de la nécrose.

- Parmi les critères morphologiques, on observe une diminution du volume cellulaire, le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au début du processus, une relocalisation des organites cytoplasmiques (Hetts et al.,1998)., une condensation de la chromatine puis la fragmentation du noyau et du cytoplasme. La cellule se scinde en corps apoptotiques (Buja et al.,2005) .

- Parmi les critères biochimiques, on observe une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, une externalisation des résidus phosphatidyl-sérines de la membrane plasmique, l'activation de protéases à cystéine ou caspases (Raff et al.,1993), et la fragmentation de l'ADN (clivage entre les nucléosomes). Des marqueurs de surface, dont les résidus phosphatidyl-sérines, permettent la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques (Afford & Randhawa, 2000 ; Rai et al.,2005) .

3. Modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose

En 1972, Kerr, Wyllie et Currie montrent que des cellules, en train de mourir par apoptose, développent des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques, différentes de celles observées chez les cellules entrant en nécrose.

3.1. Cytoplasme

L'apoptose est caractérisée par une forte diminution du volume cellulaire (Ziegler & Groscurth ,2004), avec une importante condensation du cytoplasme. résulte d'une perte d'eau et d'électrolytes (Yu et al. 1997). L'activation des caspases est un des facteurs intervenant dans la désorganisation du cytosquelette de la cellule, suite au clivage de molécules telles que la gelsodine et la fodrine, molécules responsables de la structuration du cytosquelette (Earnshaw et al., 1999).

3.2. Organites intracellulaires

Une relocalisation des organites cytoplasmiques est observée : les mitochondries intactes se regroupent autour du noyau (Petit et al., 1995), alors que dans certaines cellules comme l'hépatocyte, le réticulum endoplasmique semble se déplacer vers la périphérie de la cellule (Leist et al., 1997). Les ribosomes sont toujours présents à la surface du réticulum endoplasmique même quand des fragments de celui-ci se retrouvent dans des bulles cytoplasmiques (Feldmann, 1999).

3.3. Noyau :

L'activation des caspases est un des facteurs intervenant dans la désorganisation de la membrane nucléaire suite au clivage de molécules telles que les lamines. Ces caspases clivent aussi la PARP (Poly (ADP-ribose) polymérase), permettant ainsi la fixation sur l'ADN du domaine de liaison à l'ADN de PARP libéré ; ce qui empêche toute réparation (Del Bello et al., 2004). Le nucléole se transforme en un amas granuleux homogène. La diminution du volume nucléaire est liée à une condensation de la chromatine autour de la membrane nucléaire (Earnshaw, 1995). La chromatine n'est plus localisée à la périphérie du noyau, mais elle se condense en de volumineux agrégats occupant une grande partie de la matrice nucléaire. Cette dernière forme ensuite un large croissant ou un anneau dense parfois complet. Il se produit aussi des modifications de la membrane nucléaire qui se sépare des agrégats chromatiniens avant la fragmentation du noyau (Earnshaw, 1995 ; Stuppia et al., 1996).

3.4. Membrane cytoplasmique

La cellule en apoptose perd le contact avec les cellules voisines et/ou la matrice extracellulaire. Il est probable que ce phénomène s'accompagne d'altérations des jonctions, en particulier au niveau des desmosomes et des protéines d'adhésion, comme les intégrines, confirmant ainsi leur rôle prédominant dans l'apoptose (Meredith & Schwartz, 1997). Une Perte de l'asymétrie membranaire, passage des phosphatidyl-sérines (PS) de la bicouche lipidique, normalement face vers l'intérieur, (Bratton et al., 1997 ; Savill & Fadok, 2000). Ceci permet d'exposer la phosphatidyl-sérine comme ligand de reconnaissance pour les cellules phagocytaires. (Gardai et al., 2006).

4. Phases et mécanismes généraux de l'apoptose

Les mécanismes du processus apoptotique se caractérisent par des cascades des signaux moléculaires. Peut classiquement être divisée en trois phases : une phase d'induction ou d'initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation (Thompson, 1995 ; Kroemer & Reed, 2000).

4.1. La phase d'initiation (ou de signalisation),

Des régulateurs de l'expression génique (le facteur de transcription NF- κ B : Nuclear Factor- Kappa B), de la prolifération cellulaire (c-myc), ainsi que des récepteurs membranaires de mort ou des molécules impliquées dans le maintien de l'intégrité du génome (suppresseur de tumeur p53), vont jouer également un rôle important dans cette phase d'initiation Réversible (Rich et al., 2000), au cours de laquelle les modifications morphologiques ne sont pas encore visibles ; cette phase se caractérise par des modifications biochimiques.

Ces dernières dépendent de la nature des stimuli qui peuvent être physiques (pression, micro-ondes, rayonnement X ou UV...), chimiques (H_2O_2 , étoposide, cisplatine, camptothécine, staurosporine...) ou encore biologiques (ligands de récepteurs membranaires impliqués dans la mort cellulaire...), la phase d'initiation possède deux voies de transduction du signal apoptotique, appelées voie extrinsèque et voie intrinsèque (Rich et al., 1999).

4.2. La phase de régulation (ou de décision)

La phase de régulation est commune à toutes les voies de transduction du processus apoptotique. Après intégration du signal initiateur, en fonction de son métabolisme interne et de son état de développement, la cellule prend la décision d'entrer ou non en apoptose. Le contrôle est effectué, le plus souvent, par la mitochondrie et un ensemble de protéines pro- et anti-apoptotiques (Bax et Bcl-2) (Nagata, 1997).

4.3. La phase d'exécution (ou de dégradation),

Irréversible, se distingue par l'activation d'hydrolases cataboliques comme les nucléases et les caspases. Ces enzymes sont activées et contrôlées par les mitochondries ainsi que par les molécules pro- et anti-apoptotiques mitochondriales. Les enzymes désassemblent de façon contrôlée et ordonnée les structures sub-cellulaires ; ces dernières entraînent les changements biochimiques et morphologiques caractéristiques de l'apoptose, aboutissant alors à une destruction cellulaire (Nagata, 1997).

Nous présenterons les mécanismes de ces trois phases de la façon suivante :

- Au cours de la phase d'initiation, nous aborderons les deux voies de transduction du signal apoptotique, appelées voie extrinsèque et voie intrinsèque :

La première voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires qui reçoivent des signaux extracellulaires. Cette voie est appelée **voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort**.

La deuxième voie est induite par des signaux internes comme le stress cellulaire ou la perturbation métabolique, et met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans la cellule. Cette voie est **appelée voie intrinsèque ou voie mitochondriale**

5. Identification d'un programme moléculaire de mort cellulaire :

Les caspases : acteurs principaux dans l'étape d'exécution

5.1. Définition :

En 1996, Alnemri et coll. propose une nomenclature qui regroupe les protéases à cystéine sous le nom de **caspase** pour "cystéine **aspartate-specific protéase**", où « c » désigne le résidu cystéine du centre catalytique (QACXG où X = un acide aminé quelconque), « **asp** » définit la spécificité stricte de clivage des substrats après un résidu acide aspartique et « **ase** » désigne une enzyme (Jin & El-Deiry., 2005).

Les caspases sont les composants essentiels de la plupart des voies conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Elles sont présentes constitutivement dans la cellule et sont hautement conservées à travers les espèces (Boyce et al. 2004). A ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Parmi celles-ci, les caspases-1 à -10 ainsi que la caspase-14 ont été mises en évidence chez l'homme. Les caspases-11 et-12 sont des homologues des caspases-4 et -5 chez la souris sont impliquées dans la régulation du processus inflammatoire, et la caspase-13 est un homologue bovin de la caspase-4 (Koenig et al. 2001). Cependant, il existerait chez l'homme une « pseudo-caspase-12 » (Lamkanfi et al. 2004).

5.2 Classification fonctionnel et structural :

Il existe aujourd'hui plusieurs classifications de ces protéases:

(1) La 1^{ère} classification se base sur l'analyse phylogénétique des caspases et a permis de définir trois sous familles : la famille de la caspase-1 (les caspases-1, -4, -5, -11), la famille de la caspase-2 (les caspases-2, -9) et la famille de la caspase-3 (les caspases 3, -6, -7, -8, -10) (Alnemri et al., 1996).

(2) La 2^{ème} classification est basée sur la spécificité de substrat des caspases ; ces dernières sont classées en trois sous groupes (Thornberry et al., 1997b).

(3) La 3^{ème} classification s'appuie sur les fonctions des différentes caspases. Deux grands groupes ont été ainsi définis : les caspases impliquées dans l'inflammation, responsables de l'activation des cytokines, et les caspases apoptogènes activées au cours de la transduction d'un signal de mort. Les caspases apoptogènes se répartissent en deux groupes en fonction de leur rôle dans la voie de signalisation de l'apoptose :

- Les **caspases initiatrices (ou régulatrices)** sont des caspases possédant des pro-domaines longs, activées au cours de la phase d'initiation de l'apoptose ; ces caspases comprennent les caspases-2, -8, -10 pour la voie des récepteurs de mort, et la caspase-9 pour la voie des mitochondries.

- Les **caspases effectrices (ou exécutrices)** sont des caspases à pro-domaines courts (fig 1), activées en cascade par des caspases initiatrices et impliquées dans la phase d'exécution de l'apoptose. Ce sont les caspases-3, -6, -7 (Alnemri, 1999).

Les caspases 3, 6 et 7 clivent la majorité des protéines intracellulaires au cours de l'apoptose. La caspase 3 clive des protéines impliquées dans l'intégrité de l'enveloppe nucléaire (telles que la lamine B) et des protéines impliquées dans la condensation chromatinienne (telles que Acinus) (Galluzzi et al., 2008). La caspase 3 peut aussi jouer un rôle dans un contexte non apoptotique notamment. au cours de la différenciation érythrocytaire, en clivant GATA-1 (Zermati et al., 2001; Ribeil et al., 2007).

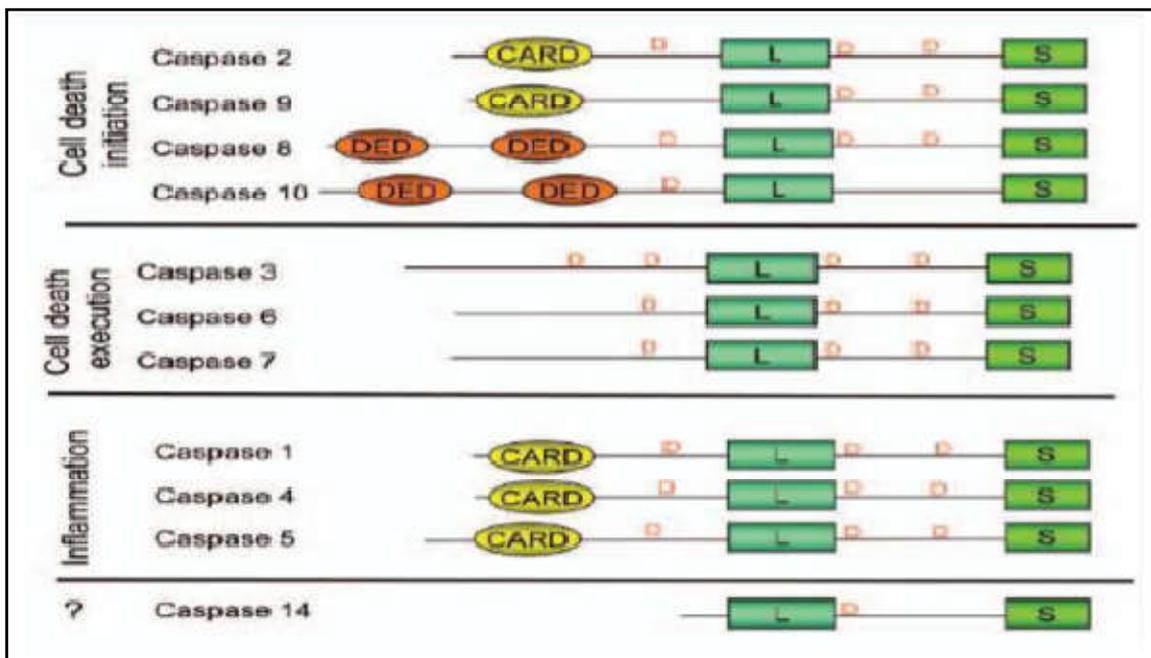


Figure 1 : Classification des caspases chez l'humain. CARD et DED L: sous-unité longue (p20). S: sous-unité courte (p10) (Jin et El-Deiry., 2005).

5.3. Structure :

Les caspases sont synthétisées sous une forme inactive appelée zymogène (pro-enzyme de 30 à 50 KDa). Elles ont une structure très conservée, constituée de trois parties (Fig 2) :

- le pro-domaine N-terminal (23 à 219 acides aminés) qui semble jouer un rôle dans les interactions « protéines-protéines » et dans la régulation de l'activation de ces enzymes (Thornberry et al., 1997).
- la grande sous-unité p20 (17-21 KDa) qui porte le centre catalytique.
- la petite sous-unité p10 (10-14 KDa) qui peut être séparée de la grande par des domaines « spacers » éliminés lors de la maturation.

Les caspases initiatrices de l'apoptose possèdent un long prodomaine qui possèdent des motifs d'interaction protéine-protéine appelés « Death Effector domain » (DED) et « Caspase Activation and Recruitment Domain » (CARD). Les caspases effectrices de l'apoptose se caractérisent par leur pro-domaine court (Jin et El-Deiry., 2005).

La maturation de chaque précurseur de caspase en enzyme fonctionnelle, nécessite au moins deux clivages : le premier entre la grande sous-unité (p20) et la petite sous-unité (p10), le deuxième entre le pro-domaine et la grande sous-unité. Ces clivages se font toujours au niveau d'une liaison Asp-X (où X est un amino-acide variable), par l'intermédiaire d'autres caspases ou par la caspase elle-même. Ce clivage génère deux fragments (Nicholson & Thornberry, 1997), c'est à dire deux hétéro dimères composés chacun de l'association des deux sous-unités, et comprenant donc deux sites catalytiques QACXG (Budihardjo et al., 1999). La caspase active possède donc une structure tétramérique composée de deux grandes sous-unités (p20) x2 et de deux petites sous-unités (p10) x2.

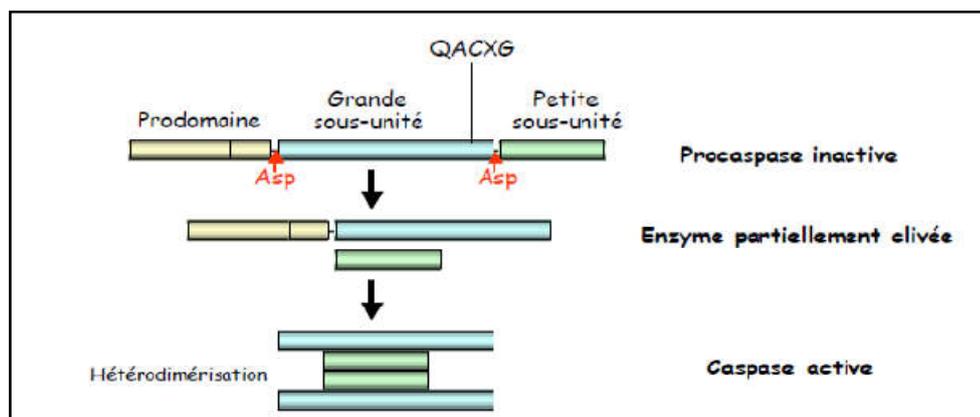


Figure 2 : Structure et mécanisme d'activation des caspases (Thornberry et al., 1997).

5.4. Caspases initiatrices / caspases effectrices

Les caspases ont été classées d'après la spécificité de leur substrat ou la taille de leur pro-domaine (Zimmermann et al., 2001 ; Leblanc, 2003) . Selon la taille de leur pro-domaine, deux classes de caspases se distinguent (Figure3) :

• les caspases à pro-domaine long : les caspases-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12 et 13, Les caspases possédant un pro-domaine long sont les caspases dites **initiatrices (ou régulatrices)**. se situent en amont de la cascade de signalisation. Elles ne participent pas directement à l'apparition des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose, mais elles auront pour fonction d'activer les caspases effectrices.

Selon la voie apoptotique empruntée, les caspases initiatrices se lient, par leur prodomaine, à différentes protéines adaptatrices. Les caspases initiatrices et les protéines adaptatrices se lient par leurs domaines analogues ; on distingue deux sortes de motifs, les domaines DED/DED et les domaines CARD/CARD :

- Les caspases-8 et -10 intervenant au cours de la voie extrinsèque possèdent des domaines DED et se fixent à la protéine adaptatrice FADD par son DED, avant activation.

- Les caspases-1, -2, -4 et -9 possèdent des domaines CARD qui permettent, avant Activation, leur recrutement au niveau de complexes protéiques tels que RAIDD (RIPK1 Domain containing Adapter with Death Domain) pour la caspase-2, par exemple, et APAF-1 pour la caspase-9.

• les caspases à pro-domaine court : les caspases-3, -6, -7 et -14, se situent en aval des caspases initiatrices. Ce sont les caspases **effectrices (ou exécutrices)**. Leur activation par les caspases initiatrices aboutit à un fonctionnement dit **en cascade** et à **un phénomène irréversible**. L'activation des caspases effectrices conduit au clivage de nombreuses protéines cellulaires, aboutissant aux étapes terminales et ultimes de l'apoptose. Les caspases -3, -6 et -7 sont les caspases directement impliquées dans l'exécution de l'apoptose.

D'autres caspases, comme les caspases-1, -4, -5, -11, -12, sont impliquées dans les processus inflammatoires, principalement dans le clivage protéolytique des cytokines pro inflammatoires comme l'IL1 et l'IL8 (Amarande-Mendes & Green, 1999).

5.4.1. Mécanisme d'activation des caspases

La cellule utilise plusieurs mécanismes distincts pour activer les caspases (Boatright & Salvesen 2003). Le plus simple appelé transactivation, consiste en l'activation des caspases par d'autres caspases. Ce mécanisme est utilisé pour l'activation des caspases effectrices par les caspases initiatrices et est à l'origine de la cascade de caspases (fig3), qui a également pour but d'amplifier le signal apoptotique. Les caspases effectrices peuvent aussi activer, d'autres caspases, grâce à des systèmes de régulation rétroactifs (Van de Craen et al.1999). Les autres mécanismes d'activation concernent uniquement les caspases initiatrices. Ils sont

provoqués par des interactions avec des protéines situées en amont dans la signalisation apoptotique.

Cette activation peut être due à l'induction d'un rapprochement entre plusieurs pro-caspases favorisant ainsi leur auto activation (Muzio et al. 1998). Ceci a été observé pour la caspase-8 lors de l'apoptose induite par les récepteurs de mort (Algeciras-Schimmich et al. 2002). Ces récepteurs, une fois activés, sont à l'origine d'un regroupement de procaspases-8.

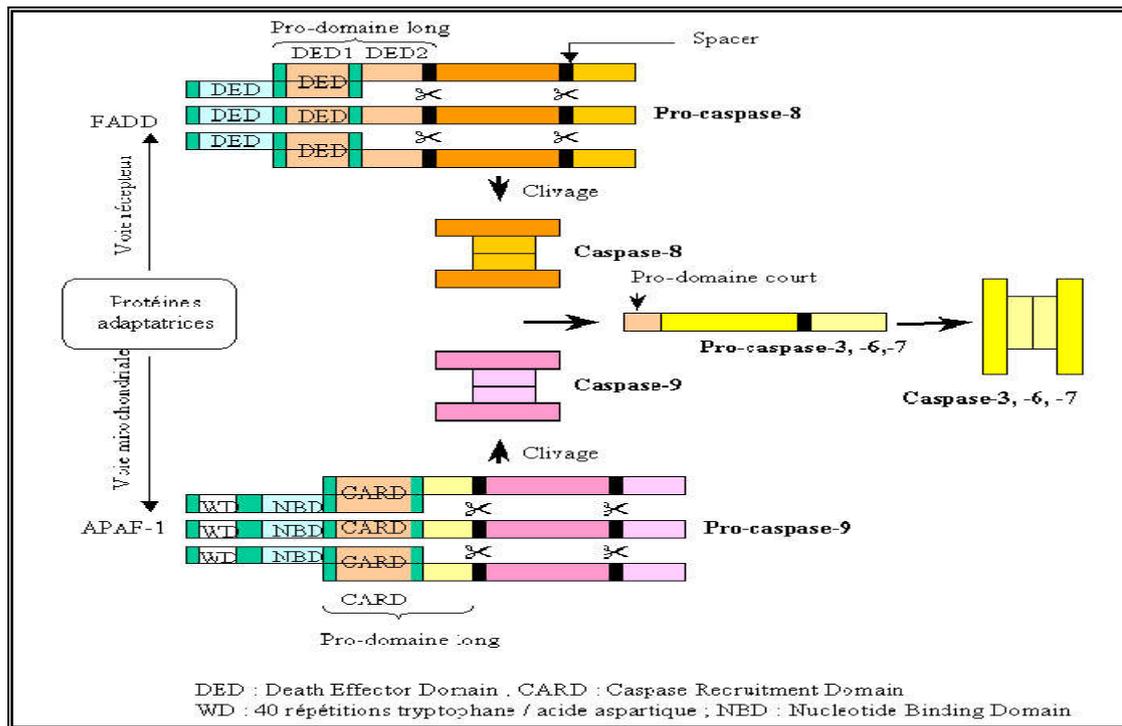


Figure 3 : Activation séquentielle des caspases

Les caspases-10 et -2 sont activées de façon similaire. L'activation des caspases initiatrices peut aussi résulter d'une association avec une sous-unité régulatrice. C'est le cas de la caspase-9. Le clivage protéolytique de cette caspase n'est pas suffisant pour son activation. En effet, cette dernière nécessite l'interaction avec le cofacteur Apaf-1 (Rodriguez & Lazebnik 1999). Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'un complexe multi protéique, l'apoptosome, constitué de la caspase-9, d'Apaf-1 et du cytochrome c (Li et al., 1997 ; Zou et al., 1999 ; Hill et al., 2003). La formation de ce complexe s'effectue en deux étapes et fait suite à la libération par la mitochondrie du cytochrome c dans le cytoplasme (Fig4). On assiste d'abord à un changement de conformation d'Apaf-1, grâce à sa liaison avec le cytochrome c et à l'hydrolyse d'ATP (Hu et al., 1999 ; Purring-Koch & Lendon 2000). Puis, sept sous-unités d'Apaf-1 s'oligomérisent et recrutent par leur domaine CARD plusieurs

procaspases-9 qui vont alors être activées (Srinivasula et al., 1998 ; Saleh et al., 1999 ; Acehan et al., 2002). En effet, Apaf-1 contient à son extrémité N terminale, un domaine CARD qui est exposé lors de son changement de conformation (Zhou et al., 1999). L'apoptosome représente la forme active de la caspase-9 (Rodriguez & Lazebnik , 1999).

La protéine Apaf-1 se lie d'abord à une molécule de déoxy adénosine triphosphate, d'ATP, pour réagir avec le cytochrome c pour former un complexe Apaf-1/cytochrome c/dADP, avec libération d'une molécule de phosphate Pi (partie supérieure de la figure). En présence de d'ATP, qui s'échange avec le d'ADP, 7 complexes s'assemblent pour former l'apoptosome actif (Li et al., 1997; Kim et al., 2005). la dimérisation de la caspase-9 entraîne une rapide activation des caspases effectrices - 3, 6 et -7 mais également des caspases initiatrices -2, -8 et -10 (Guerrero et al., 2007), une autre activité remarquable concerne la caspase-8 (ainsi que la caspase-10 *in vitro*) qui génère le clivage de Bid, (BH3 interacting death domain agonist) une protéine à BH3 (Bcl-2 Homology) isolé pro-apoptotique, dont la trans-localisation mitochondriale du fragment tBid génère la libération du cytochrome c nécessaire à l'activation des caspases post-mitochondriales (Li H Zhu et al., 1998).

Une étude, *in vitro* montre que, Les caspases effectrices -3, -6 et -7 partagent de fortes similitudes quant à la spécificité pour leur substrat. La caspase-6 est elle-même un substrat de la caspase-3. Elle possède une spécificité pour la lamine A (Slee et al., 2001) et une forte affinité pour la cytokératine 18 (Schutte et al., 2004).

Les caspase-3 et -7 sont très proches à la fois dans leur structure et leur spécificité (reconnaissance du même motif DEVD) (Aspartate-Glutamate-Valine-Aspartate). Récemment, il a été confirmé que la caspase-3 contrôle la fragmentation de l'ADN et les modifications morphologiques du noyau tandis que la caspase-7 jouerait un rôle important dans la perte de la viabilité cellulaire (Lakhani et al., 2006). peut-être par la dégradation de plusieurs sous-unités du protéasome (Jang et al., 2007). Il a également été démontré une haute affinité de la caspase-7 avec la (PARP-1) (Germain et al., 1999). En présence de caspase-3, l'absence des caspases -6 et/ou -7 a peu d'effets sur la protéolyse des protéines impliquées dans la dégradation de l'ADN (Slee et al., 2001).

Aussi, la caspase-3 est-elle reconnue comme jouant un rôle majeur dans la protéolyse de la plupart des protéines essentielles à la survie de la cellule. La fragmentation de l'ADN attribuée en grande partie à la nucléase CAD (« caspase-activated DNase ») (DFF40 chez l'homme) libérée de son inhibiteur ICAD/DFF45 après clivage de celui-ci est essentiellement due à la caspase-3 (Tang & Kidd., 1998). De plus, l'observation de cellules MCF-7

déficientes en caspase-3, soumises à divers traitements pro-apoptotiques, ne permet pas de visualiser la fragmentation de l'ADN et la morphologie nucléaire typiques de la cellule apoptotique (Kivinen et al., 2005). Cependant, l'absence de caspase- 3 peut-être compensée en partie par l'activité des caspases -6 et -7 (Liang et al., 2001). Plus généralement, en cas de déficience de la caspase-3 mais aussi d'autres caspases essentielles dans la transduction du signal comme la caspase-9, des voies alternatives utilisant les ressources en caspases de la cellule peuvent se substituer (Degterev et al., 2003). Il existe également des voies moléculaires indépendantes des caspases. On peut cependant noter que la déficience simultanée en caspase-3 et -7 dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) inhibe l'apoptose par blocage des événements mitochondriaux. (Lakhani et al., 2006).

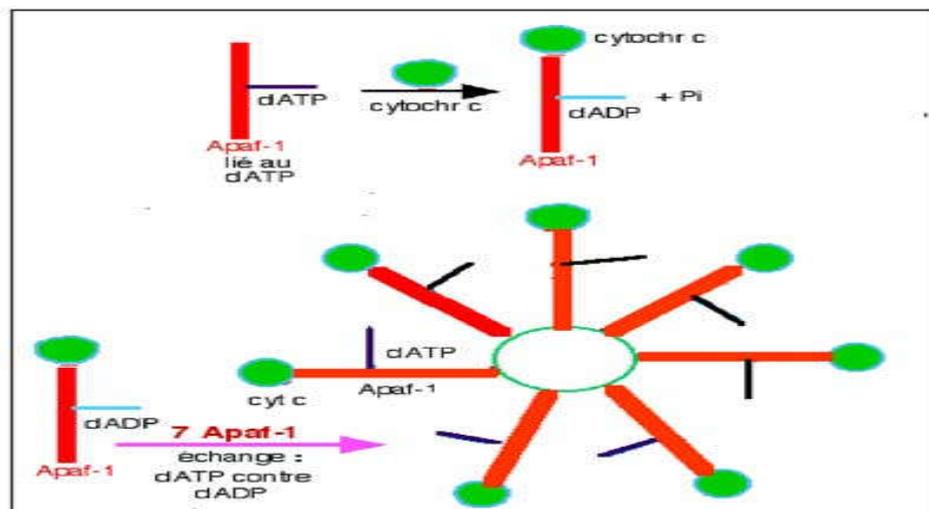


Figure 4 : formation d'apoptosome

6. Les mécanismes généraux de l'apoptose

Il existe aujourd'hui plusieurs voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose. La première, appelée voie intrinsèque, met en jeu la mitochondrie qui occupe une place centrale dans les mécanismes de l'apoptose.

Une autre voie est initiée à la surface de la cellule par des récepteurs membranaires, Ces deux voies de signalisation aboutissent toutes deux à l'activation des caspases, famille de protéases ayant un rôle clé dans l'apoptose. Aujourd'hui, d'autres voies de signalisation s'ajoutent à celles précédemment décrites ; la voie indépendante des caspases met en jeu une protéine mitochondriale appelée AIF (Apoptosis Inducing Factor). Et, outre la mitochondrie, le réticulum endoplasmique apparaît comme un compartiment cellulaire déclencheur de l'apoptose en cas de stress. Mais on précise sur la voie intrinsèque et extrinsèque :

6.1. Voie des récepteurs de mort cellulaire

Dans cette voie extrinsèque de l'apoptose, l'activation des différents récepteurs de mort se trouvant ancré à la membrane cytoplasmique aboutit à l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire complexe. Les récepteurs de mort sont classés en sept familles; Fas (CD95/APO-1), les récepteurs de mort DR3, DR6, p75NGFR (facteurs de croissance nerveux), ainsi que les deux récepteurs de TRAIL, les molécules DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2) et le facteur de nécrose tumorale TNF-R1 (p55/CD120 (Locksley et al., 2001). Cette dernière, comprend au moins une vingtaine de membres classés en deux groupes selon leurs structures:

1 Le premier groupe comprend les récepteurs qui possèdent un domaine de mort (DD) intracellulaire comme le TNF-R1. Ils assurent la transmission d'un signal apoptotique par activation des caspases (Figure 4).

2 Un deuxième groupe comprend les récepteurs qui ne possèdent pas de DD, comme pour TNF-R2. Ces récepteurs recrutent d'autres molécules capables d'activer le facteur de transcription NF- κ B, connu pour son rôle dans le maintien de la survie cellulaire (Locksley et al. 2001; Gupta & El-Deiry , 2005).

Certains de ces récepteurs nécessitent des molécules adaptatrices pour assurer leurs fonctions pro apoptotiques. On cite, à titre d'exemple, les protéines associées au domaine de mort du récepteur Fas (FADD) ou du récepteur TNF-R 1 (TRADD) qui vont se lier respectivement au Fas-R et au TNF-R1 pour assurer le recrutement des caspases. Dans le cas des récepteurs TNF-R ou Fas-R, par exemple, après fixation du ligand, le récepteur se trimérise et entraîne une modification de conformation du domaine DD. Ce changement de conformation permet la fixation de la protéine, associée au TNF-R 1, avec le domaine de mort (TRADD) sur le TNF-R 1 et l'association de FADD avec Fas-R. Ces récepteurs possèdent dans leur portion intracytoplasmique une région conservée, le domaine de mort DD, (death domain).Les ligands de ces récepteurs sont également des molécules trans-membranaires. L'interaction du ligand et de son récepteur nécessite la trimérisation de chacun d'entre-eux et un domaine extracellulaire fonctionnel distinct PLAD, (pre ligand-binding assembly domain).Le DD dépourvu de toute activité enzymatique permet le recrutement de protéines cytosoliques présentant un domaine homologue tel que FADD ou TRADD (Fas-associated death domain) qui comporte un motif aminoterminal appelé domaine « effector » de mort

DED, Le DED interagit avec un motif homologue situé dans le prodomaine des caspases -8 ou -10. Cet assemblage est appelé DISC (death inducing signaling complex) (Peter et Krammer, 2003), assurant l'auto-clivage de la pro caspase 8 ou 10 fig 5 . La caspase 8/10 activée déclenche une cascade d'activation d'autres caspases, dont la caspase 3, qui clivent alors certaines protéines cellulaires essentielles à la survie (PARP, la protéine Tau, les protéines de cytosquelette...) (Hengartner 2000; Hengartner & Bryant 2000).

L'activation des caspases effectrices par Fas est différente selon les cellules. Dans les cellules de type I (ex : thymocytes) la caspase- 8 peut activer directement caspase-3 (Medema et al., 1997). Dans les cellules de type II (ex : hépatocytes) cette activation dépend du clivage de la protéine à domaine BH3 isolé Bid par la caspase-8. Le fragment c-terminal libéré, tBid, migre au niveau de la mitochondrie et provoque l'activation de Bax/Bak (BCL-2-Associated X Protein),(BCL-2-Antagonist/Killer) conduisant à la libération des molécules solubles proapoptotiques en particulier le cyt c qui va contribuer à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la cascade des caspases post-mitochondriales (Li et al., 1998).

Il existe également un DISC comportant une interaction DED-caspase-10. Dans ce cas, *in vitro*, caspase-10 se comporte de façon similaire à caspase-8 mais *in vivo*, il semble que caspase-10 ne puisse pas se substituer à caspase-8 pour induire l'apoptose.

La signalisation induite par TRAIL (TNF related apoptosis-inducing ligand) est similaire à celle décrite précédemment pour les cellules de type II. De plus, la libération mitochondriale de Smac/Diablo est indispensable pour bloquer l'effet inhibiteur de XIAP (X chromosome linked inhibitor of apoptosis protein).

La voie de signalisation pro-apoptotique induite par TNF est plus complexe. Il a été récemment démontré que l'induction de l'apoptose par TNF-R1 se déroule en deux étapes. La première implique la formation d'un premier complexe qui rapidement déclenche l'activation de NF-kappa B (Nuclear Factor of chain κ of B cells) ou JNK (Kinase de la partie N-terminal de la protéine c-jun).La deuxième étape consiste en une modification de ce complexe I suivie de sa dissociation du TNF-R1 pour former un deuxième complexe via la fixation du DD avec FADD. Ce complexe II conduit à l'apoptose sauf si le complexe I active NF-kappa B et ainsi produit une surexpression de l'inhibiteur FLIPL (Micheau & Tschopp, 2003).

Cette étape peut être régulée par une protéine appelée c-Flip (pour FLICE inhibitory protein (Irmeler et al., 1997). cFlip (cellular FLICE (FADD-like interleukin-1b converting enzyme)-inhibitory) contient deux domaines effecteurs de mort cellulaire (DED) qui vont lui

permettre de se lier aux pro domaines des caspases 8 ou 10, et ainsi empêcher leur recrutement aux récepteurs de mort (notamment Fas-R et TNF-R ; (Bump et al. 1995). La protéine anti-apoptotique Bcl-xL (BCL-2 related Protein, Long Isoform) peut également inhiber la voie extrinsèque en supprimant la formation du DISC et l'activation de caspase-8. De plus, Bcl-xL provoquerait une sur-régulation de FLIP (Wang et al .,2004).

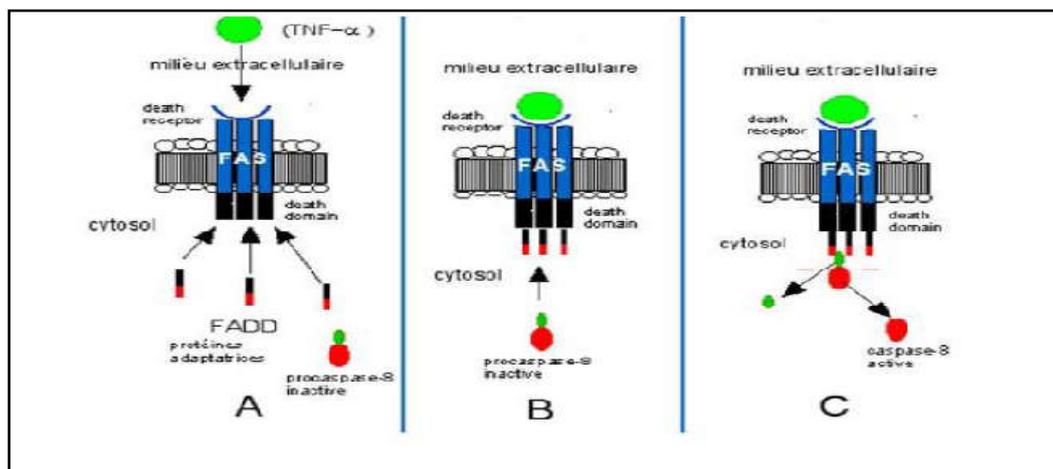


Figure 5:: cascade d'activation de l'apoptose extrinsèque (Brenner & Kroemer, 2000).

6.2. Voie intrinsèque: voie mitochondriale

Mis à part son rôle dans la production d'ATP, la mitochondrie joue un rôle important dans la régulation des mécanismes moléculaires de l'apoptose. En effet, de nombreux changements biochimiques surviennent au niveau des mitochondries suite aux stimuli engendrant un stress ou un dommage cellulaire, que ce soit à la suite d'un choc thermique ou osmotique, des radiations ionisantes, ou d'un sevrage en cytokines (Gutierrez et al. 2005). Parmi ces changements, on cite la perméabilisation de la membrane mitochondriale, accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de l'ouverture des mégapores mitochondriaux (Zomig et al., 2001). Cette altération est considérée comme le point de non-retour du processus apoptotique.

La perturbation du potentiel membranaire mitochondrial a pour principales conséquences l'altération de la production d'ATP et le relargage de plusieurs substances de l'espace inter membranaire vers le cytosol (Kelly et al., 2003). Le facteur inducteur de l'apoptose « AIF », la protéine inhibitrice des protéines activatrices de l'apoptose, nommée selon leurs fondateurs Diablo (Verhagen et al. 2000) ou Smac (Du et al., 2000) (Smac/Diablo, pour Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding protein with Low pI) et le cytochrome C sont parmi les principaux facteurs impliqués dans cette voie intrinsèque. Une fois libéré par la mitochondrie, le cytochrome C s'associe au facteur

d'activation des protéases apoptotiques Apaf-I, qui s'unit à la pro caspase 9 en présence d'ATP pour former l'apoptosome (Hengartner , 2000). Dans ce complexe, la caspase 9 est activée et clive les protéases «effectrices» (caspases 3, 6 et 7) (Rodriguez & Lazebnik, 1999), qui entraînent l'activation de la mort cellulaire par apoptose (Zou et al., 1997).

7. La famille BCL-2

La protéine BCL-2 (B-Cell Lymphoma Protein 2) a d'abord été identifiée comme protooncogène dans les lymphomes B folliculaires, où une translocation chromosomique conduit à une expression constitutive de ce gène. Puis, il a été montré que cet oncogène était responsable d'une inhibition de l'apoptose plutôt que d'une activation de la prolifération cellulaire (Vaux et al., 1988).

La famille Bcl-2 est un ensemble de protéines qui jouent un rôle important dans l'apoptose. Elles sont nombreuses et sont localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale, du réticulum endoplasmique ou de la membrane nucléaire grâce à leur séquence transmembranaire carboxy terminale. Elles sont classées en deux groupes: Les molécules anti-apoptotiques, et pro-apoptotiques.

➤ différents membres de la famille BCL-2

Chez les mammifères, la famille BCL-2 compte environ vingt membres, qui possèdent tous au moins un des quatre motifs conservés : BH1 à BH4 (BCL-2 homology domain). Selon leur fonction et la présence des domaines BH, on distingue les membres anti-apoptotiques, qui constituent la sous-famille BCL-2 et les membres pro-apoptotiques, subdivisés en deux groupes : la sous-famille BAX et la sous-famille BH3 (Figure 6).

La sous-famille *BCL-2* est formée par BCL-2, BCL-XL, BCL-W, A1 et MCL-1, Parmi ces derniers, BCL2, BCL-XL et BCL-W ont des structures très similaires et sont constitués des quatre domaines BH et d'un domaine C-terminal hydrophobe ou domaine transmembranaire (Petros et al., 2004). Ce domaine transmembranaire permet leur ancrage dans les membranes et plus particulièrement la membrane externe de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique ou de l'enveloppe nucléaire. BCL-2 est une protéine membranaire alors que BCL-XL et BCL-W s'associent à la membrane uniquement après un signal apoptotique. Ces protéines sont à l'origine d'une inhibition de l'apoptose et chacune d'entre elles semble intervenir spécifiquement dans un type cellulaire donné (Droin & Green, 2004). Ainsi BCL-2 est requis pour la survie des lymphocytes, des cellules rénales et des mélanocytes (Veis et al., 1993), BCL-W pour les cellules germinales (Ross et al., 1998), BCL-XL pour les cellules neuronales et érythropoïétiques (Gonzalez-Garcia et al., 1995) et A1 pour les neutrophiles (Orlofsky et

al., 2002). La sous-famille *BAX* comporte uniquement trois membres BAX, BAK et MTD/BOK qui présentent chacun une séquence et une structure similaires à BCL-2 mais avec seulement les domaines BH1, BH2 et BH3 (Petros et al. 2004). BAX et BAK sont exprimés dans de nombreux tissus alors que BOK est uniquement exprimé dans les tissus de reproduction (Hsu et al., 1997). Ces protéines favorisent la survenue de l'apoptose (Knudson et al., 1995, Droin &Green ,2004).

La sous-famille *BH3* est constituée de plus de huit membres chez les mammifères, dont BID, BAD, BIM, BIK, BMF, NOXA, PUMA, HRK, Les protéines de cette sous-famille sont caractérisées par la présence dans leur séquence d'un seul motif BH, le domaine central BH3, qui est essentiel pour leur fonction pro-apoptotique. Certaines interviennent dans l'initiation du processus apoptotique durant le développement (Bouillet & Strasser , 2002). En effet, les rôles physiologiques de BIM et de HRK ont été mis en évidence dans le développement et l'homéostasie tissulaire. BIM est essentiel pour l'élimination des lymphocytes auto-réactifs (Bouillet et al., 2002). Son absence induit une augmentation du nombre de leucocytes pouvant provoquer une maladie auto-immune.

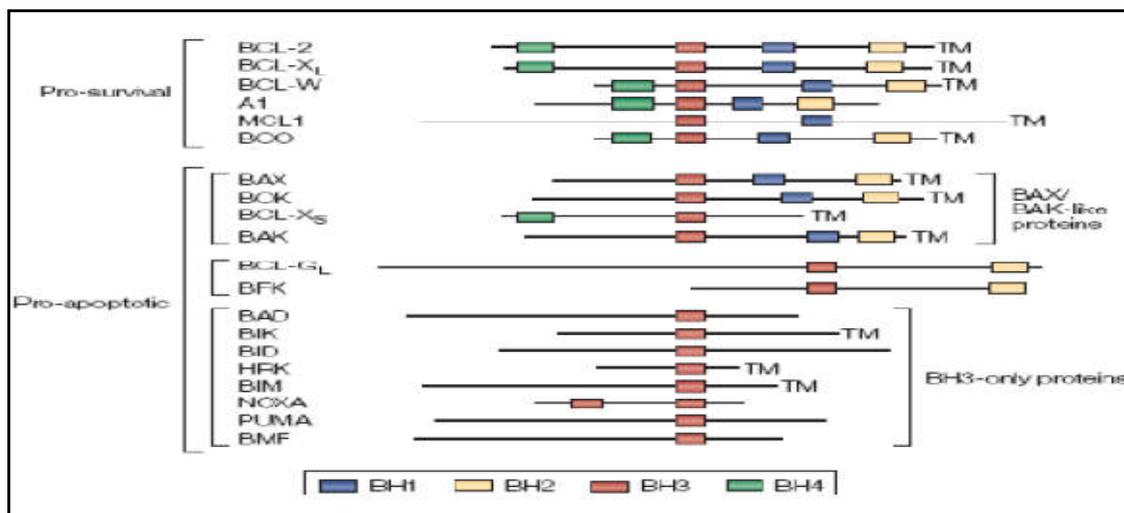


Figure 6: Membres de la famille BCL-2 (Strasser ., 2005).

➤ Principaux mécanismes d'action

La réponse cellulaire à un signal apoptotique dépend du ratio(%) entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Toutes les protéines de la sous-famille BH3 se lient aux membres anti-apoptotiques et neutralisent ainsi leur fonction de survie. A l'exception de BID, cette possibilité de former des hétéro dimères représente le seul mécanisme d'action des membres BH3.

La sous-famille BAX présente aussi cette particularité mais elle possède aussi une activité cytotoxique indépendante. Lors de l'apoptose, BAX s'intègre dans la membrane mitochondriale et contribue avec BAK à la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, à la chute du potentiel mitochondrial et à la libération de protéines apoptogènes comme le cytochrome c dans le cytoplasme (Mikhailov et al., 2003). L'oligomérisation de BAX semble être nécessaire pour son activité (Antonsson et al., 2000). De plus, la protéine BID entraîne elle-aussi la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme. Une fois clivée, tBID la forme active de BID interagit avec la membrane mitochondriale où il forme des homotrimères et induit le relargage de protéines de l'espace inter-membranaire par des mécanismes encore inconnus (Grinberg et al., 2002). BID pourrait former des canaux membranaires ou favoriser l'oligomérisation de BAX et de BAK (Eskes et al., 2000 ; Korsmeyer et al., 2000). BAX et BAK sont également impliqués dans l'initiation de l'apoptose au niveau du réticulum endoplasmique où ils induisent la libération d'ions calcium qui peuvent conduire à l'activation des caspases (Zong et al., 2003).

Les membres anti-apoptotiques de la famille BCL-2 assurent la survie des cellules par différents mécanismes. Tout d'abord BCL-2 contrôle l'activation des caspases initiatrices, comme la caspase-2, probablement en séquestrant des activateurs ou adaptateurs de ces caspases. Cette protéine assure également le maintien de l'intégrité des organelles notamment la mitochondrie. En effet, elle empêche la libération de protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie en inhibant l'oligomérisation de BAX et de BAK (Cory & Adams, 2002). Elle empêche aussi la chute du potentiel membranaire mitochondrial.

➤ **Régulation de la famille BCL-2**

Pour éviter une induction de l'apoptose dans les cellules normales, les protéines de la famille BH3, exprimées constitutivement, sont maintenues dans une forme inactive par divers mécanismes. Par exemple, BIM et BMF sont séquestrés au niveau du cytosquelette par interaction avec la dynéine et suite à un signal de mort, ils sont libérés dans le cytoplasme (Puthalakath et al., 1999). BAD, quant à lui, est phosphorylé et va être fixé par la protéine 14-3-3 qui empêche son action. Un troisième mécanisme de régulation est l'expression d'un précurseur inactif qui nécessite pour son activation un clivage protéolytique. C'est le cas de BID, dont le clivage libère la forme active tBID.

Certaines protéines de la famille BCL-2 sont aussi régulées transcriptionnellement. L'expression de BAX, NOXA et PUMA peut être induit par p53 (Villunger et al., 2003). De

même, HRK/DP5 est contrôlé transcriptionnellement suite à une absence de facteurs de croissance (Imaizumi et al., 1999).

7.1. Le pore de perméabilité transitoire (PPT)

L'ouverture de ce pore serait associée à la diminution du potentiel transmembranaire mitochondrial; (Zamzami et al., 2001) résultant en une entrée massive d'eau et d'ions, provoquant un gonflement suivi d'une rupture de la membrane externe mitochondriale et de la libération des protéines apoptogènes. L'ouverture et la fermeture de ce pore seraient, entre autres, régulées par les membres de la famille Bcl-2.

7.2. La formation de canaux ioniques non spécifiques

Plusieurs hypothèses retenues à l'heure actuelle suggèrent que ces protéines subissent des réarrangements structuraux au niveau de la membrane mitochondriale pour former des hétéro-ou des homodimères capables de former des pores membranaires, soit seuls, après oligomérisation, soit en association avec d'autres protéines telles que la porine mitochondriale (connue également sous le nom de canal anionique voltage-dépendant VDAC) ou l'adénine nucléotide translocase (ANI). En effet, au cours de l'apoptose, suite à l'élivage de Bid, sa forme tronquée (tBID) est connue pour interagir avec Bax et le libère de son interaction avec Bcl-2 ou Bcl-xL. Ceci induit un changement de conformation de Bax, sa translocation et son oligomérisation dans la membrane externe de la mitochondrie. tBid peut également transloquer à la mitochondrie et activer Bak, induisant son oligomérisation dans la membrane mitochondriale. Bax et Bak forment alors des canaux hétéro-tétramerique à travers lesquels le cytochrome c peut être relargué dans le cytosol. Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, tels que Bcl-2 et Bcl-xL, inhibent le changement de conformation et l'oligomérisation de Bax et de Bak. Les membres pro-apoptotiques à unique domaine BH3 tels que Bad, Bim, Bmf et Noxa interagissent avec Bcl-2 et Bcl-xL, inhibant leur fonction protectrice et pouvant même les convertir en membres pro-apoptotiques (Youle & Strasser, 2008).

7.3. Phagocytose des cellules apoptotiques

La clairance des corps apoptotiques est orchestrée par un ensemble de gènes pouvant être divisés en deux catégories. La première catégorie comprend les gènes nécessaires à la reconnaissance de la cellule apoptotique. La seconde classe de gènes intervient dans le remodelage du cytosquelette. Les phagocytes reconnaissent la surface de la cellule apoptotique par des signaux « mange-moi » émis par cette dernière. Le plus connu de ce

signal est la Phosphatidyl Serine (PS) à la surface de la membrane plasmique dont la distribution dans la membrane serait régulée par ABC-1. L'implication de nombreux récepteurs de phagocytose (CD91, CD14, CD36, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et le récepteur phosphatidylsérine (PSR) a été démontrée. La nature non inflammatoire du processus est favorisée par la libération, par les macrophages impliqués dans la phagocytose, de facteurs anti-inflammatoires incluant TGF beta et IL-10 (Danial et al., 2004).

7.4 . Molécules d'origine mitochondriale :

Parmi les molécules libérées, la plupart sont impliquées dans l'activation des caspases post-mitochondriales. La première à avoir été identifiée est le cytochrome c (cyt c).

• **Le cytochrome c** : Le cyt c est une hémoprotéine liée à la cardiolipine (CL) qui intervient dans le transport des électrons de la chaîne respiratoire et aussi dans l'inhibition de la formation des espèces réactives de l'oxygène. Lors de l'apoptose, la peroxydation de la CL conduisant à une perte d'affinité avec le cyt c expliquerait la libération massive et rapide du cyt c (garrido et al., 2006). le cyt c interagit, en présence d'ATP avec Apaf-1 (« apoptosis protease activating factor-1 », modifiant sa conformation et favorisant son oligomérisation. réagit avec le domaine CARD de la procaspase 9 pour former l'apoptosome (Brenner & Kroemer, 2000). Au sein duquel la caspase-9 est activée. L'activation de la caspase-9 conduit à l'activation en cascade des caspases-3 et -7 (Widlak & Garrard, 2005).

• **Smac/DIABLO** : Smac/DIABLO est une protéine mitochondriale libérée lors de l'apoptose. Cette protéine, synthétisée sous la forme d'un précurseur de 29 Kda, transloque dans la mitochondrie par son domaine Nterminal qui possède un signal de localisation mitochondriale. Il est ensuite clivé pour donner naissance à une protéine mature de 23 Kda. En réponse à différents stimuli apoptotiques, la protéine Smac/DIABLO mature est relarguée dans le cytosol où elle agit comme un inhibiteur des IAPs (Inhibitor of apoptosis proteins). Les IAPs cellulaires ont pour rôle de bloquer l'activation des pro-caspases et d'inhiber l'activité des caspases matures. Sous forme de dimères, Smac se lie aux IAPs, empêchant leur liaison aux caspases et ainsi leur inactivation (Ravagnan et al., 2002).

• **Omi/HtrA2** : Omi/HtrA2 a été identifié comme un nouvel inhibiteur des IAPs. Cette protéine est un précurseur de 49 Kda. elle migre vers la mitochondrie où son signal de localisation mitochondriale est clivé pour donner naissance à une protéine mature de 37 Kda. HtrA2 fait partie de la famille des protéases, Cette protéine est confinée dans l'espace intermembranaire mitochondrial et suite à l'action de facteurs comme la staurosporine, TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) ou les ultra-violets, elle est relarguée dans le

cytoplasme, où elle se lie aux IAPs comme Smac/DIABLO facilitant leur activation (Ravagnan et al., 2002).

- **L'AIF** : L'AIF a été identifié en 1996 par l'équipe de Susin. La protéine AIF est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 67 Kda constitué de trois domaines protéiques .

Une fois le précurseur introduit dans la mitochondrie, il est clivé et libère son domaine N-terminal donnant naissance à la protéine mature : une flavoprotéine de 57 Kda. Cette flavoprotéine a une fonction duale de NAD(P)H oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriales, et de facteur apoptogène. Son activité oxydoréductase n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique (Ye et al., 2002).Après un stimulus apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie, transloque dans le noyau des cellules en apoptose et induit une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN en fragments de hauts poids moléculaires (50 Kpb) (Ravagnan et al., 2002).

- **Endo G** : Durant l'apoptose de cellules de mammifères, elle est relarguée par la mitochondrie puis transloque dans le noyau. Elle digère l'ADN nucléaire en absence d'activation par les caspases (Widlak et al., 2000). ont démontré que l'Endo G est responsable, d'une part du clivage internucléosomal aboutissant à la formation des « ladders » dans des noyaux isolés, et d'autre part de l'obtention de fragments d'acides nucléiques de hauts poids moléculaires. Dans le noyau, elle pourrait agir de concert avec la DNase I ou avec l'héxonucléase. Ainsi l'action combinée de l'Endo G et de l'AIF, tous deux relargués par la mitochondrie, est un mécanisme totalement indépendant des caspases (Van Gurp et al., 2003).

- **Les caspases-2, -3, -8 et -9** : Les caspases-2, -3, -8 et -9 sont aussi reconnues comme étant des protéines apoptogènes relarguées par la mitochondrie durant le processus apoptotique (Van Gurp et al., 2003).

7.5. Rôle de p53 dans la voie intrinsèque :

p53 subit des modifications post-transcriptionnelles en réponse à la voie de signalisation des oncogènes ou en réponse au stress génotoxique. Ceci permet une stabilisation de la protéine qui s'accumule dans le noyau et régule l'expression de gènes cibles. De nombreux gènes sont régulés par p53 en particulier ceux encodant pour certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax, Bid, Noxa et PUMA. Parallèlement, la protéine p53 a été trouvée dans le cytoplasme où elle peut activer Bax (Chipuk et al., 2005). p53 joue également un rôle inducteur pour Apaf-1 et un rôle répresseur pour Bcl-2 (Raab, 2000).

1. Définition du stress oxydant :

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défenses antioxydants et la production des ERO (Pincemail., 2002), en faveur de ces dernières. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, tels que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire (Durackova et al., 2008), un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Abuja et al., 2001 ; Barouki, 2006 ; Jenkins et al., 2007).

2. Radicaux libres biologiques

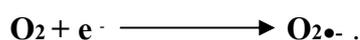
2.1. Définition

Les radicaux libres (RL) sont des espèces chimiques (atomes ou molécules), ou leurs fragments (Durackova, 2008) qui possèdent un ou plusieurs électrons célibataires (Kehrer, 1993 ; Delattre, 2005) sur leur couche externe et capables d'existence indépendante Plusieurs termes scientifique est utilisé pour désigner les RL : radicaux libres de l'oxygène, oxyradicaux et oxydants, (Baskin, 1994 ; Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

2.2. Nature et sources cellulaires des espèces réactives de l'oxygène :

2.2.1 Le radical anion superoxyde

Depuis la découverte de la superoxyde dismutase en 1969 par Mac Cord, il a été évident qu'il existait une source de radicaux superoxydes. L'absorption d'un électron par l'oxygène moléculaire Entraîne la formation du radical anion superoxyde (Favier , 2003).



L' $\text{O}_2^{\bullet -}$ peut également être formé dans certains organites cellulaires tels que les peroxysomes, et les mitochondries où 2% à 5% d'oxygène consommé est transformé en radicaux superoxydes (Favier, 2003).

2.2.2 Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou eau oxygénée :

L' H_2O_2 est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement l'intérieur et a l'extérieur de la cellule. (Gaudable & favier , 1997) pour engendrer des dommages loin de son site de production , Il est généré dans le peroxysome, (Cord, 1993) les microsomes et les mitochondries (Nohl et al., 2004) par une réaction de dismutation (Ramirez et al., 2008).

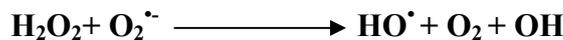
Réaction de dismutation



La dismutation de $O_2^{\cdot -}$ spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeur de l' H_2O_2 . L' H_2O_2 n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition (Maged, 1999),

2.2.3 Le radical hydroxyle HO•

Le radical hydroxyle, OH, est la forme neutre de L'ion hydroxyde (Valko et al., 2007) .il peut être induit par la réduction de L' H_2O_2 selon la réaction d' Haber-Weiss engendrant alors un ion OH- inoffensif et un radical hydroxyle HO• (Comhair & Erzurum, 2002).



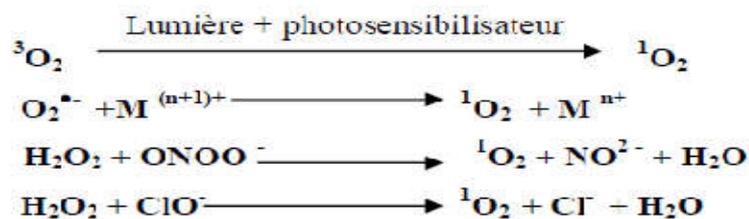
en présence de métaux de transition (fer, cuivre), l' H_2O_2 donne naissance in vivo via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO• hautement réactif (Goldstein et al.,1993 ; Liochev & Fridovich, 2002).



Avec une demi vie de l'ordre de la nanoseconde 10^{-9} s (Pastor et al., 2000), le radical hydroxyle est le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène (Guetteridge, 1993),

2.2.4 L'oxygène singulet : 1O_2

ces une Forme excitée de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilée à un radical libre en raison de sa forte réactivité (Haton, 2005), La formation de l'oxygène singulet en biologie est généré pendant la phagocytose ou la biosynthèse de la prostaglandine (Maged, 1999).



2.3 Origine des radicaux libres :

2.3.1 Sources exogènes :

Les sources exogènes peuvent être des facteurs environnementaux, pollutions diverses ou certaines carences nutritionnelles (Priyadarsini, 2005), aussi les radiations ionisantes capables de produire directement du radical hydroxyl (•OH) à partir de l'eau (Beckman & Ames, 1998)

2.3.2 Sources endogènes :

les constituants cellulaires solubles capables d'activer l'oxygène moléculaire comme la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes (Lawrenc, 1987). Les sites de génération de radicaux libres englobent principalement :

a- La mitochondrie :

Les mitochondries sont les organites responsables de la plus grande partie de la production de l'énergie (ATP). Elles possèdent deux membranes délimitant un espace intermembranaire et un compartiment matriciel. La membrane interne est le siège de la respiration qui correspond à un transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final l'oxygène.

b- Chaîne respiratoire mitochondriale :

La phosphorylation oxydative est le processus de couplage entre le transfert d'électrons (oxydation) et la synthèse d'ATP à partir d'ADP et Pi (phoshorylation). La chaîne respiratoire est constituée de 4 complexes dont 3 s'avèrent être des pompes à protons (Beckman & Ames, 1998; DiMauro & Schon, 2003) (fig7).

Et il se trouve que les transporteur des électronique dans la chaîne respiratoire mitochondrial est inexact, ce qui provoque la génération de L'O2 •- apartire de l'O2. Et la formation de H2O2 en présence d'une source de protons (Schagger & Von Jagow, 1991)

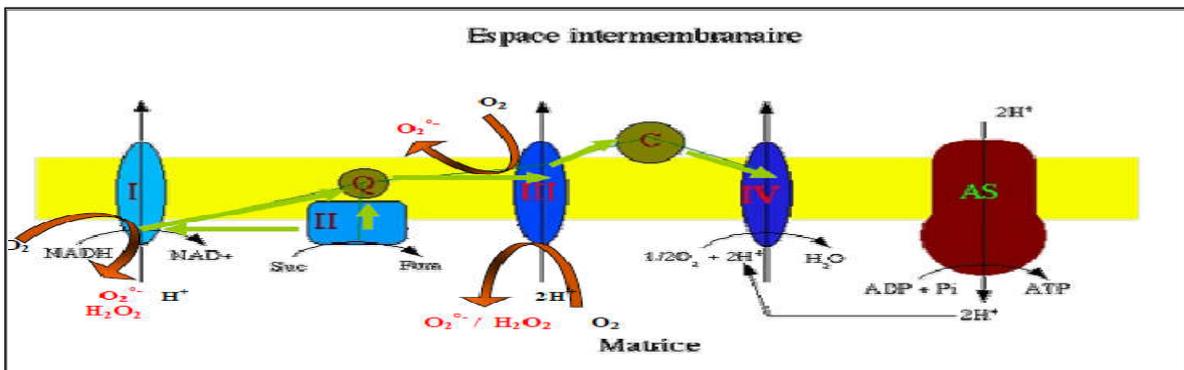


Figure 7 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire (Cadenas, 2000).

La production de ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matricielle ainsi que dans l'espace intermembranaire (fig11) (Chen et al, 2003 ; Han et al, 2003 ; St Pierre et al, 2002, Turrens, 2003). L'O2 •- généré dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par la superoxyde dimustase mitochondriale (Mn-SOD), l'H2O2 alors produit peut diffuser

rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme. L' $O_2 \bullet^-$ produit dans l'espace intermembranaire est soit : 1°) transformé par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn-SOD) (Han et al, 2003), 2°) détoxifié par le cytochrome c, ou 3°) transféré dans la cytoplasme *via* un canal voltage dépendant, Expérimentalement, cette production est 1 à 4 % de l'oxygène consommé en condition basale est affecté à la production de radical super-oxyde (Chance & Sies, 1979).

c- Le Peroxysome :

Une deuxième source de radicaux oxygène est la β -oxydation peroxysomale des acides gras (Kasai & Okada, 1989), qui génère H_2O_2 comme sous-produit (Ockner et al., 1993 ; Lake, 1995). Les peroxisomes possèdent des concentrations élevées de catalase, de sorte qu'il n'est pas clair si les fuites de H_2O_2 des peroxysomes contribuent de manière significative au stress oxydatif (Oikawa, 1995).

d- Les cellules phagocytaire :

La plupart des études de phagocytose ont été effectuées sur Les neutrophiles, des monocytes, des éosinophiles et des macrophages (Halliwell Barry, 2006). Ces cellules répondent toutes à Stimuli appropriés par une augmentation marquée de l'absorption d' O_2 , Appelé «éclatement respiratoire». (Heyworth et al., 2003 ; Babior, 2004). Les cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, qui est spécialisée dans la fabrication du radical superoxyde ($\bullet O_2^-$), et de la synthèse de molécules comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Segal, 2005) ou l'hypochlorite (ClO^-) (Daugherty et al., 1994 ; Winterbourn, 2002), indispensables à la destruction du matériel phagocyté (Sohal & Weindruch, 1996), l'oxyde nitrique (NO) Habituellement à partir de nitrique Oxyde synthase (NOS) enzymes (Wheeler et al., 1997 ; Shi et al., 2005).

e- la NAD(P) H oxydase :

Essentiellement localisée au niveau de la membrane plasmique. cette orientation lui permet d'interagir avec le substrat intracellulaire ($NADH, H^+$, ou $NADPH, H^+$) et de libérer l'ion superoxyde à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule (Souza & coll, 2001; Beaudeau & Vasson, 2005).

F- **Les ions métalliques** :comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaire in vitro : ils transforment H_2O_2 en radical hydroxyl ($\bullet OH$), encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique. (Fahn & Cohen, 1992).

3 . Stress oxydant et ses Cibles biologiques:

Sous certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué soit par une production exagérée de radicaux libres soit par une diminution des défenses antioxydantes sous l'effet de certains stimuli (Sorg, 2004 ; Kocchilin-Ramonatxo, 2006). L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell & Whiteman 2004; Valko et al., 2006) .

3.1. L'oxydation des lipides

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona et al, 2000). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong et al, 2004). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique. (Halliwell & gutteridge, 1989).

3.2 Oxydation des proteines

Les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002 ; Peng et al., 2000). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , La modification des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ROS est à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés (Welch, 1992 ; Essig & Nosek, 1997) et la perte de groupes sulfhydryl critiques (Levine, 2002).

3.3 Dommage de l'ADN

Les bases nucléiques sont susceptibles d'être directement oxydées par les ROS (Richter et al, 1988), conduisant à la formation de 8-oxo-guanine, à l'origine de mutations géniques (Ames et al, 1993 ; Cann & Wilson, 1983 ; Cortopassi et al 1992 ; Richter et al, 1988). pouvant conduire au développement du cancer (Cadet et al., 2002). Encore, Les aldéhydes issus de la peroxydation lipidique (4- HNE et l'MDA) sont des agents carcinogènes via la formation des adduits avec les bases nucléiques (Beckman & Ames, 1998 ; Wong & Cortopassi, 1997).

4. Systèmes de défenses antioxydants

4.1 Définition des antioxydants :

Une nouvelle vieille définition tente de définir un antioxydant comme « toute substance qui, une fois présentée à une concentration faible en comparaison avec celle d'un substrat oxydé, considérablement retarde ou empêche l'oxydation du substrat » (Heo et al., 2007).

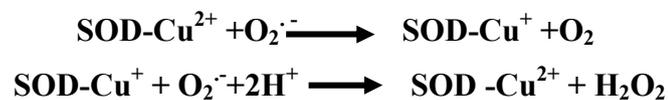
4.2 Différents types d'antioxydants :

Les antioxydants peuvent être classés en deux groupes principaux: les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. (Ratnam et al., 2006).

4.3 Les antioxydants enzymatiques :

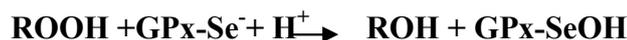
4.3.1 La superoxyde dismutase (SOD)

Cette enzyme et l'un des antioxydants enzymatiques intracellulaires les plus efficaces (Rahman, 2007), La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique (Ratnam et al., 2006), une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD) (Zelko et al., 2002), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été récemment montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001 ; Sturtz et al., 2001). La SOD convertit le superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire, selon la réaction suivante (Matès et al., 1999 ; Matès, 2000 ; Scheibmeir et al., 2005).



4.3.2 Glutathion peroxydase (GPx) et reductase (GR)

La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH) (Gladyshef et al 1999 ; Arthur 2000).

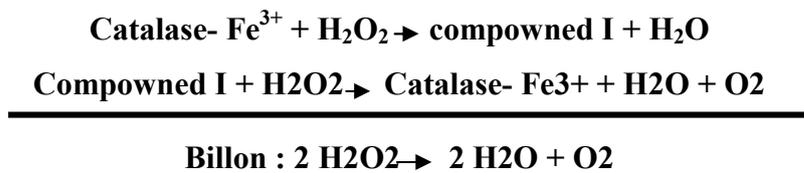


Le glutathion oxydé sera régénérée grâce à l'intervention de la glutathion réductase qui agit par oxydation du NADPH,H⁺, formé principalement par la voie des pentoses phosphates (Meister & Anderson,1983 ; Deneke & Fanburg;1989).

Les glutathions transférases possèdent aussi une activité peroxydasique vis-à-vis des peroxydes organiques mais pas vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène (Fisher et al., 1999) La glutathion réductase, quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons (Serdar et al., 2006),Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries. Au total,

4.3.3 La catalase :

La catalase est parmi les antioxydants puissants les plus connus dans la nature (Ratnam et al., 2006). Cette enzyme est localisée principalement dans les peroxyosomes et les mitochondries (Deaton & Marlin, 2003), elle se produit dans le corps, avec la plus grande activité dans le foie, suivie par les érythrocytes, puis les poumons (Ratnam et al., 2006).



4.4 Les antioxydants non enzymatiques :

4.4.1 Le glutathion (GSH) :

Il Est l'antioxydant cellulaire endogène majeur et est présent en quantités importantes dans les cellules (0,5- 10 mM) (Sugiyama, 1992 ; Rahman, 2007). Sa forme oxydée, GSSG, existe à 5 - 50 mM . Le GSH est synthétisé à partir de L-glutamate, L-cysteine, et la glycine dans le foie (Sies, 1999), il est également abondant dans le cytosol, les noyaux et les mitochondries. Il est le principal antioxydant soluble dans ces compartiments cellulaires (Ji et al., 1992 ; Rahman, 2007).

5.4.2 Thiorédoxine réductases :

Ces un Sélénoprotéine dimérique récemment découverte, elle est située dans le cytoplasme des cellules humaines et catalyse la réduction NADPH dépendante de la thiorédoxine (Ducros et Favier, 2004). Au nombre de trois isoformes, elles jouent un rôle essentiel dans les processus antioxydants en catalysant la régénération de la forme réduite de substances telles que vitamine C et vitamine E. Elles interviennent également de façon critique dans la régulation des facteurs de transcription NF-kB, Ref-1 (Didier et al., 2001), P53, et dans l'expression des gènes (Berggren et al., 1996).

5.4.4 La vitamine E

Le terme générique de vitamine E désigne en fait une famille constituée des tocophérols et tocotriénols, la forme la plus active étant l' α -tocophérol (Traber et Atkinson, 2007). De plus, les tocophérols et les tocotriénols ont les formes α , β , γ et δ , nommées sur la base du nombre et la position des groupements méthyles dans le cycle chromanol (Palozza et al., 2008 ; Masaki, 2010 ; Fusco, 2007)., l' α -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singuet ($1O_2$) en s'oxydant en quinone (Deaton & Marlin, 2003), d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle ($\bullet OH$). Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxy ($ROO\bullet$) pour former un radical tocophéryle (Van Stijn et al., 2008)

4.4.5 La vitamine C

La vit C ou l'acide ascorbique (Sugiyama, 1992). Une vaste gamme de ROS sont éliminés par l'acide ascorbique anions Superoxydes (Hemila et al., 1985 ; nishikim, 1975), radicaux hydroxyles (bieleki et al., 1982) et Oxygène singulet (bodanne et al., 1979), radicaux peroxy ($Higson et al., 1988$), acides hypochloreux (Samuni et al., 1983), les espèces réactives du nitrogène (peroxynitrite) et les radicaux dérivés des antioxydants (radicaux α -tocopheroxyl et l'urate) (Halliwell et al., 1987).

4.4.6 Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont des pigments naturels que l'on trouve en abondance dans les plantes et notamment les fruits et les légumes, les algues, certains types de champignons et certaines bactéries (Masaki, 2010). Les caroténoïdes sont des antioxydants liposolubles (Fusco et al., 2007) sont trouvé Dans les membranes cellulaires, et compris celles des lysosomes .ils sont une source importante de la vitamine A. L'activité antioxydante, elle résulte de la capacité de la double liaison conjuguée à délocaliser les électrons non appariés (Polyakov et al., 2006 ; Van Stijn et al., 2008) , Le principal mécanismes d'action des caroténoïdes dans la réduction du risque des maladie cardiovasculaire(CVD) incluent l'inhibition de La synthèse du cholestérol et une augmentation de la dégradation des lipoprotéines de basse densité (LDL) Par une amélioration de l'activité du récepteur de LDL des macrophages ,Là Est également une preuve que les caroténoïdes peuvent réduire le risque d'athérosclérose par inhibition Des dommages oxydatifs au LDL.



5 Les flavonoïdes comme antioxydants

5.1. Structure et classification des flavonoïdes

Actuellement, plus de 8000 flavonoïdes ont été identifiés (Edenharder & Grünhage, 2003). Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C6 (A et B) (Yao et al., 2004), reliés par un hétérocycle en C3 (Figure 8) (Bruneton, 1999; Pietta, 2000) Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules ; flavones, isoflavones, flavanones, flavanols, flavonols, anthocyanidines (Heim et al., 2002 ; Hendrich., 2006) (Tableau 1).

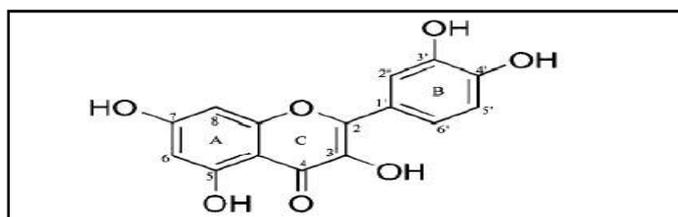


Figure 8 : Structure générale du noyau des flavonoïdes (Heim et al., 2002)

Tableau 1. Structure chimique de certains flavonoïdes (Heim et al., 2002)

Classe	structure générale	flavonoïdes typiques	Substituants
Flavanol		(+)-catechin (-)-epicatechin Epigallocatechin gallate	3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate
Flavone		chrysin apigenin rutin luteolin luteolin glucosides	5,7-OH 5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoses 5,7,3',4'-OH 5,7,3'-OH, 4'-glucose 5,4'-OH, 4',7-glucose
Flavonol		kaempferol quercetin	3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH
		myricetin tamarixetin	3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3'-OH,4'-OMe
Flavanone (dihydroflavon)		naringin naringenin taxifolin eriodictyol hesperidin	5,4'-OH,7-rhamnoglucose 5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 5,7,3',4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinoses
Isoflavone		genistin genistein daidzin daidzein	5,4'-OH, 7-glucose 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glucose 7,4'-OH
Anthocyanidin		apigenidin cyanidin	5,7,4'-OH 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe

5. 2. Effets biologiques des flavonoïdes

5.2.1 Activités biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmacologiques comme entre autres des effets, antiviraux, antimicrobiens et anticancéreux (Narayana et al., 2001 ; Seyoum et al., 2006) anti-allergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépatoprotecteurs (Middleton et al., 2000).

5.2.2. Activité antioxydante des flavonoïdes

Ces dernières années, un intérêt particulier a été accordé aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes (Wang et al., 2010 ; Soo Cheon et al., 2013), qui seraient attribuées à :

b.1. Piégeage direct de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. À cause de leur faible potentiel redox (Figure 9) (Javanovic et al., 1994), les flavonoïdes (Flav-OH) sont thermo dynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^\bullet) comme le superoxyde, le radical peroxy, le radical alkoxy et le OH^\bullet par transfert d'hydrogène.

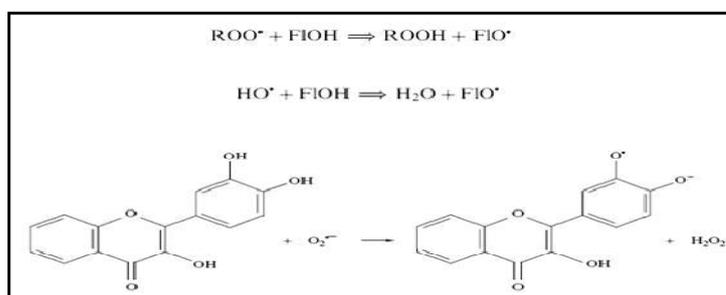


Figure 9. Réaction des flavonoïdes avec les EOR (Densiov & Afanas'ev, 2005)

b.2. Chélation des ions métalliques

Les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (par exemple, Fe pour la catalase, Cu pour la ceruloplasmine, Cu et Zn pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon les réactions de Fenton et Haber Weiss (Cottelle, 2001). Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Morris, 1995 ; Brown, 1998). Les études menées par Van Acker et ses collaborateurs (1996) ont suggéré que les groupes fonctionnels clés sur les Molécules de flavonoïdes qui peuvent participer à la chélation du métal sont (i) le

catechol 3', 4'- Groupe dihydroxy dans le cycle B, (ii) structure 3-hydroxy, 4-céto dans le C ring, et (iii) la possibilité de la chélation à travers la structure 5-hydroxy, 4-keto Entre les anneaux A et C, comme représenté schématiquement pour la quercétine (Thompson et Williams, 1976; Afanas'ev et al., 1989) (Figure 10).

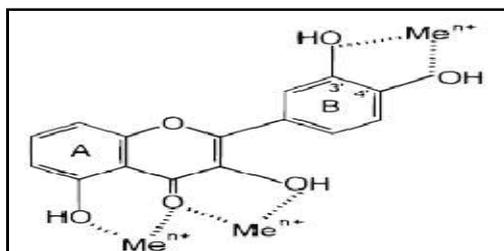


Figure10. Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Pietta, 2000).

b.3. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber une large gamme d'enzymes génératrices du $O_2^{\bullet-}$ et d'autres EOR, comme la xanthine oxydase, la protéine kinase C, la cyclooxygénase, lipoxygénase, monooxygénase microsomal, et la glutathion S-Transferase. Les flavonoïdes ayant une moitié catéchol sur le cycle B inhibent la succinoxidase mitochondriale et la NADH oxydase (Pietta, 2000 ; Densiov & Afanas'ev, 2005).

5.2.4 Activité anti-tumorale

Les propriétés biologiques et l'efficacité des polyphénols et des flavonoïdes de thé vert ont largement étudiées dans le domaine de la prévention du cancer et l'induction de l'apoptose (Manthey et al., 2001 ; Galati et al., 2008). Les flavonols des choux de Bruxelles et les flavones favorisent la stimulation des enzymes protectrices, telles que l'uridine 5'-diphospho (UDP) -GT (enzymes de conjugaison), la GST dans l'intestin et le foie. (Nijhoff et al., 1993 ; Vander et al., 2003) Ces enzymes inactivent les électrophiles, les radicaux libres et Des espèces réactifs d'oxygène (ROS) et les empêchant ainsi de devenir mutagènes. (Steele et al., 2000) ,Les flavonoïdes seraient impliqués dans la prévention des cancers, puisque ils limitent le développement de tumeurs expérimentale lorsqu'ils ont ajoutés au régime de divers animaux de laboratoire . Ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie, etc.) à tous les stades de la cancérogenèse (Petti & Scully, 2009). Au stade d'initiation, ils agissent comme agents bloquants en empêchant l'activation de procarcinogènes, en piégeant les mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation des ADNs mutés. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agents supprimeurs de tumeurs (Ho et al., 2007).

La Doxorubicine

1. Généralité

En 1963, Di Marco détecte une activité anti tumorale d'une nouvelle classe d'antibiotiques sur certains modèles de tumeurs murines. Le nom d'anthracyclines leur été attribué. Ces molécules sont fluorescentes et de couleur rubis (suffixe -rubicine) (Donatiello et al., 2002). Elles ont été extraites à partir de cultures de différents streptomyces isolés d'échantillons de sol, en Italie près de la mer Adriatique (préfixe adria-) et en France (Pein et al., 1995). Elles combinent un noyau polyaromatique tétracyclique de type aminoglycoside et un sucre aminé, la daunosamine (Roben., 1992).

2. Définition de la doxorubicine :

La doxorubicine est le membre le plus connu et le plus utilisé des Anthracycline. Produite tout naturellement par des actinobactéries de genre Streptomyces, elle a été isolée pour la première fois en 1960 et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974 (Hande, 1998; Minotti et al., 2004). Depuis, c'est le meilleur antinéoplasique connu et le plus utilisé, entre autres dans le traitement de cancers tels que les leucémies et les tumeurs solides (Weiss, 1992; Mizutani et al., 2005). Son administration se fait par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée (Hande, 1998). Les demi-vies de la doxorubicine sont: de 8 à 25 minutes, de 1h30 à 10h et de 24h à 48h. La présence de la deuxième phase de demi-vie serait due au métabolisme du médicament au niveau du foie, en doxorubicinol, et la troisième phase serait attribuable au relâchement du médicament des sites de liaison dans les tissus (Tannock & Hill, 1998). La doxorubicine ainsi que ses métabolites, Ils seraient excrétés majoritairement par la bile. Cependant, 5% serait excrété par les voies urinaires ce qui expliquerait la coloration rouge de l'urine, soit la couleur de ce médicament, quelques jours après le traitement. La doxorubicine agirait sur les cellules selon plusieurs modes d'action. Tout d'abord, près de 99.8% de son accumulation se ferait au niveau du noyau chez des cellules sensibles à cause de sa très grande affinité avec l'ADN (Cutts & Phillips, 1995). Sa structure plane (fig11), lui permettrait de s'insérer entre deux paires de bases azotées au niveau de la guanine du côté S' (S'-GCN) modifiant ainsi la structure de l'ADN (Cutts & Phillips, 1995; Iarussi et al., 2001). Cette modification inhiberait l'action de la topoisomérase II, qui est un enzyme nucléaire chargée de modifier l'ADN lors de la transcription (Barry et al., 2007), la réplication et la mitose (Potter et Rabinovitch, 2005). La stabilisation de l'enzyme par l'intercalation de la doxorubicine causerait l'arrêt du cycle cellulaire par activation de « check points », responsables d'activer la réparation de l'ADN ou

si les dommages sont trop importants, d'activer la mort de la cellule par apoptose (Koivusalo et al., 2005 ; Potter & Rabinovitch, 2005). Finalement, les composés de dégradation de la doxorubicine entraîneraient la formation de radicaux libres tels que l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyl ($\cdot OH$) (Voir fig15) (Singal et al., 1997). Ces radicaux libres endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires (Iarussi et al., 2001), En 1964, les premiers essais cliniques sur l'homme furent tentés. La toxicité cardiaque dose dépendante potentiellement fatale fut mise en évidence dès 1967. Les aspects cliniques de la cardiotoxicité liée à l'utilisation des anthracyclines sont bien connus depuis les années 70 (Pein et al., 1995).

3. Structure moléculaire

La doxorubicine est un antibiotique anthracyclique possède la structure polyaromatique des tétracyclines avec un aminosucre, la daunosamine qui est attachée par une liaison glycosidique. Les agents cytotoxiques de cette classe ont tous une structure quinone et hydroquinone, qui leur permet de fonctionner comme accepteur et donneur d'électrons (Bouma, 1986).

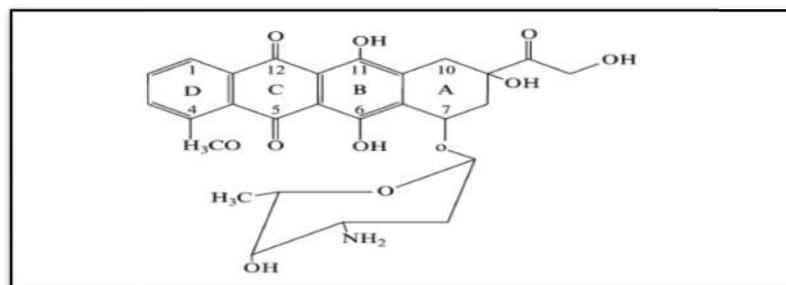


Figure 11 : La structure chimique de la doxorubicine (Sheela et al., 2005) .

4. La pharmacocinétique de la Doxorubicine

4.1. L'absorption et distribution

- La doxorubicine est injectée par voie intraveineuse.
- Liaisons aux protéines : 80 %. Tissulaire et rapide
- Ce médicament est rapidement distribué aux divers tissus du corps où il est concentré dans les noyaux des cellules, la concentration est élevée dans le foie et le cœur, les poumons, les reins, la rate et l'intestin grêle, tandis qu'une faible concentration dans le cerveau. La demi-vie de distribution initiale d'environ 5 minutes, tandis que son élimination est lente à partir des tissus qui se traduisent par une demi-vie terminale de 20 à 48 heures. La doxorubicine ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Mross et al., 1990).

4.2. Métabolisme hépatique

Elle est extensivement métabolisée, majoritairement au niveau hépatique par hydroxylation catalysée par des monooxygénases à cytochrome P450 (principalement le CYP3A4 et le CYP2D6) en doxorubicinol, métabolite actif, et comprend plusieurs des interactions (Drugdex ,2016) :

réduction de la Fonction carbonyle (C = O) de l'atome de carbone numéro 13 dans de la chaine latérale de la doxorubicine à un groupement alcoolique (OH) et cela par stimulation de l'enzyme cytoplasmique (NADPH-dépendent Aldo-céto réductase) et formation du métabolite hydroxy doxorubicine (figure 12), nommé doxorubicinol qui est le principal métabolite actif de ce médicament (Zhou, 2002).

déglycosylation en activant l'enzyme cytochrome P450 réductase et formation de hydroxy aglycones ou déoxy aglycones. Ensuite la doxorubicine et ses métabolites sont excrétés par la bile sous forme de DOXO ou doxorubicinol après 24Heures d'absorption ou bien sous forme de sulfates et glucoronides après 48Heures. La réduction enzymatique et le clivage en sucre de daunosamine aglycone sont accompagnés par la formation des radicaux libres.

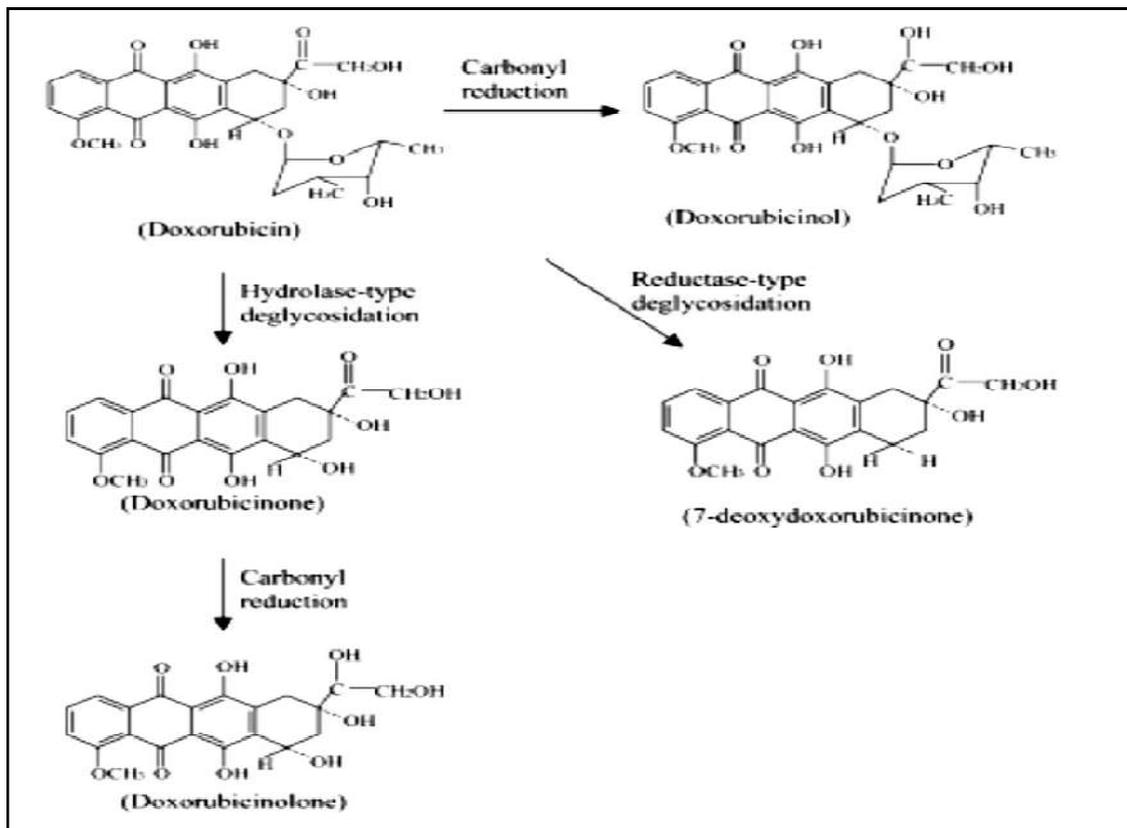


Figure 12 : métabolisme hépatique de la Doxorubicine (Zhou, 2002).

4.3. L'élimination

L'élimination biliaire. Environ 40% de la dose apparaît dans la bile en 5 jours, alors que seulement 5 à 12% du médicament et de ses métabolites apparaît au cours de la même période de temps dans l'urine (Zhou, 2002). le temps d'élimination est de 30 h Ces substances sont rapidement captées par différents organes : principalement le cœur, Seraient excrétés majoritairement par la bile. Cependant, 5% serait excrété par les voies urinaires ce qui expliquerait la coloration rouge de l'urine (Tannock ,1998).

5. Mode d'action

La doxorubicine agirait sur les cellules selon plusieurs modes d'action. Tout d'abord, près de 99.8% de son accumulation se ferait au niveau du noyau chez des cellules sensibles à cause de sa très grande affinité avec l'ADN (Cutts et al., 1995).

5.1. L'interaction avec les bases azotées de l'ADN

La DOXO s'insère entre deux paires de bases azotées, modifiant ainsi la structure de l'ADN (Phillips et al.,1996), ce changement conduit à entraver la corrélation enzymatique, les enzymes de réplication de l'ADN polymérase, des enzymes de clonage ARN polymérase, les enzymes de réparation de l'ADN, et inhibent ainsi les processus de réplication (Outomuro et al.,2007).

5.2. Inhibition de l'enzyme topo-isomérase II

La doxorubicine se relie avec le topo-isomérase II par des liaisons covalentes stables (irréversibles) formant ainsi le complexe topo-isomérase II -ADN-DOXO qui inhibe l'enzyme topo-isomérase II ce qui conduit à la mort cellulaire (Andrieu-Abadie, 1990).

5.3. Inhibition de l'enzyme hélicase

Une hélicase est une enzyme qui catalyse le désenroulèrent de la double hélice d'ADN pour permettre la réplication. Des nouvelles études estiment l'inhibition de cet enzyme par la doxorubicine (Hames et al., 1999).

5.4. Production des radicaux libres

La production des radicaux libres après fixation sur l'ADN entraîne de nouvelles lésions, de l'ADN, localement, mais aussi à distance (membranes, mitochondries) (Minotti, 2004). Les composés de dégradation de la Doxorubicine entraîneraient la formation des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}).Ces radicaux libres endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires (Iarussi et al.,2001).

5.5. Transport nucléaire

L'anthracycline pénètre la cellule par le récepteur pore MDR (Multi Drug Resistance), puis est transportée au noyau sur un protéasome.

5.6. L'apoptose

L'action proapoptotique des anthracyclines est en partie initiée par les radicaux libres, qui activent la protéine p53 et sa fixation sur l'ADN. La p53 y active la transcription du gène Bax (médiateur 35 proapoptotique), inhibe celle du gène Bcl-XL (médiateur antiapoptotique). Bax induit la libération du cytochrome c par la mitochondrie, par ouverture du pore mitochondrial, tandis que Bcl-XL a l'effet inverse. Cette 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. La p53 interagit aussi avec la topoisomérase II, dont elle inhibe la fonction ligase (Minotti, 2004).

7. voies de signalisation impliquées dans l'apoptose des myocytes cardiaques induite par la doxorubicine

La doxorubicine induit l'altération d'une multitude de voies de signalisation dans le coeur dont les voies de signalisation impliquées dans la synthèse de la Matrice Extracellulaire (MEC), la signalisation calcique, les signalisations mitochondriales ainsi que les voies de mort cellulaire (.Apoptose).La doxorubicine stimule l'activation d'une sphingomyélinase, qui induit une hydrolyse de sphingomyéline et la production concomitante de céramide. la génération précoce de céramide induite par le TNF est médiée par une sphingomyélinase neutre dont l'activité est sous la dépendance de la protéine adaptatrice FAN, contrôlant ainsi l'activation des caspases et le processus apoptotique. Le métabolisme du céramide et de la sphingosine est considéré actuellement comme au cœur d'un ensemble de voies de signalisation régulant le devenir de la cellule. (Stěrba et al., 2013)

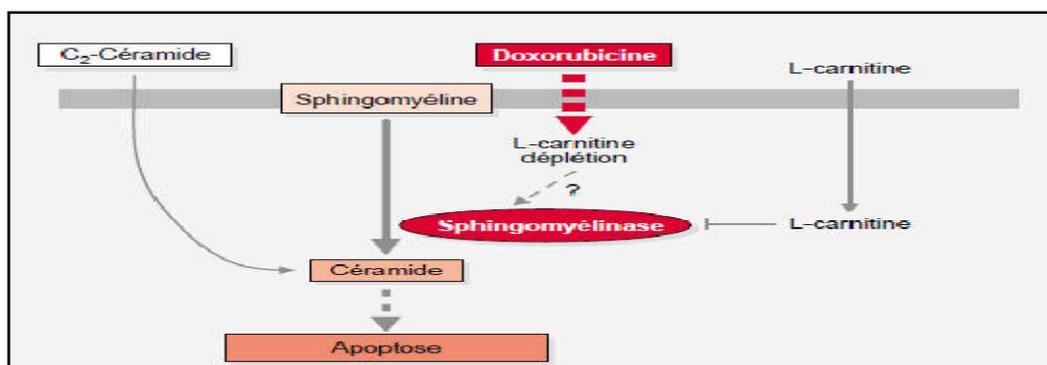


Figure 13 : Schéma hypothétique des voies de signalisation impliquées dans l'apoptose des myocytes cardiaques induite par la doxorubicine (Salvayre & Jaffrézou, 1999).

La cardiotoxicité de la doxorubicine

Le mécanisme de la cardiotoxicité des anthracyclines n'est pas parfaitement connu. Elle pourrait résulter d'une formation des radicaux libres superoxydes ou d'une toxicité cellulaire par lésions membranaires. Deux types de toxicité cardiaque sont individualisées aiguë et chronique (Walker et al., 1992).

1. La cardiotoxicité aiguë et subaiguë

Elle survient immédiatement ou dans les heures et jours après l'injection et consiste en plusieurs types d'effets : troubles du rythme, de la conduction observés dans 1/3 des cas et disparaissant avant la cure suivante (Yeung et al.,1991) , syndrome péricardite et myocardite très rare mais létal dans 1/4 des cas, atteintes myocardiques transitoires pouvant aboutir à une incompetence myocardique chez certains patients fragilisés et être réversible, épisodes de vasoconstriction coronaire pouvant entraîner une nécrose myocardique mais exceptionnels (Bricker et al.,1993).

2. Toxicité chronique

La toxicité chronique des anthracyclines se manifeste entre quelques jours et 8 mois après la dernière injection (moyenne voisine de 1 mois). Elle est corrélée à la dose totale administrée (Raber et al.,1994). Son risque d'apparition est dépendant de la dose cumulée d'anthracycline (Wojtacki et al.,2000) . Les troubles les plus fréquents sont des troubles du rythme et une cardiomyopathie (Walker et al.,1992).

3. Aspects biochimiques de la cardiotoxicité des anthracyclines

Il est classiquement admis que le mécanisme principal de cytotoxicité des anthracyclines envers les cellules tumorales est lié à l'intercalation du médicament au niveau de l'ADN, et à l'inhibition de l'enzyme nucléaire, la topoisomérase II. Cette enzyme est très peu exprimée dans les cellules cardiaques. Ont conduit à la recherche d'autres mécanismes susceptibles de rendre compte de la toxicité cardiaque des anthracyclines. Plusieurs hypothèses sont alors avancées (Delemasure, 2006).

3.1. Inhibition de la topoisomérase II

La topoisomérase II est une enzyme régulant l'état d'enroulement de l'ADN en générant des coupures double brin transitoires de l'ADN (Corbett & Berger , 2004).

Elles sont classées en deux types d'enzymes I et II. Les changements topologiques de l'ADN nécessitent l'introduction de cassures double brin transitoires produites par les topoisomérases II sans générer de dommages à l'ADN. Ce mécanisme est décrit dans la fig14. Les cassures de l'ADN par la doxorubicine sont principalement double-brins et s'effectuent par l'intermédiaire de complexes [ADN- doxorubicine -protéine] (Harkins et al.,1998).

La doxorubicine s'intercalé entre des nucléotides adjacents le long de l'ADN formant une interaction étroite ADN-médicament. Cette interaction perturbe la synthèse et la transcription de l'ADN par la stabilisation du complexe transitoire de clivage [DNA-enzyme]. L'inhibition de cette enzyme provoque un arrêt du cycle cellulaire en G1/M (Moro et al., 2004)

3.2. Induction d'un stress oxydant

Le mécanisme de cardiotoxicité induite par la doxorubicine le plus largement étudié est la génération d'un stress oxydant. En effet, la doxorubicine produit des radicaux libres et plus particulièrement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via différents mécanismes (Keizer et al.,1990 ; Hrdina et al.,2000).

La doxorubicine peut être réduite en un dérivé semi-quinone radicalaire par les flavoprotéines (telles que la NADH déshydrogénase ou la NADPH réductase mitochondriale) ou par la libération d'un électron suite à la liaison de la doxorubicine à l'ADN. Ce dérivé peut alors subir une deuxième réduction pour former une hydroquinone ou bien pour revenir à sa forme quinone grâce à une réaction d'oxydation catalysée par une NADPH oxydase. Cette réaction aboutit à la production de radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$). La dismutation du $O_2^{\bullet-}$ conduit à la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette réaction peut être catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) ou peut se produire de façon spontanée (Stěrba et al., 2013). l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène peuvent générer des radicaux hydroxyles, très réactifs et très toxiques par la réaction d'Haber-Weiss. Cette réaction, lente, peut être catalysée par certains métaux et plus particulièrement le fer (Halliwell, 2007).

Le deuxième mécanisme d'induction de stress oxydant implique la formation de complexes DOXO-Fer. En effet, le complexe Dox- Fe^{3+} peut être réduit notamment par la NADH cytochrome P450 réductase en DOXO- Fe^{2+} qui peut réagir avec l'oxygène et former du $O_2^{\bullet-}$. Sa dismutation entraîne la production d' H_2O_2 qui formera des radicaux hydroxyles par la réaction d'Haber-Weiss (Simůnek et al., 2009).

La doxorubicine peut également altérer le métabolisme du fer et ses protéines. La doxorubicine inactive les protéines IRP1 et 2 (Iron regulating protein) et augmente *in vivo* la

synthèse de ferritine (Protéine permettant le stockage du fer) (Minotti et al., 2004). L'augmentation de la synthèse en ferritine serait ainsi un mécanisme de défense limitant l'accumulation de fer qui peut être délétère (Arosio et Levi., 2010).

En effet, des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'accumulation de fer potentialise la cardiotoxicité induit par la doxorubicine. (Link et al., 1996 ; Miranda et al., 2003). Les patients atteints de cardiomyopathie induite par la doxorubicine ont également un taux de fer mitochondrial élevé et participerait à la voie apoptotique mitochondriale dépendante des ROS (Ichikawa et al., 2014). La doxorubicine peut également produire via une production importante de ROS et de monoxyde d'azote (NO) est produite à partir de la L-arginine grâce à l'activation de la forme inductible des NO synthases (iNOS) présente au niveau des macrophages et des cellules vasculaires. De plus, les anthracyclines peuvent être réduites par le domaine réductase des NOS endothéliales (eNOS) en dérivé radicalaire semi-quinonique qui, en présence d'oxygène moléculaire, peut conduire à la formation d'O₂⁻ (Vasquez-Vivar et al., 1997). Il a été démontré que la production concomitante de grandes quantités d'O₂⁻ et de NO pouvait induire la formation de peroxy-nitrite (ONOO⁻), qui pouvait lui-même générer le radical OH indépendamment de la mise en jeu des processus faisant intervenir le fer (Beckman et al., 1990).

Très récemment, le rôle de la dérégulation du NO, médié par les anthracyclines, a été décrit ainsi que différentes perspectives de manipulation pharmacologique du métabolisme du NO, afin de développer une nouvelle approche dans la prévention de la cardiotoxicité induite par les anthracyclines (Fogli et al., 2004 ; Mukhopadhyay et al., 2009)

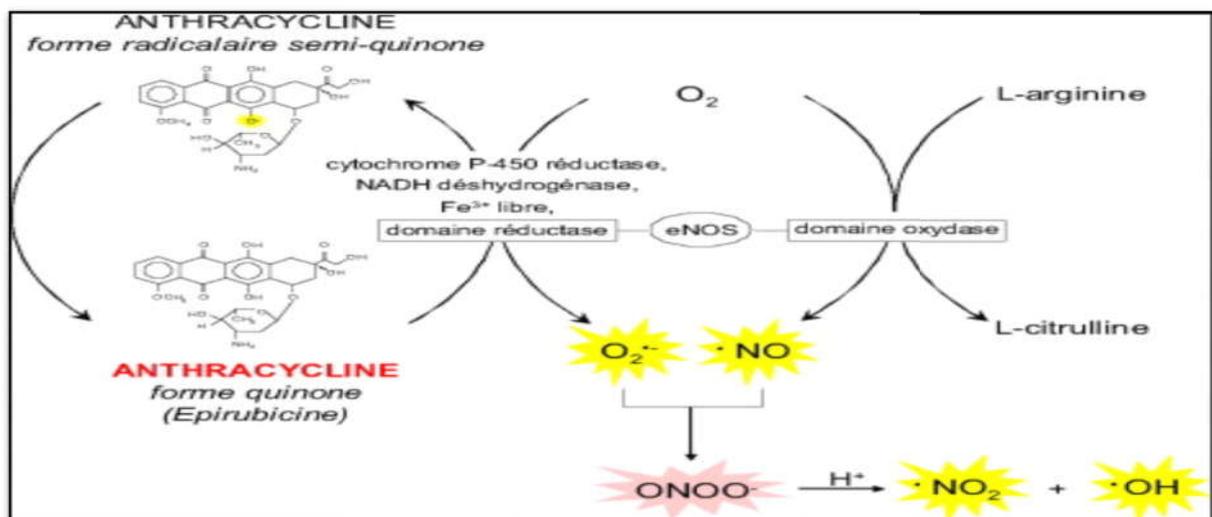


Figure 14: Production des radicaux libres par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines (Delemasure, 2006).

3.3. Apoptose

L'apoptose est un second mode physiologique de mort cellulaire programmée. Ce type de mort est impliqué dans des fonctions physiologiques contribuant au maintien de l'homéostasie en programmant la destruction des cellules (Kerr et al., 1972). Les anthracyclines pouvaient conduire à une perte de cellules cardiaques par apoptose qu'affecte moins de 1 % des myocytes cardiaque (Deputy et al., 1999) , cette apoptose induite était associée à une activation de la caspase 3 et à une augmentation du ratio Bcl2/Bax (Childs et al., 2002).

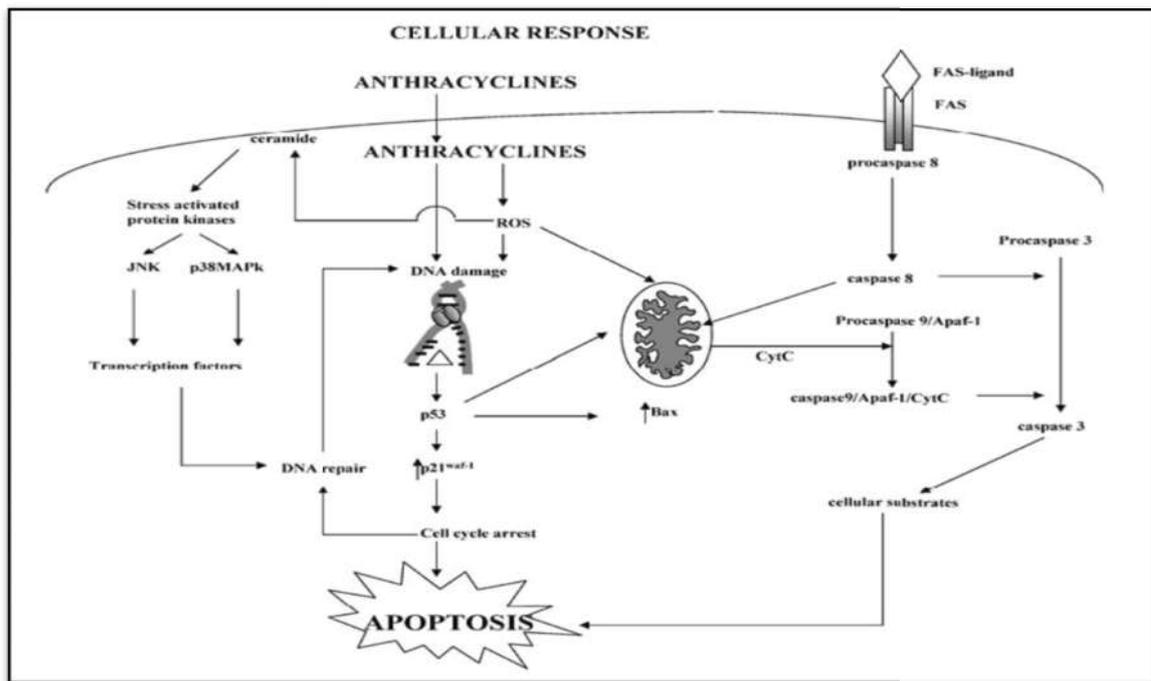


Figure 15: métabolites toxiques d’anthracyclines (Andrieu-Abadie et al., 1990).

4. Hypothèse des métabolites toxiques issus du métabolisme de la doxorubicine

La formation de radicaux libres est déterminante pour expliquer la toxicité cardiaque, et moins la cytotoxicité antitumorale. Elle aboutit à la peroxydation des lipides des membranes mitochondriales et du réticulum sarcoplasmique par liaison avec le diphosphatidyl-glycérol. Les cellules myocardiques sont très riches en mitochondries et très pauvres en enzymes protectrices des radicaux libres comme la catalase ou le superoxyde dismutase (Young et al., 1981). La cardiotoxicité des anthracyclines pourrait aussi être liée à la formation de métabolites toxiques directement issus du métabolisme de ces substances. (Weinstein et al., 2000) Par exemple l'épirubicinol, métabolite de l'épirubicine, formé dans le cytosol par des enzymes Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate-dépendantes (NADPH-dépendantes) serait moins actif sur le plan tumoral mais plus

toxique sur le cœur que son précurseur, l'épirubicine (Weinstein et al., 2000) Ce métabolite est capable d'inhiber certaines adénosine three phosphatases (ATPases) Ca^{2+} dépendantes du réticulum sarcoplasmique (Doroshov, 1991) . Ces métabolites, une fois formés dans les cellules, pourraient par leurs actions propres membranaires altérer les mouvements ioniques, en particulier les transferts calciques (Menna et al., 2007).. La cardiotoxicité serait alors liée à des spécificités cellulaires en relation avec le degré de métabolisme de l'anthracycline (Weinstein et al., 2000).

5. Aspects histologiques des lésions cardiaques induites par les anthracyclines

Sur le plan physiopathologique, l'étude histologique de biopsies endomyocardiques de tissus atteints met en évidence des altérations caractéristiques (Berry et Jorden , 2005):

Des anomalies quantitatives et qualitatives des cardiomyocytes ont été observées, les myocytes apparaissent petits, réfractés avec un cytoplasme présentant une accumulation lipidique, des lysosomes nombreux, une perte myofibrillaire ; déformation du réticulum sarcoplasmique, formation de vacuoles cytoplasmiques, distorsions myofibrillaires, raréfaction des myofibrilles associées à une nécrose myocardique, et une dégénérescence nucléaire surviennent, conduisant à la mort cellulaire (Bristow et al., 1978) , Il est important de souligner que les Anthracyclines ont une très grande affinité pour certains phospholipides, en particulier la cardiolipine. Ce phospholipide se trouve essentiellement dans la membrane interne de la mitochondrie. Les cellules myocardiques étant très riches en mitochondries, on assiste à une accumulation d'Anthracyclines du fait de cette affinité (Delemasure et al., 2006).

6. Prévention de la cardiotoxicité des anthracyclines :

pour prévenir les effets cardiotoxiques de la doxorubicine, différentes stratégies peuvent être employées :

6.1. Diminution de la dose cumulée totale de la doxorubicine

La diminution de la dose cumulée totale de doxorubicine chez l'adulte est à ce jour la prévention la plus efficace contre les complications cardiaques (Delemasure et al., 2006).

Une diminution significative de l'incidence de la cardiomyopathie aux anthracyclines si leur administration était hebdomadaire et non toutes les 3 semaines. Ainsi, une perfusion continue sur plusieurs jours plutôt qu'une injection en bolus permet de diminuer les risques de complications cardiaques (Omulokoli et al., 2000; Pelletier et al., 20004).

6.2. Nouvelles Anthracyclines et formes galéniques

Afin de limiter la cardiotoxicité de la Doxorubicine de nouvelles molécules de la famille des anthracyclines ont été développées (Minotti, et al., 2004 ; Appel et al., 2007). Certaines comme la Carminomycine, l'Esorubicin, la Quelamycine n'ont pas montré d'avantage par rapport à la Doxorubicine en termes d'altération de la fonction cardiaque (Wouters et al., 2005). D'autres, comme c'est le cas pour l'Epirubicine ont fait la preuve de leur intérêt et ont été commercialisées. En effet, l'Epirubicine possède une activité anti-tumorale identique à celle de la Doxorubicine mais présente une toxicité cardiaque moindre (Appel et al., 2007).

6.3. Protection pharmacologique

Afin de réduire la cardiotoxicité des anthracyclines, différentes molécules n'interfèrent pas avec l'activité anti tumorale et l'efficacité des anthracyclines ont été testées (Horan et al., 2006 ; Monsuez et al., 2010). le Dexrazoxane est La seule molécule dont l'utilisation soit actuellement reconnue (Speyer et al., 1992).

D'autres molécules ont été évaluées afin de limiter la cardiotoxicité des Anthracyclines (tableau 2) (Wouters et al., 2005). Ces molécules antioxydantes peuvent être classées en 3 catégories: celles qui piègent les radicaux libres, celles qui empêchent leur formation ou encore celles qui augmentent le taux d'antioxydants.

Tableau 2: Molécules testées dans la protection de la cardiotoxicité des Anthracyclines adapté (Wouters et al., 2005).

Agent	Classe ou action thérapeutique	Mécanisme d'action
Dexrazoxane	Chélateur	Prévient la formation de radicaux libres, inhibe les topoisomérases, se fixe sur le fer
Amifostine	Cytoprotecteur	Chélateur de radicaux libres
Probucol	Hypolipémiant	Stimule la synthèse endogène d'antioxydants
N-acétylcystéine	Mucolytique	Stimule la synthèse endogène d'antioxydants
Carvedilol	Antagoniste β adrénergique	Prévient la formation de radicaux libres et la déplétion en antioxydants endogènes
Telmisartan	Antagoniste des récepteurs à l'angiotensine II	Prévient la formation de radicaux libres
Vitamine A, C, E	Nutriments	Antioxydant
Coenzyme Q10	Complément alimentaire	Antioxydant
Sélénium	Oligo-élément	Antioxydant, anti-cancérogène
Carnitine	Complément alimentaire	Antioxydant
Iloprost	Analogue des prostaglandines I ₂	Prévient la formation de radicaux libres, vasodilatateur, antiagrégant

La plante médicinale Algérienne *Phlomisbovei* De Noé, syn. *Phlomis samia* Desfontaines**1- Description botanique**

La plante *Phlomis bovei* De Noé, syn. *Phlomis samia* Desfontaines appartient à la famille Lamiaceae, qui comprend plus de 100 espèces végétales réparties sur le continent de l'Europe, l'Asie et l'Afrique du Nord (Demirci et al., 2008). Le genre *Phlomis* (Lamiaceae) comprend quelque 250 espèces et sous-espèces largement distribuées en Chine (60 espèces), Ex-URSS (54 espèces) et en Turquie (45 espèces). Quatre espèces poussent dans le nord de l'Algérie: une espèce méditerranéenne, *Phlomis herba-venti* et trois espèces endémiques, à savoir *Phlomis bovei*, *Phlomis caballeroi* et *P. crinita* (Quezel et Santa, 1963) (Kabouche et al., 2005). *P. bovei* est une plante pérenne herbacée, qui croît jusqu'à 0,8 m. Et développe souvent une solide base boisée. Toutes les pièces sont collantes, en raison de son dendroïde. Cheveux glandulaires stellés. (Liolios et al., 2007). Les feuilles de *Phlomis* sont entières, opposées et découpées et veineux rugueux ou réticulé. Les bractées sont similaires ou différentes des feuilles inférieures. Toutes les pièces sont souvent recouvertes par des cheveux. Bractées sont ovales, lancéolées ou linéaires. Les fleurs sont arrangées en faire des tourbillons autour des tiges, qui sont habituellement en section carrée. Coins arrondis, bien que tomentum sur les tiges puisse les faire apparaître circulaires. La couleur des fleurs varie de jaune à rose, violet et blanc (Liu et al., 2008). Le calice est tubulaire ou campanulé avec 5 ou 10 veines visibles. Il a cinq dents, soit toutes égales, soit les deux extérieures plus long que les autres. La lèvre supérieure est en forme de capot et latéralement comprimé. La lèvre inférieure est trifide (Celika et al., 2005), le lobe central étant plus grand que les latéraux. Il y a quatre étamines qui montent sous la haute lèvre. L'anthère a une extrémité fourchue, la fourchette supérieure étant plus courte que la plus basse. Les fruits sont à quatre ou trois côtés, des noisettes et parfois surmontés de cheveux et parfois glabres (Pottier-Alapetite et al., 1981). À ce jour, deux sous-espèces ont été enregistrées pour *P. bovei* De Noé: *P. bovei* De Noé subsp. *bovei* et *P. bovei* De Noé subsp. *maroccana* Maire (Celika et al., 2005). Alors *P. bovei* De Noé est une endémique algérienne rare, communément connue sous le nom de Kayat El Adjarah dans le dialecte algérien ou nommé Farseouan, Tarseouan, Iniji, R'ilef et Azaref dans tout le nord de l'Afrique et appelé sage Jérusalem grec ou sage Jérusalem collant (Trabut et al., 1935). C'est l'une des neuf plantes endémiques enregistrées dans le Rapport national sur la diversité biologique (Quezel, & Santa, 1963) (Liolios, 2007). Cette plante endémique est distribuée dans ses différentes formes dans la Grèce et la Turquie, et le

continent de l'Asie, en Europe et en Afrique du Nord, elle résiste à la sécheresse et à faible température jusqu'à - 20 ° C comme il se distribue dans les forêts et sur les routes en pierre des montagnes à hauteur moyenne, et la Date de floraison est du Mai à Juillet (Vivaces,2007) (Liolios et al. , 2007) .



Figure 16 : Photos des feuilles et fleurs de la plante *Phlomis samia*.

2. Classification

King dom : plantae	Subkingdom : Tracheobionta
Embrenchement :	spermatophytes
Subembrenchement :	Angiospermes
Division :	Magnoliopsides
Class : Magnoliopidae	Subclass : Asteridae
Order : Lamiales	Familly : Lamiales (Labiées)
Genre : Phlomis	Espece : samia
Sub sp : desfontaines	

(Quezel & Santa, 1963)

3. Phytochimie :

Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés à partir des parties aériennes de la plante glucoside iridoïdes (yalcin et al., 2003) (demirci et al., 2008) . tel que loganine et aucubine et verbenalin (Sarkhail et al., 2003) et ainsi que trois des glycosides phénylethanoid (Kabouche et al ., 2005; Demirci et al., 2008 ; Demirci,2008) tel que le composé martynosid (Alchukl17-1) et le composé 4oacetylmartynoside (Figure 17 -2) et samioside (Figure 17-3) (yalcin et al., 2003).

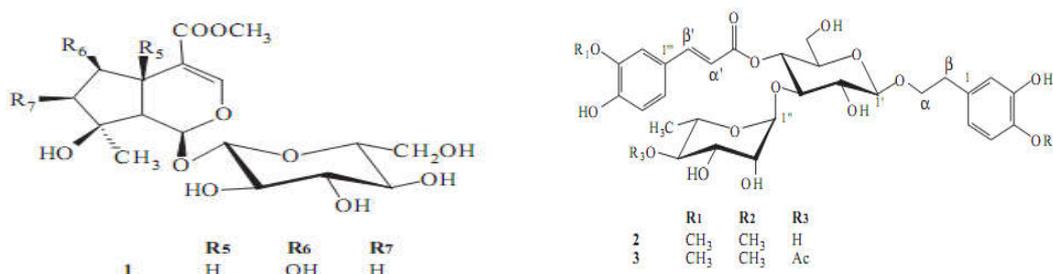


Figure17 : Certains composants chimiques de *Phlomis* .s

En plus de lignane et phénylpropanoïdes composé phénolique simple sur la figure (18) 1, le glucoside, 2,6-diméthoxy-4-hydroxyphényl-1-OD-glucopyranoside ,aussi le composé trouvé No. 2 megastigmaneglucoside tel que phlomuroside (= 3-hydroxy-5,6-epoxyionol-9-O-Dglucopyranoside) et le composé 3 diabète de nucleotides d'uridine (yalcin et al., 2003) .

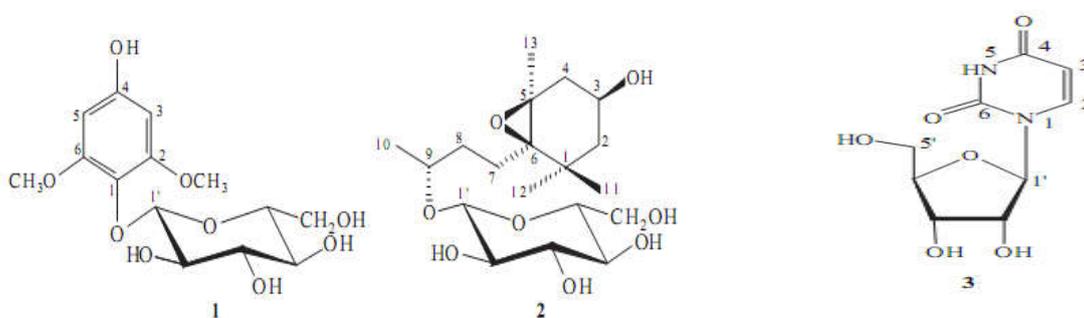


Figure 18: les formules chimiques des certains composants.

Des Flavonoides les plus importants: **chrysoeriol**, **apiginine**, **lutéoline** (Kabouche et al., 2005) (Marin et al.,2007) **iriodictyol**, **naringénine**, **flavanones** (Marin et al., 2007) plusieurs sucres (Saracoglua et al .,2003) L'huile essentielle a une couleur jaune clair et un parfum distinctif. Il se compose de D germacrène par 21,45% (Liolios et al., 2007) (Sarkhail et al., 2006) et β-caryophyllène par 8,43 % et thymol en 7,05% (Celika et al., 2005) et de l'acétone de hexahydrofarnesyl 5,84% (Liolios et al., 2007) se l'huile végétale pénètre dans la fabrication des parfums et des cosmétiques en raison des propriétés anti-microbiennes (Celika et al., 2005) (Liolios et al., 2007) (Demirci et al., 2008) et en raison de l'efficacité de l'huile

extraite de la plante dans l'élimination des bactérie , il est apte à et est commercialisé comme un pouvoir antiseptique qui nécessite plus de recherches et d'études (Liolios et al., 2007).

4. Place des *Phlomis .sp* en phytothérapie :

les gens utilisent la plante *Phlomis* en médecine comme un boisson pour le traitement plusieurs cas (Ben Amor et al., 2008; Demirci et al ., 2008) Certaines espèces de *Phlomis* sont utilisées comme stimulant, tonique (Sarkhail et al., 2003; Demirci et al ., 2008) et pour la guérison des plaies (Saracoglu et al., 1998; Zhang et al., 2008). De nombreuses études ont montré diverses activités, telles que les anti-inflammatoires, Immunosuppresseur (Katagiri et al., 1994; Shin & Lee., 2003), balayage des radicaux libres (Kyriakopoulo et al., 2001) , antimicrobien (Kirmizibekmez et al., 2004), antiulcéreux (Katagiri et al.,1994) et Activités antimutagéniques (Liu et al., 2008) . Le genre *Phlomis* ou leur huiles essentielles sont utilisées dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (Demirci et al., 2008) . Les huiles essentielles sont utilisées comme arôme pour les aliments et comme Parfum dans l'industrie des parfums et des cosmétiques. Ils Ont été proposés comme agents conservateurs naturels pour Préparations cosmétiques à cause de leurs antimicrobiens Activités , Des espèces de *Phlomis* sont utilisées dans la médecine folklorique comme analgésique (Sarkhail et al., 2003) ,antidiabétique, antipyrétique, antidiarrhéique, Antiallergiques, antiulcériques et antiémorrhéroides (Kirmizibekmez et al., 2005 ; Harput et al., 2006). Il existe quelques études pharmacologiques et biologiques sur *Phlomis* Certaines études ont montré diverses activités telles que Antiinflammatoire, antinociceptive (Sarkhail et al.,2003 ; Mohajer et al.,2005), immunosuppresseur, Antimutagène (Saracoglu et al.,1995 ; Sokovic et al., 2002), antimicrobiens et contre les radicaux libres (Kyriakopoulo et al., 2001) et Des effets antipaludiques (Kirmizibekmez et al.,2004).

Les espèces *Phlomis* constituent Une source riche de différentes classes de glycosides comprenant Triterpénoïdes (Calis et al.,2004), diterpénoïdes (Katagiri et al.,1994) , iridoïdes (Zhang et al.,1991) , flavonoïdes, Phénylpropanoïdes et autres composés phénoliques (Sarkhail et al., 2006) (Saracoglu et al., 1998) certains Dont antioxydants, antiinflammatoires et immunosuppresseurs Activités (Ismailoglu et al., 2002) Phényl propanoïde acide caféique, alcool phényléthylrique et Glycosides de phényléthylalcool isolés de *Phlomis armeniaca* Ont été trouvés pour montrer une activité cytotoxique contre plusieurs types de cancer cellules. Cependant, ils n'ont pas affecté la croissance et la viabilité de Hépatocytes de rat cultivés primaires (Saracoglu et al., 1995). Verbascoside, isoverbascoside, Forsythoside B et 3- Ester

méthylque d'acide O-caffeoylquinique isolé de *Phlomis Brunneogaleata* a montré une activité cytotoxique contre les lignées cellulaires L6 (Kirmizibekmez et al., 2004).

il ont constaté que certaines espèces de *Phlomis* Comme *Phlomis lychnitis* ou *Phlomis tourne*, *Phlomis purpurea* possède Activités antihémorrhéroides et cardiotoniques, et favorise La circulation du sang et élimine la stase du sang. Bien que il ya un manque des étude détaillé, les travaux futurs vont probablement générer des effets intéressants (Ben Amor et al., 2009) . De nombreuses espèces de *Phlomis* sont connues pour posséder des activités anti-infectieuses. Ils réduisent la fièvre, traitent les infections de la gorge et Éliminer les parasites Ils sont riches en huiles essentielles Tel que reconnu par leur activité antimicrobienne. En conséquence, beaucoup Des études ont évalué les activités antimicrobiennes des huiles essentielles des Extrait d'espèces de *Phlomis* (Ben Amor et al., 2009) .

les flavonoïdes connus pour sont activité anti-inflammatoires et anti allergique (Shin& Lee, 2003) anti-coagulation et protecteur des muqueuse gastro-intestinale (Saracoglu I et al.,1998) (Katagiri et al., 1994) renvoie cette capacité des flavonoïdes a influencer la production des prostaglandine et des propriétés d'anti-oxydant (Sarkhail et al., 2003) .Certains phenylpropanoïdes mielleux connus pour leur capacité à empoisonnées les cellules et Dèmeunier leur croissance et leur capacité de garder homéostasie et l'équilibre cellulaire , et leur effet immunosuppresseur et antimicrobien anti-inflammatoire (Liu et al., 2008) (Couldis et al., 2000) et anti-paludisme (Kirmizibekmez et al., 2004). De nombreux iridoïde ont des propriétés similaires sédatif nerveux et stimulant la sécrétion de la bile, ce qui rend plus facile pour l'élimination des déchets purgatif protéger le foie et les vaisseaux sanguins dilatés (Sarkhail et al., 2003) analgésique pour la douleur, anti-inflammatoire et antimicrobienne , et ses racines est utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter le froid et le gonflement et le saignement de nez (Liu et al., 2007)

une étude expérimentale a montré les capacité d'extrait méthanolique d'une plante appartenne au genre *phlomis* a réduire le taux de glycémie chez les rats diabétiques (Sarkhail, et al., 2007), ainsi que la capacité de leur extrait méthanolique à augmenter l'activité des enzymes hépatiques anti-oxydant comme SOD, CAT, GPx lorsqu'il est administré a différentes doses chez des d'animaux (rats) (Sarkhail et al., 2007) et ainsi que les caractéristiques Anti-oxydant comme piègeur des radicaux libre (Sarkhail et al., 2003) (Kyriakopoulo et al., 2001).

Partie II:
Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1- Matériel :

I-1- Matériel végétal :

L'espèce sélectionnée «*Phlomis .samia* » a été collectée dans son habit naturel dans la chaîne montagneuse de Sigouss le 19 Mars 2010 , au wilaya de Oum el bouaghi , la plante a été identifiée par Mm Khalfallah. N professeur botaniste au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale à l'université Mentouri Constantine. La partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de la plante récoltée a ensuite été séchée à l'abri de la lumière du soleil pendant six semaines puis broyée en poudre pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

I-2- Les animaux :

Cette étude a été réalisée sur des rats males adultes de souche *Wistar albinos* provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgés de 2.5 à 3 mois et dont le poids varie entre 125 et 170 g . Ces animaux ont été soumis à une période d'adaptation aux conditions de l'animalerie d'université les frères mentouri constantine , un mois d'environ à une température de 21 ± 1 °C, une hygrométrie de 55 ± 5 % et une photopériode de 12 h/12 h. Les rats sont logés dans des cages métalliques avec accès libre de nourriture et d'eau et à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité. Des souris males albinos provenant de l'institut de pharmacie à l'université les frères Mentouri constantine 3 , il sont utilisées pour des tests d'évaluation de la toxicité d'extrait .

II- Méthodes de travail :

II-1- Préparation et étude du matériel végétal:

II-1-1- Préparation de l'extrait méthanolique de «*Phlomis samia* bovie de Noé»:

L'extrait méthanolique de «*Phlomis samia* » (PHSME) est préparé par macération de 1200 g de la poudre à température ambiante dans du méthanol 95° à raison de 25% (P/V) pendant 15 jours avec agitation de temps en temps. Après filtration sur de la mousseline et du coton, le filtrat est évaporé à 45°C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporateur E100). Cette opération est répétée trois fois puis le résidu final obtenu des trois macérations de la même poudre (Le filtrat) est ensuite mis dans des boites de pétries, congelé à -20°C puis lyophilisé a l'aide d'un lyophilisateur. A la fin l'extrait PHSME Et conservé à -20°C dans un flacon hermétiquement fermé après qu'il soit pesé pour calculer le rendement de l'extraction.

II-1-2- Etude phytochimique :

II-1-2-1- Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques sont réalisés soit avec la plante fraiche, soit avec une solution de l'PHSME dissoutet dans du méthanol

➤ **Mise en évidence des tanins :**

A 2 ml de la solution à tester, ajouter 2 à 3 gouttes de solution de FeCl₃ à 2%. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue-noire et un précipité (laisser reposer quelques minutes) (Karumi et al., 2004).

➤ **Mise en évidence des saponosides :**

Test 1 : 5 ml de la solution à tester sont bien 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 : Evaporer 10 ml d'extrait méthanolique. Traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre. Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydride acétique. Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer. L'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert confirme la présence des hétérosides stéroïdiques (Benmahdi., 2000).

Test 3 : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marron de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques (Edeaga et al., 2005).

Mise en évidence des flavonoïdes :

Traiter 5 ml de l'extrait avec quelques gouttes d'HCl concentré. Ajouter une quantité détournures de magnésium (laisser agir). La présence des flavones aglycone est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange (Karumi et al., 2004).

➤ ***Mise en évidence des composés réducteurs :***

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani. A 1 ml de l'extrait ajouter 5 ml d'acide acétique contenant des traces de FeCl₃ et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de FeCl₃. 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, 2005).

Parmi les composés réducteurs on note les ***coumarines***, la mise en évidence de ces dernières se fait selon la méthode décrite par (Benmehdi, 2000). 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 NH₄OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.

➤ ***Mise en évidence des alcaloïdes :***

Deux réactifs sont utilisés : réactif de Mayer et réactif de Wagner qui sont préparés comme suit :

Réactif de Mayer : 5g de KI et 1,358g de HgCl₂ solubilisés dans 100 ml d'eau distillée.

Réactif de Wagner : 2g de KI et 1,27g d'I₂ solubilisé dans 100 ml d'eau distillée. Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. Evaporer 25 ml de l'PHSME à sec, ajouter 5 ml d'HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange et réaliser les tests avec le réactif de Mayer et/ ou de Wagner. La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels (Benmahdi, 2000).

II-1-2-2-Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes :

➤ *Dosage des polyphénols totaux* ::

Le dosage des polyphénols totaux de l' PHSME a 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 ($K_3Fe[CN]_6$) par les polyphénols pour donner les ions ferreux (Fe^{2+}), ces derniers réagissent avec le chlorure de fer ($FeCl_3$) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de l'PHSME (dilués dans du méthanol) a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du $K_3Fe[CN]_6$ (0.016 M) puis 1ml du $FeCl_3$ (0.02M, dans le HCl 0.1N) 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 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 (figure 19) (0-200 $\mu g / ml$) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme du poids d'extrait (mg EAG / g E).

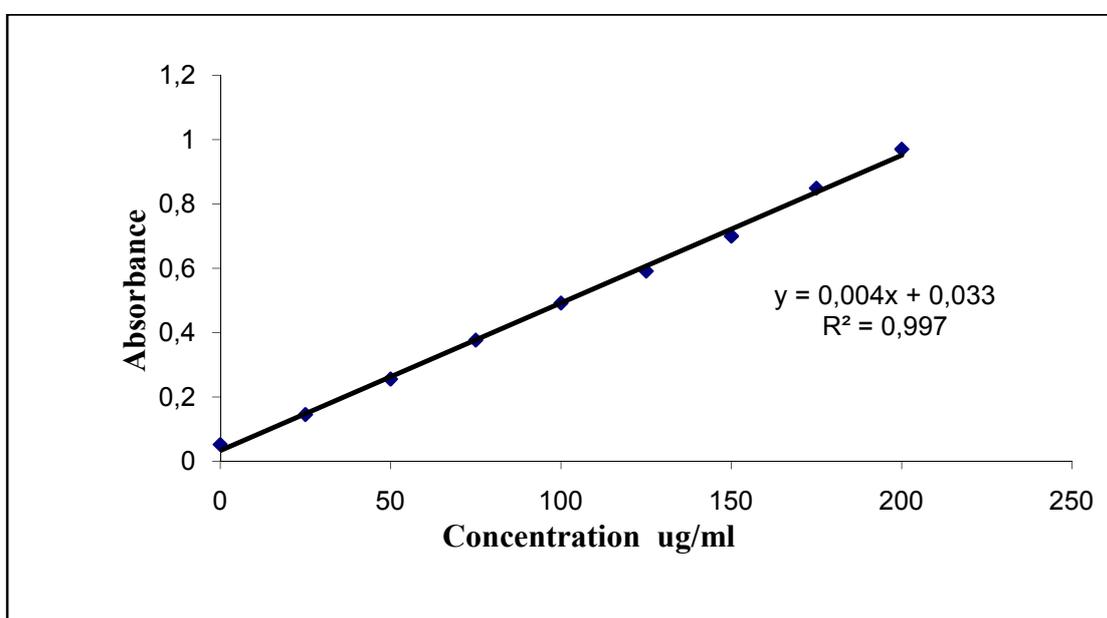


Figure 19: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point de la courbe représente la moyenne \pm SEM (n = 3).

➤ *Dosage des flavonoïdes*

Les flavonoïdes de l'PHSME ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium [Bahorun et al., 1996]; 1ml d'un échantillon de l'PHSME (préparés dans du méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1ml 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 chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec la quercétine et la rutine (figure 20). (0-40 µg/ml, chacune a été préparée dans le méthanol) et exprimée en milligrammes équivalents de quercétine ou de rutine par grammes du poids d'extrait (*mg EQ / g E*) et (*mg ER / g E*).

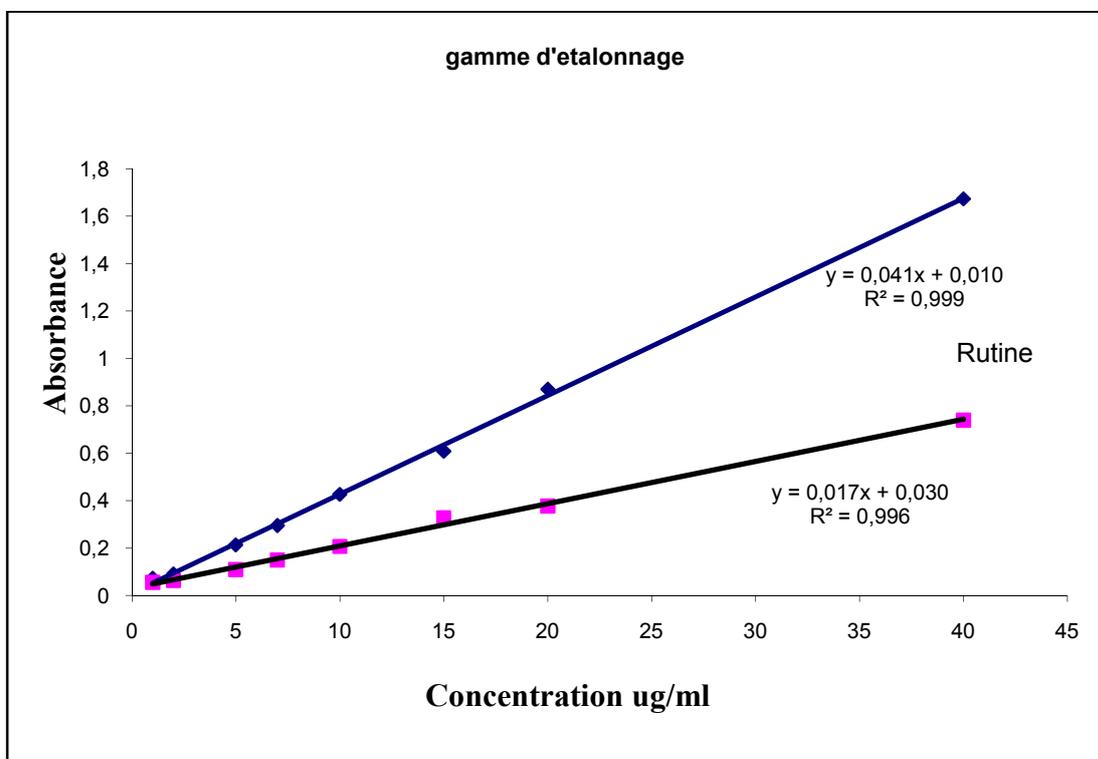


Figure 20 : Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine. Chaque point de la courbe représente la moyenne (n = 3).

II-1-2-3- Analyse par HPLC

L'analyse HPLC de l'extrait méthanolique de Ph.samia a été réalisée en utilisant le système Waters HPLC (Waters Corporation) équipé de la pompe HPLC Waters 515, de l'échantillonneur automatique Waters 717 plus et du détecteur UV Waters 2487. La séparation a été effectuée dans un symétrie C18 250_4.6 mm ID; 5 mm (Waters, USA) en maintenant le débit isocratique (1 ml / min) de la phase mobile (méthanol: eau: 70:30) et les pics ont été détectés à 280nm.

Les substances classiques, l'acide rosmarinique , catéchine , l'acide chlorogénique , la rutin , les fractions d'acide gallique ont été analysées dans les mêmes conditions. Les pics ont été attribués aux échantillons avec des substances standard et en comparant le temps de rétention et le spectre UV.

Le Tableau 3 concilie les différentes longueurs d'onde généralement utilisées dans le cas de l'étude des composés phénoliques (Merken & Beecher, 2000; Stecher et al., 2001; Robbins, 2003).

Tableau 3 : Longueurs d'onde utilisées dans l'étude des composés phénoliques

Classes de composés phénoliques	λ_{max} (nm)
Acide hydroxybenzoïque	280
Acide hydroxycinnamique	280, 320
Stilbène	280, 320
Flavanol	280
Dihydrochalcone	280
Flavonone	280
Flavone	280, 360
Isoflavone	280
Flavonol	280, 360
Isoflavone	280
Anthocyane	280, 520
Tanins	280

Tableau 4 : Étude comparative des temps de rétention entre l'extrait brut de *phlomis samia* et les mélanges qualitatifs

Composés phénoliques testés	Famille (poly)phénolique	Tr (min)	λ_{max} (nm)
Acide gallique	Acide hydroxybenzoïque	9,46	280
Catéchine	Flavanol	19,45	280
Acide chlorogénique	Acide hydroxycinnamique	19,71	280, 345
Acide vanillique	Acide hydroxybenzoïque	20,09	280
Acide caféique	Acide hydroxycinnamique	20,69	280, 345
Quercétinediglycoside	Flavonol	23,31	280, 345
Acide p-coumarique	Acide hydroxycinnamique	23,87	280, 345
Acide férulique	Acide hydroxycinnamique	25,18	280, 345
Rutine	Flavonol	25,44	280, 345
Quercétine 3- O-glucoside	Flavonol	26,1	280, 345
Naringine	Flavanone	27,85	280, 345
Quercétine-4'-glucoside	Flavonol	28,45	280, 345
Acide rosmarinique	Acide hydroxycinnamique	29,53	280, 345
Quercétine	Flavonol	33,07	280, 345
Apigénine	Flavone	36,17	280, 345
Kaempférol	Flavonol	36,82	280, 345

II-1-3- Etude pharmacologique:

II-1-3- 1- Etude de la toxicité (Test d'innocuité):

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il était nécessaire de réaliser des essais de toxicité. Pour cela, quatre doses de l'PHSME ont été testées sur des lots de huit souris albinos de même poids. Les doses de **700**, **1500**, **2500** et **5000mg/kg** sont administrées per os deux fois : le premier jour et le troisième jour du traitement. Les lots ont été mis en observation pendant une semaine en notant les différentes perturbations et les décès dès le premier jour du traitement. Les animaux sont maintenus à température ambiante à raison de huit souris par cage avec accès libre en eau et en nourriture.

II-1-3-3- Propriétés antioxydantes d'extrait de *Phlomis samia***Test de β -carotène / acide linoléique**

L'activité antioxydante de l'PHSME a été étudiée par le test au β -carotène / acide linoléique. Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diène conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique [Aslan et al., 2006].

Une solution de β -carotène / acide linoléique a été préparée comme suit: premièrement, 0.5 mg de β -carotène a été dissous dans 1 ml de chloroforme, ensuite 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40°C dans le rotavapor. 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène (100 ml / min / 30 min) ont été ajoutées au mélange avec agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquoté (2.5 ml) dans des tubes à essai, et 350 μ l de l'PHSME (2 mg / ml, dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été répétée avec le BHT (2 mg/ml) comme un contrôle positif et avec le méthanol comme contrôle négatif. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA %) a été calculé ainsi:

$$AA \% = (AE / AC) \times 100$$

AE : absorbance en présence de l'extrait

AC : absorbance en présence du contrôle positif BHT

Remarque: les valeurs de AA % prises pour la comparaison sont ceux calculées à 24 h.

II-1-3-3- Détermination de l'activité anti-radicalaire d' extrait de *Phlomis samia* par la méthode de DPPH (effet scavenger) :

L'activité anti-radicalaire de l'PHSME a été évaluée, *in vitro*, par le test de DPPH. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2'- diphényl-1-picrylhydrazine (Cuendet et al., 1997; Burits & Bucar., 2000). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm. Pour cela, 50 μ l de chacune des différentes concentrations de l'PHSME ont été incubés avec 5 ml d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 minutes, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées. Les résultats obtenus pour l'PHSME ont été exprimés par rapport à ceux obtenus pour le BHT pris comme antioxydant de référence.

Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par l'PHSME a été calculé comme suit:

$$I \% = [(A_c - A_E) / A_c] \times 100$$

A_c: absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

A_E: absorbance en présence de l'inhibiteur (échantillon)

La concentration inhibitrice de 50 % de l'activité du DPPH (IC₅₀) de l'EMZC a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'inhibiteur. Elle a été exprimée en µg / ml et comparée avec celle du BHT.

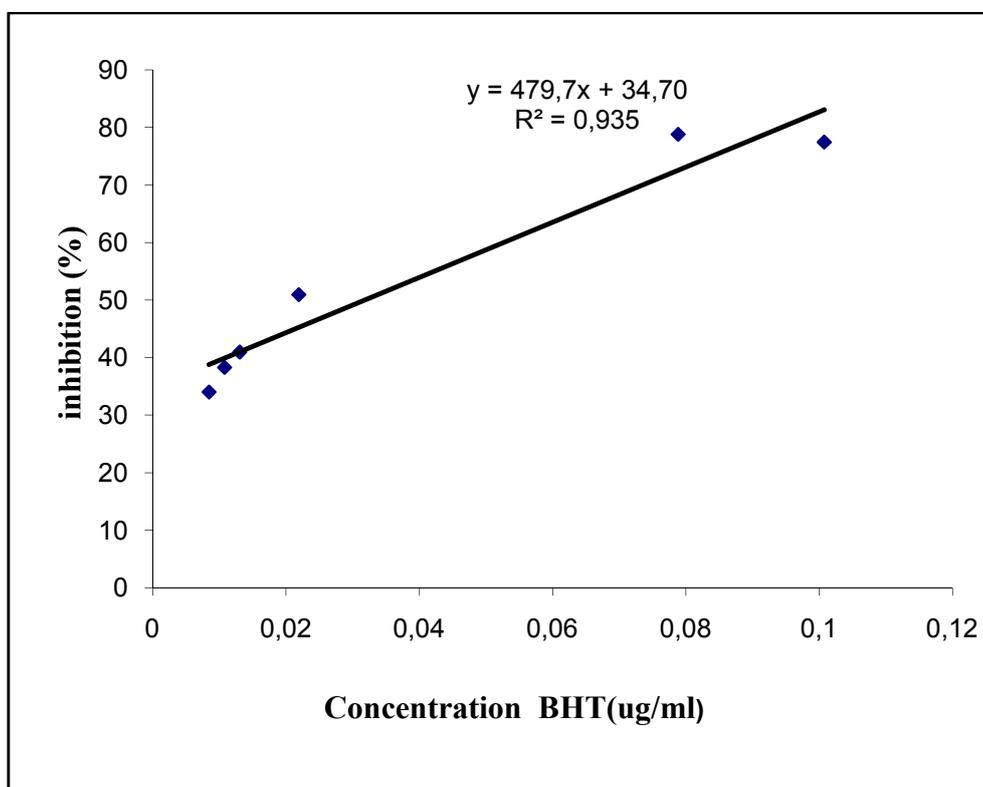


Figure 21 : pourcentage d'inhibition de BHT .

II -1-3-4-Peroxydation des lipides in vitro :

-**Test 1** : Inhibition de la peroxydation des lipides a été déterminé par dosage de l'acide thiobarbiturique-substances réactives (TBARS) en utilisant l'homogénat foie des rats comme une source riche en lipide avec quelques modifications. Brièvement, 1,0 ml d'échantillon d'*PHSME* a différentes concentrations (ont été mélangés avec 1,0 ml d'homogénat de foie; puis 0,2 ml FeSO₄ (9 mmol/L) et 2,5 ml de l'eau distillée, plus 0,1 ml de H₂O₂ (60 mmol/L). Ont été ajoutés pour initier la peroxydation lipidique. Et après incubation à 37 °C pendant 60 min, 1 ml de TCA (20%, p/v) et 1,0 ml d'une solution de TBA (0,7%, p/v) ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Le mélange résultant a été chauffé à 95 °C pendant 15 min, puis centrifugé à 5000 tours pendant 10 min. L'absorbance de la surnageant a été mesurée à 532 nm. L'eau distillée a été utilisée comme contrôle. L'effet d'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculé comme suit :

$$\text{Inhibition rate \%} = (\text{DO}_{\text{control}} - \text{DO}_{\text{sampl}} / \text{DO}_{\text{control}}) \times 100 \%$$

DO_{control} : est l'absorbance du controle (l'eau au lieu de l'echantillon).

DO_{essai} : est l'absorbance de l'echantillon.

-**Test 2** : Selon la méthode de (Wong et al., 1995) avec quelques modifications. Il a également été utilisé pour mesurer la capacité antioxydant potentielle de extrait Méthanolique *Phlomis samia* .L'homogénat de jaune d'œuf était utilisé comme source riche en lipide, le jaune d'œuf été composé à une concentration de 10% (p/v) dans le KCl(1,15%, p/v). puis l'extrait avec déférent [C] solubilise dans méthanol, on été ajouté dans un tube à essai qui est constitué de 1 ml de l'eau distillée, suivi par l'addition de 1,5 ml d'acide acétique à 20% (pH 3,5) et 1,5 ml de 0,8% (p/v) de 2-thiobabituric acide (TBA) à 1,1% (p/v) de dodecylsulfate de sodium(SDS). Ce mélange a été agité dans un vortex, et chauffé à 95°C pendant 1h. Après refroidissement à température ambiante, 5 ml de butanol a été ajouter à chaque tube. Après une agitation et centrifugation à 3000 tours pendant 10 min. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 532nm en utilisant un spectrophotomètre (Wong JW et al .,1995).

De l'eau distillée a été utilisée comme contrôle. L'effet d'inhibition sur la peroxydation, lipidique a été calculé comme suit :

$$\text{Antioxydant index\%} = [(A0 - A1) / A0] \times 100$$

A0 : valeur d'absorbance du contrôle totalement oxydé

A1 : valeur de l'absorbance de l'échantillon à tester (Bounatirou Set al.,2007)

II-1-3-5-Test du pouvoir réducteur (Reducing Power Assay)

Ce test est basé principalement sur la capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} , cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleue mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur (Le et al., 2007).

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode de Oyaizu (1986) ; avec quelques modifications dans une première étape, 2,5 ml d'une solution de phosphate buffer (0,2M- pH= 6,6) et 2,5 ml de 1% de potassium ferricyanide sont ajoutés à 2,5 ml des différentes concentrations des extraits. Après incubation de 20 minutes dans un bain marie à 50°C; on a ajouté 2,5 ml d'une solution aqueuse de TCA à 10% au milieu réactionnel. Après agitation et centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min, on a ajouté 1,25 ml de l'eau et 250µl de 0,1% $FeCl_3$ à 1,25 ml du surnagent.

Vit C a été utilisé comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en concentration IC50 qui se traduit par la concentration d'antioxydant utilisé pour obtenir une absorbance de 0,5. L'absorbance est déterminée à 700 nm. les résultats sont comparé avec l'acide ascorbique (Liu et al., 2013).

II-1-3-6-Piégeage du radical hydroxyle :

La méthode de Piégeage du radical hydroxyle adoptée dans cette étude est celle de Zhong et al. (2010) ; avec peu modification. Le mélange réactionnel contient les réactifs suivants : 1 ml de (9 mM $FeSO_4$) et 1 ml de 0.3% H_2O_2 , 0.5ml de 9mM acide salicylique acide-éthanol solution, 1 ml de l'extrait a différentes concentrations. Après incubation de 60 min à 37 C° la lecture est effectuée à une longueur d'onde de 510 nm. L'effet scavenger du radical hydroxyle est calculé selon l'équation suivants :

Pourcentage d'inhibition OH^{\cdot} = $(Abs_{control} - Abs_{extrait}) / Abs_{control} \times 100$.

La concentration inhibitrice d' OH^{\cdot} d'extrait a été par la suite calculée a partir de

L'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de

L'inhibiteur. Elle a été exprimée en mg/ml et comparée avec celle de l'acide ascorbique (Siddhuraju et Becker., 2007)

II-2 Activités anti tumorales d'extrait PHSME sur des lignes cellulaire d' HepG2 , et MDA-MB-468 (in vitro)

Tableau 5 : Lignes cellulaires et médias utilisés pour leur croissance.

Ligne cellulaires	Source	media de Culture
HepG2 cells	ATCC (American Type Culture Collection)	DMEM supplémenté avec 10% FBS, 100units/ml de pénicilline, 100 ug/ml de streptomycine , 1 mM sodium pyruvate, 2mM glutamine
MDA-MB-468 Human Breast Carcinoma	ATCC (American Type Culture Collection)	RPMI 1640 medium avec L-glutamine, vitamines, non-essential acides aminées, sodium pyruvate, 10% fatal sérum bovine

L'effet inhibiteur de l'extrait PHSME sur la croissance des lignes cellulaire d' HepG2 , et des cellules MDA-MB-468 Human Breast Carcinoma ,ont été évalués in vitro par MTT assai) (Sakagami et al.,2000 ; Mishra et al.,2008) .

Le test MTT est une **méthode colorimétrique permettant d'évaluer la viabilité des cellules au sein d'un échantillon**. Par extension il permet de déterminer la mortalité cellulaire induite par un composé. Le principe du test repose sur l'utilisation d'un sel de térazolium qui est réduit en formazan par des enzymes mitochondriales succinate dehydrogénase intracellulaires des cellules vivantes . La quantité de formazan produite est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules. Ce composé insoluble de couleur violette devra être solubilisé par du DMSO ou de l'isopropanol pour permettre son dosage spectrophotométrique à 570 nm

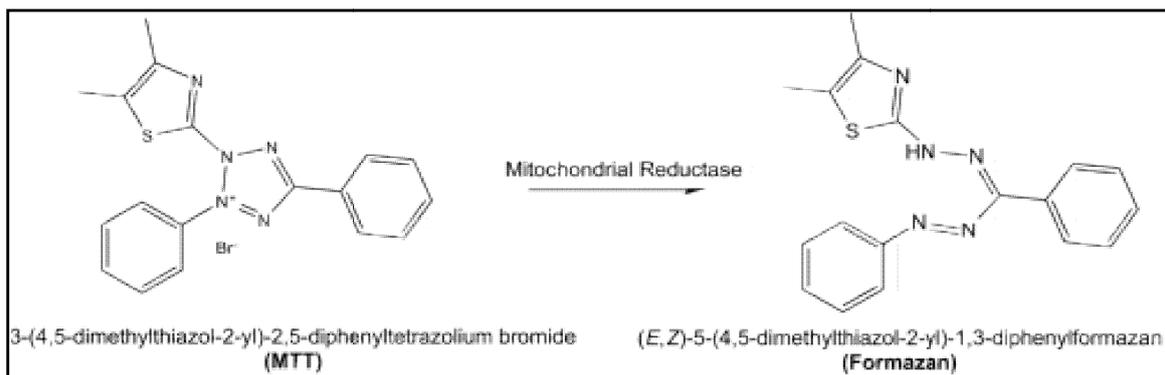


Figure 22 : Principe du test MTT.

Les cellules dans leur phase de croissance exponentielle ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à fond plat à une densité de 1×10^5 cellules par puits et incubées pendant 24 h à 37°C dans un incubateur à CO_2 , puis lavées avec 0,10 ml de PBS. Après les quartiers, on a ajouté 200 uL de différentes concentrations de PHSME (4,5, 9, 18, 22,5, 45 mg / mL), préparées en milieu de culture dans chaque puits. (Mishra et al., 2008 ; Jelnar Al-kaldah et al., 2010), Après 48,72 h d'exposition, le milieu contenant de la méthanoïne a été éliminé, lavé avec 0,10 ml de PBS et remplacé par du milieu frais. Les cellules de chaque puits ont ensuite été incubées dans du milieu de culture avec 0,02 ml de solution à 5 mg / ml de MTT pendant 4 h. Une fois qu'ils ont été retirés, on a ajouté 0,15 ml de DMSO dans un puits pour solubiliser les cristaux de formazan violets insolubles dans l'eau. L'absorbance a été lue à 570 nm en utilisant microplaque (Tian Z et al., 2006). Le rapport d'inhibition des cellules traitées a été calculé a la base de la formule suivante

Pourcentage d'inhibition (%) = $(1 - A_{570} \text{ des cellules traitées} / A_{570} \text{ des cellules témoins}) \times 100\%$ (Mishra et al., 2008).

II-3 - Détermination d'apoptose

l'annexine V permet de détecter les cellules en premières et mi-phases d'apoptose. En effet, l'un des premiers évènements de l'entrée en apoptose d'une cellule est l'exposition de la PS (phosphatidyl sérine) au milieu extracellulaire. Dans des conditions normales, ce phospholipide présent dans la membrane plasmique n'est exposé qu'au milieu intracellulaire, mais il se retrouve exposé à l'extérieur durant l'apoptose.

Ce test est complété par l'addition d'un agent intercalant (généralement l'iodure de propidium) qui ne pénètre dans les cellules que lorsque la membrane plasmique est altérée, c'est-à-dire en phase tardive d'apoptose, ou lors de la nécrose.

Les cellules d'HepG2 et d'MDA ont été incubées avec une dose de 45 mg/ml de PHSME pendant 48 h. Après incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid, puis remises en suspension dans du PBS à une concentration de $1 \text{ à } 10^6$ cellules /ml. Cinq microlitres d'AnnexinV-FITC et PI ont été ajoutés aux cellules. Après un vortex doux, les cellules ont été incubées pendant 15 min dans une chambre noire. ensuite Cinq microlitres de PBS ont été ajoutés à chaque tube puis analysés (10 000 événements) par cytométrie en flux dans 1h (Tian et al., 2006).

On peut dès lors distinguer les cellules en nécrose de celles en apoptose selon les critères suivants :

- AnV- / PI- → cellule vivante ;
- AnV- / PI+ → débris nucléaires ;
- AnV+ / PI- → phase précoce d'apoptose ;
- AnV+ / PI+ → phase tardive d'apoptose et ou nécrose.

II-4- Investigation du cycle cellulaire

Les cellules (1×10^5) ont été incubées dans un milieu RPMI additionné avec 10% de FCS avec ou sans PHSME 45 mg/ml pendant 48 heures après incubation subséquente, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et centrifugées à 1200 tour/min pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et 500 ul d'éthanol à 70% ont été ajoutés aux cellules et incubés pendant 2 h. Après incubation. Les cellules ont été centrifugées à 1200 tr / min pendant 10 minutes et lavées deux fois avec du PBS. Le surnageant a été éliminé et 500 ul de PBS avec 2 ul de RNaseA ont été ajoutés au calibre aux cellules et incubés pendant 30 min. Les cellules ont été lavées avec du PBS par centrifugation à 1200 tr / min pendant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et les cellules ont été mises en suspension dans 500 ul de PBS avec 15 ul d'iodure de propidium (1 mg / ml). Les cellules (10 000 événements) ont été acquises en utilisant un cytomètre de flux (BD, calibre FAC) (Tian et al., 2006 ; Mishra et al., 2008) .

II-5- Investigations expérimentales sur les animaux:**II-5-1- Le médicament anticancéreux :****la doxorubicine**

Le médicament anticancéreux que nous avons utilisé pour provoquer le stress oxydant et la cardiotoxicité , y associée, chez les rats et le Doxorubicine 15 mg/kg ; nous a été fourni Gracieusement par le service de cancérologie de Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine (CHUC).

II-5-2- Protocole du traitement des rats:

On a divisé les rats en 4 groupes de 7 rats chacun et qui sont tous gardés dans les mêmes conditions. Pour le début du traitement soit par, l'extrait Méthanolique de *Phlomis samia* à 200 mg/kg pendant 15 jours , le DOX (15mg/kg). Et les restes sont des témoins qui reçoivent l'eau distillée durant 15 jours (durée de traitement)

II-5-3- Les groupes des animaux :

Groupe1 : control ou témoin {que reçoivent quotidiennement par gavage gastrique 10 ml/kg d'eau distillée pendant 15 jours}.

Groupe2 : traité par PHSME par gavage gastrique {ces rats recoivent chaqu'un une Concentration de [200mg/kg/jr] d'PHSME pendant 15 jours}

Groupe3 : traité par le Doxorubicine {ces rats reçoivent chaque jour par gavage gastrique 10 ml/kg d'eau distille et une injection intra-péritonéale avant les deux derniers jours 15mg/kg}.

Groupe4 : traité par extrait Méthanolique et injecter par le Doxorubicine {ces rats reçoivent chaque jour l'PHSME à une concentration de 200 mg/kg pendant 15 jour et avant les deux derniers jours ils son injectés par le Doxorubicine par la voie intra-péritonéale 15 mg/kg}

II-5-4- Prélèvement sanguin et mesure du poids :

Le sang est prélevé au niveau de l'œil par ponction dans le sinus retro-orbital et mis dans Des tubes contenant d'héparine pour prévenir la coagulation. Ces prélèvements sont effectues sur des rats a jeunes. Ces tubes héparinés et centrifugés à 6000 tours/minute pendant 15 minutes puis le sérum est récupéré et utilisé pour les dosages biochimiques de CPK, le LDH, les ASAT et le ALAT.

La mesure du poids est effectuée sur des rats à jeun, de façon régulière, chaque jour et juste avant les prélèvements sanguins.

II -5-5-Préparation de la fraction cytosolique de tissus 10% :

Au moment du sacrifice les organes de cœur sont récupérés, rincé par l'eau physiologique Salin 0.9% froide, puis 1g d'organe est additionne a 9 ml (1v/10v) de solution tampon phosphate 0.1M PH 7.4 contenant du KCl 1.15M pour les homogénéisé par un homogénéisateur. 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 (dosages du taux de molonyl di aldehyde (MDA), la concentration de glutathion réduit (GSH), l'enzyme de GST, et d'enzyme de la catalase (CAT).

➤ □ Préparation des échantillons des coupes histologiques :

Pour l'étude histologique, des échantillons du cœur, de tous les lots sont prélevés. Les organes doivent être rapidement prélevés pour éviter son autolyse qui s'effectue après quelques instants de la mort de l'animal. Après le rinçage des échantillons avec l'eau physiologique froide, ils sont immédiatement fixés dans une solution de formol 10%.

II-5-6-L'analyse histologique:

Les coupes histologiques ont été réalisées à l'hôpital Universitaire Ben Badis de Constantine (CHUC), Service d'Anatomie Pathologique, suivant la technique décrite par (Holt, 1984).

Les techniques histologiques passent par plusieurs opérations qui s'enchaînent. La méthode qu'on a utilisée, avec inclusion à la paraffine comporte sept étapes principales :

-Prélèvement des pièces dont les conditions sont déjà mentionnées.

-La fixation ; Elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après la décapitation des rats et prélèvement des organes. Des fragments de Cœur (surface 1 à 2 cm² et épaisseur 2 mm) ont été alors mis dans le formol à 10 % qui se polymérise avec les polypeptides entraînant leur insolubilité sans l'abîmer. Après 48 heures de fixation les pièces d'organes sont retirées puis rincées à l'eau distillée.

Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent.

-Lavage, déshydratation et éclaircissement : Comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70 %, 95 % et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.

-L'inclusion : Les pièces sont incluses dans un bain de paraffine fondue pendant deux heures.

La paraffine va peu à peu pénétrer les tissus en remplaçant le solvant

Cette opération fait appel à des appareils «dits à inclusion» refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour obtenir la solidification rapide du bloc de paraffine contenant le tissu. La réalisation des coupes minces de quelques microns (5 μm en moyenne) est possible grâce à des appareils spéciaux appelés «Microtomes». Ces coupes sont étalées sur des lames porte-objet, dépliées et fixées sur la lame par l'utilisation d'une eau gélatineuse chauffée.

-Construction des blocs : Après la saturation des pièces par la paraffine fondue, on passe à l'inclusion définitive dans de petits moules à fond plat qui servent à donner la forme du bloc.

Ce dernier peut se conserver pendant des années sans dommage.

-Préparation des coupes, étalement sur lame: Le bloc de paraffine est collé au porte-objet puis débité en tranches minces de 4 à 5 μm . grâce à un microtome. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte objet, puis dépliés et fixés par une eau gélatineuse(liquide d'étalement). chauffée à 40 °C. Les lames sont ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

-La coloration : Les coupes sont colorées par la méthode d'éosine & ématoxiline. qui nécessite la présence de l'alcool acide (100 mL d'alcool éthylique à 70 % + 50 ml d'acide HCl), eau ammoniacale (100 mL d'eau distillée + 2 mL Ammoniaque) et solution d'Eosine (100 mL Eosine solution aqueuse à 3 %, 125 mL alcool éthylique à 95 %, 375 mL d'eau distillée et 2 gouttes d'acide acétique). La coloration suit les étapes suivantes :

- Déparaffiner et hydrater les lames à l'eau du robinet puis rincer à l'eau distillée.
- Immerger dans un bain d'Hématoxyline de Harris (15 minutes) qui colore en bleu violacée les structures basophiles (noyaux).
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées) ; déposer ensuite les lames dans un bain d'eau du robinet et vérifier la différenciation au microscope.
- Bleuir dans un bain d'eau ammoniacale.
- Immerger dans un bain d'Eosine (15 secondes à 2 minutes) qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasme). Tous ces bains sont séparés par des lavages à l'eau du robinet.

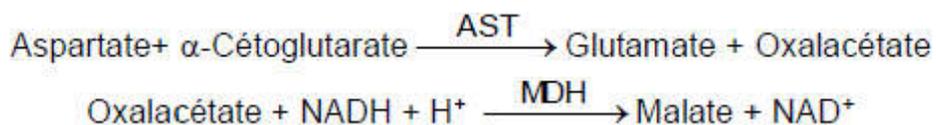
Les préparations ont ensuite été séchées puis observées au microscope optique à différents grossissements qui été connecté avec l'ordinateur pour les photographiées à l'aide d'un appareil photo par un logicielle Leica Lasez.

II-5-7-L'analyse des paramètres biochimiques :**II-5-7-1- Analyse des paramètres sériques :**

L'analyse des paramètres sériques est effectuée suivant des méthodes enzymatiques et/ou colorimétriques par un auto-analyseur de type (Technicon RA, Opera systems N° de ref. T01-2801-56

II.5-7-1 a Les Aminotransférases**L'aspartate amino transférase (AST) / TGO**

L'aspartate amino transférase (AST), initialement appelée transaminase glutamate oxaloacétique (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminique de l'aspartate vers l'alpha-cétoglutarate pour la formation de glutamate et d'oxalacétate. L'oxalacétate produit est réduit en malate en présence de déshydrogénase (MDH) et NADH :



La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photo numériquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'AST dans l'échantillon (Murray et al., 1984).

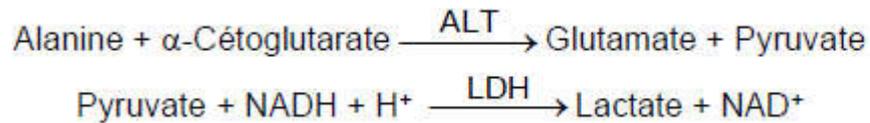
L'AST est une enzyme intracellulaire, qui se trouve en grandes quantités dans les muscles du cœur, les cellules du foie, les cellules du muscle squelettique et en plus faibles quantités dans les autres tissus (Burtis A et al., 1999).

Bien qu'un niveau élevé d'AST dans le sérum ne soit pas caractéristique d'une maladie hépatique, elle s'emploie principalement pour les diagnostics et le suivi, avec d'autres enzymes telles que l'ALT. Elle s'utilise également dans le cadre du contrôle post-infarctus, chez les patients souffrant de troubles musculaires du squelette et dans certains autres cas (Tietz et al., 1995).

L'alanine aminotransférase (ALT) / TGP :

L'alanine aminotransférase (ALT) initialement appelée transaminase glutamique pyruvique (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminique d'alanine vers

l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et de pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogénase (LDH) et NADH :



La vitesse de réduction de la concentration en NADH au centre, déterminée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ALT dans l'échantillon (Murray et al., 1984).

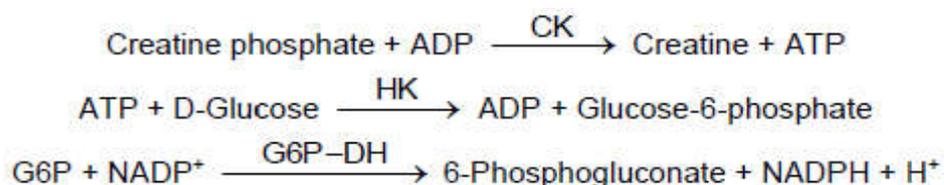
L'ALT est une enzyme intracellulaire, qui se trouve principalement dans les cellules du foie et des reins. Son meilleur avantage est le diagnostic de maladies du foie (Burtis et al., 1999).

On l'observe en grandes quantités dans le cadre de maladies hépatiques, telles que l'hépatite, les maladies du muscles et des infarctus du cœur, étant donné que la valeur de l'ALT reste dans les limites standards et augmente dans les niveaux de AST (Tietz et al., 1995).

II.5-7-1-b La créatine kinase(CK) ou créatine phosphokinase (CPK)

La créatine kinase(CK) ou créatine phosphokinase (CPK) est une enzyme cellulaire avec une large distribution tissulaire dans le corps (Abbot et al., 1984). Leur rôle physiologique est associé à la génération d'adénosine triphosphate (ATP) pour Contractile ou de transport (Burtis et al., 1999).

La créatine kinase (CK) catalyse le transfert réversible d'un groupe phosphate de Phosphocréatine à l'ADP selon la réaction (Abbot et al., 1984) :



(Gerhardt et al., 1979).

L'activité catalytique de la CK est déterminée en mesurant la vitesse d'apparition du NADPH+H⁺ à 340 nm.

Il existe plusieurs isoenzymes de la CK. Principalement trois fractions sont connues :

- CK-MM qui se trouve en majorité dans le tissu musculaire.
- CK-MB qui se trouve en majorité dans les cellules myocardiques.
- CK-BB qui se trouve en majorité dans le cerveau.

Des valeurs élevées de CK sont observées dans les maladies du muscle squelettique et après Infarctus du myocarde (Tietz et al.,1995).

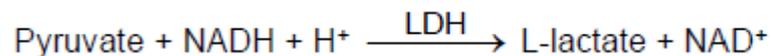
La CK-MB (ou CPK-MB) est libérée en cas d'infarctus du myocarde, le taux de CPK-MB s'élève à partir de la troisième ou quatrième heure après le début de l'infarctus et se normalise en deux à trois jours (Morrow et al., 2007).

II-5-7-1 c LDH :

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme présente dans tout l'organisme humain. Les plus grandes concentrations de LDH se trouvent dans le foie, le cœur, les reins, le muscle squelettique et les érythrocytes (Pesce et al., 1984).

Le niveau de LDH dans le sérum est élevé chez les patients avec des maladies du foie, des infarctus du myocarde, des troubles rénaux, des dystrophies musculaires et des anémies (Young et al., 2001).

Le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, selon la réaction suivante :



La vitesse de diminution de la teneur en NADH dans le milieu déterminé par photométrie est proportionnelle à la concentration catalytique de LDH dans l'échantillon testé (Pesce et al.,1984).

II-5-8 Analyse des paramètres tissulaires :

II-5-8-1-Dosage des substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS) dans une fraction cytosolique 10% de cœur :

La quantité des TBARS est exprimée en terme d'un équivalent biochimique qui est le « Malonyl di aldéhyde MDA», un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) méditée par les radicaux libres. La mesure du MDA à l'aide du TBA selon la méthode de (Okhawa et al., 1979) permet la quantification de la peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant.

Principe: 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 thiobarbiturique d'un pigment coloré absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

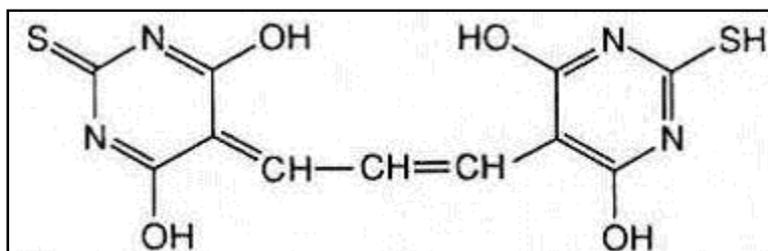


Figure 23 : Formation d'adduit MDA – TBA (1 :2)

Réactifs et solvants :

- a- L'acide thiobarbiturique TBA 0.67 %.
- b- L'acide trichloroacétique TCA 20%.
- c- Le n-butanol.

Procédure : La quantité de l'MDA est évaluée au niveau du coeur selon la méthode de [Okhawa et al., 1979]. A 0.5 ml de l'homogénat, nous avons ajouté 0.5ml de TCA 20% et 1ml de TBA 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, 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. Le MDA est exprimé en nmol/g de tissu de l'organe étudié et calculé à partir d'une gamme préparée sous les mêmes conditions avec une solution de « 1,1,3,3-tetraetoxypropane » qui donne le MDA après son hydrolyse.

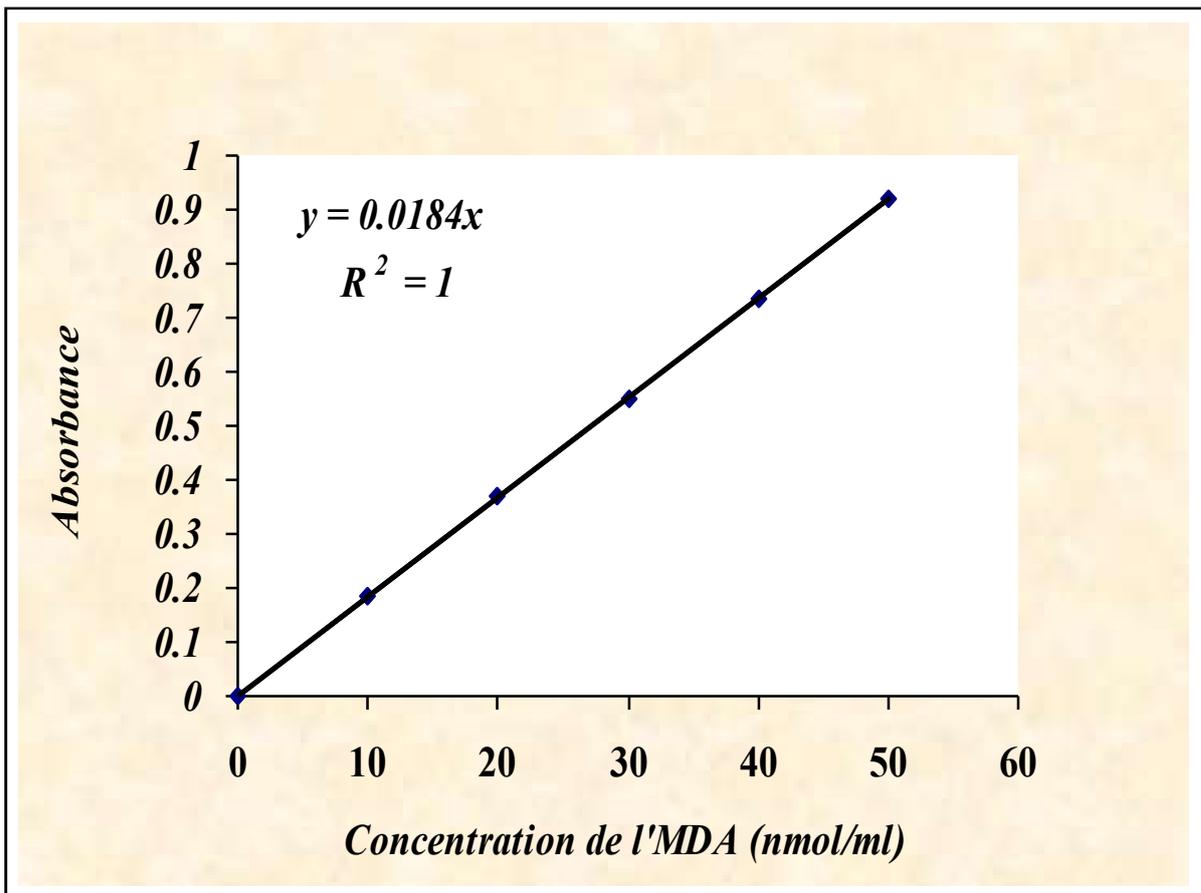


Figure 24 : courbe d'étalonnage d'MDA .

II-5-8-2 Dosage du glutathion tissulaire :

Le dosage de glutathion réduit est effectué selon la méthode de [Ellman, 1959] au niveau du coeur.

Principe :

La méthode du dosage du glutathion est basée sur l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-5- mercaptobenzoïque ; ce dernier est caractérisé par une coloration jaune intense, ce qui permet sa quantification spectrophotométrique à 412 nm.

Réactifs et solvants :

- L'acide trichloracétique 10%.
- Tampon phosphate de potassium pH8 (0.1M).
- Réactif d'Ellman ; 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) 0.396g/100ml de tampon.
- Glutathion réduit GSH .

Procédure :

Le dosage du glutathion réduit dans les tissus s'effectue selon les étapes suivantes :

a- 0.5 ml de TCA à 10% sont mélangés avec 0.5 ml d'échantillon. Le mélange est agité de temps en temps pendant 15 minutes.

b- Après 15 minutes, les tubes sont centrifugés 5 minutes à 2000 tpm.

c- D'autres tubes sont préparés pour le mélange réactionnel : 100 µl de réactif d'Ellman sont ajoutés à 1.7 ml de tampon, ensuite, 200 µl de surnageant sont additionnés et la lecture se fait après 5 minutes à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Les concentrations du glutathion réduit sont exprimées en µmol par gramme de tissu. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

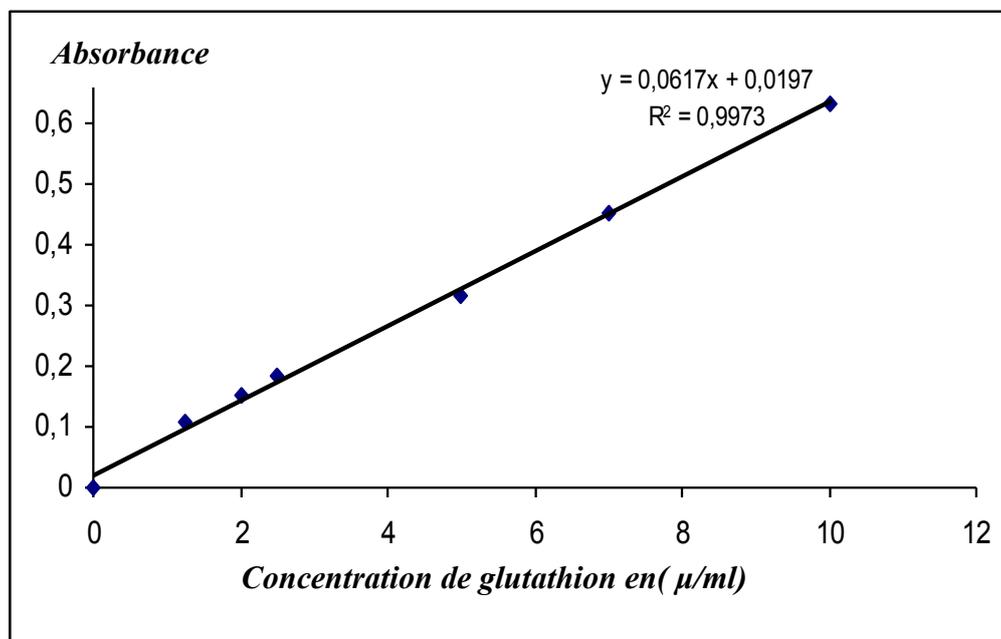


Figure 25 : Courbe d'étalonnage de Glutathion réduit GSH.

Méthode de calcul : La quantité de glutathion est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Glutathion } (\mu\text{mol/g}) = \text{DO test} \times 2 \times F \times [\text{standard}] (\mu\text{mol})$$

$$\text{DO standard} \times 0.2 \times n$$

Dont :

2 : Volume total du milieu réactionnel

F : Facteur de dilution de l'échantillon testé..

0.2: Volume utilisé de l'échantillon testé.

n : La quantité estimée en gramme de tissu dans le volume utilisé de l'échantillon testé

Concentration de glutathion en (µ/ml)

II-5-8-3 Dosage de l'activité enzymatique de la catalase :

L'activité enzymatique de catalase est déterminée dans le cœur selon la méthode de [Clairborne., 1985].

Principe: Le dosage de l'activité enzymatique du catalase est basé sur la diminution de l'absorbance à 240 nm qui est due à la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par la catalase.

Réactifs et solvants :

a- Tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M).

b- Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 19mmol/ml.

Procédure : Dans une cuvette en quartz de 3 ml, 50µl de l'homogénat sont mélangés avec 2.95 ml d'une solution de H₂O₂ à 19mmol/ml préparée dans le tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1M). Le changement de l'absorbance est suivi pendant deux minutes en prenant les valeurs à t₀ et après chaque minute. L'activité enzymatique du catalase est exprimée en constante de vitesse de la réaction d'ordre 0 par gramme de tissu.

Méthode de calcul : L'activité enzymatique du catalase est calculée selon la formule suivante :

K : Constante de vitesse de la réaction d'ordre 1.

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.

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

II-5-8-4 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).

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.

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 :

$$\text{Unités/ml enzyme} = (\text{A340/mn Test} - \text{A340/mn Blanc}) (3) / (9,6) * (0,1)$$

- 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.

III -L'étude statistique :

L'étude statistique est réalisée à l'aide du système INSTAT2 MS-DOS en utilisant le test de variance univarié (one-way ANOVA) suivie du test de Tukey.

Pour l'étude phytochimique, les résultats on été exprimés en moyenne ± SD (déviati on standard (n = 3). La comparaison est faite par rapport aux contrôles négatifs (en absence d'extrait) Pour l'étude expérimentale sur les animaux, les résultats sont exprimés en moyenne ± SD et en comparant les différents groupes où :

- a : Comparaison des différents lots avec le lot NC
- b : Comparaison des lots DT et DIS avec le lot DC.
- c : Comparaison du lot DT avec le lot DIS.

Ce test nous donne le degré de signification P où on dit que la différence :

- N'est pas significative si $p > 0.05$ (NS).
 - Est significative si $0.05 > p > 0.01$ (*).
 - Est hautement significative si $0.05 > p > 0.01$ (**).
 - Est très hautement significative si $p < 0.001$ (***)
- Bas du formulaire

Partie III : Résultats

Les résultats

I- Préparation et étude du matériel végétal:

I-1- Préparation de l'extrait méthanolique de «Phlomis samia »:

L'opération de l'extraction du matériel végétale à l'aide du méthanol a permis d'obtenir un résidu sec d'extrait brute de 127,8g avec un rendement de 12.78 %.

I-2- Etude phytochimique :

Les tests phytochimiques réalisés sur l'PHSME révèlent la présence de plusieurs familles de composés. Ces résultats montrent que la plante est très riche en Saponosides , des tanins, des flavonoïdes, des composés réducteurs (coumarines) et des alcaloïdes sels.

Tableau 6 : Résultats des tests phytochimiques de la mise en évidence des quelques composés.

Composées	Résultats des tests ((+) : Résultat positif)
Saponosides	Test de détection (+). Tests de caractérisation : · Présence des hétérosides stéroïdiques (+) · Présence des triterpènes hétérosidiques (+)
Tanins	Test de détection (+) : Apparition d'une coloration bleue noire et un précipité après 3 minutes
Flavonoïdes	Test (+) : Apparition d'une couleur rouge caractéristique des flavones aglycone
Composés réducteurs	(+) : Apparition de deux phases, une colorée en brun rouge et la deuxième phase en bleu-vert. Test caractéristique des coumarines (+).
Alcaloïdes sels	(+) : Résultat positif avec les deux réactifs (de Mayer et de Wagner)

I-2-2- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes :

Le dosage des polyphénols totaux effectué selon la méthode de bleu de Prusse modifiée par Graham (1992) montrent que la plante contient **73.14 ± 0.15 mgEAG/gE** (mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait), tandis que la détermination du taux des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium révèle la présence de **21.61 ± 0.17mgEQ/gE** (mg équivalent quercétine par gramme d'extrait) de flavonoïdes soit **46.97 ± 0.29 mgER/gE** (mg équivalent rutine par gramme d'extrait).

Tableau7 : Résultats du dosage des Polyphénols totaux et des flavonoïdes

polyphénols Totaux (TP)	flavonoïdes Totaux (TF)	
	mg équivalent quercétin / g poids sec	mg équivalent rutun / g poids sec
73.14 ± 0.15 mg GAE/g extract.	21.61 ± 0.17mg	46.97 ± 0.29 mg

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

L'analyse des données obtenues à l'aide de l'HPLC confirme la présence d'acide chlorogénique ;ferulic acid ;luteolin ;Apigenin et α caumaric acid . (Figure 26) dans l'extrait Méthanolique de *Phlomis .samia* utilisé dans cette étude.

Avec une valeur de 14mg/g de acide chlorogénique pour l'extrait méthanolique et 60mg/g pour le butanolique extrait .

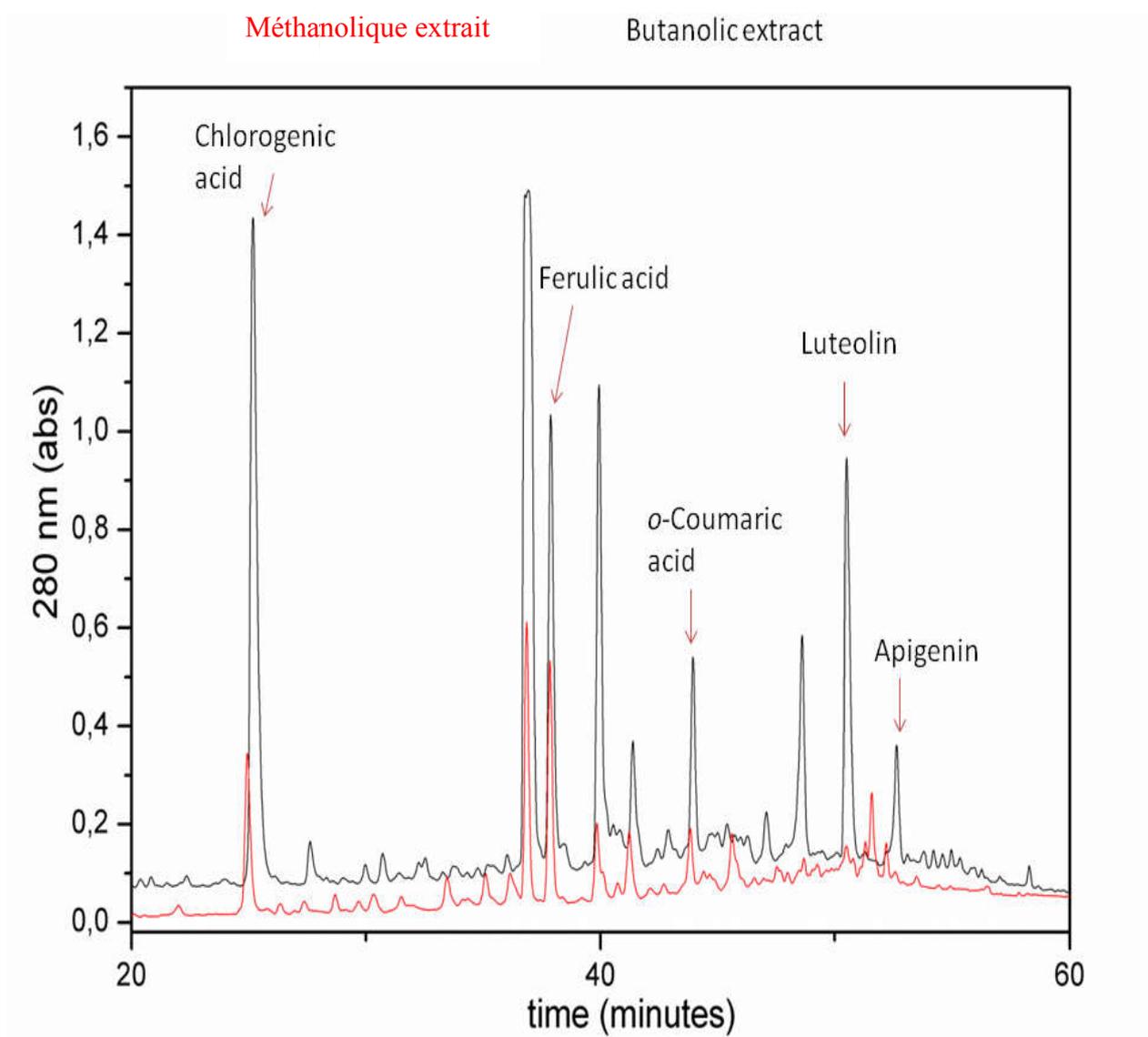


Figure 26. Chromatogramme d'un extrait Méthanolique de *Phlomis .samia* séparé par RP-HPLC. Colonne: symétrie C18, 5 mm Taille des particules, 4,6 à 250 mm; Phase mobile: méthanol: eau (70:30) en 60 min; Débit: 1,00 ml / min; Flux: isocratique; Détection 280 nm; Volume d'échantillon injecté 20 ml; Température: 33 C°. Les pics identifiés dans l'extrait brut étaient: chlorogénique acid ;ferulic acid ;luteolin ;Apigenin et α caumaric acid

I-3-Etude pharmacologique:

I-3- 1- Etude de la toxicité (Test d'innocuité) :

Selon les résultats obtenus du test d'innocuité, aucune changement ou perturbation n'a été observée et aucun cas de décès n'a été compté pour toutes les doses testées pendant une semaine d'observation ce qui prouve qu'il n'existe aucune toxicité remarquable jusqu'à la dose de 5000 mg/kg.

I-3-2- L'activité antioxydante :

1 . Détermination de l'activité anti-radicalaire d'extrait PHSME par la méthode de DPPH (effet scavenger)

L'activité Anti radicalaire des différentes concentrations d'extrait méthanolique a été déterminée par la méthode DPPH, la cinétique de la décoloration de ce radical a été suivie à 517 nm après addition de 50 µl de chacune des concentrations d'extraits PHSME, L'effet scavenger d'extrait sur le radical DPPH est très significatif ($p < 0.001$, comparant avec le contrôle) et d'une manière dose-dépendante, et ces résultats sont présentés dans la fig 53 et le tableau 10. se dernier montre une comparaison entre le pourcentage d'inhibition de radical DPPH d'extrait et la molécule BHT.

La **Fig 27** représente la concentration d'extrait et standard qui piègent 50 % du radical DPPH (IC50). C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé.

Les résultats montrent que l'extrait PHSME est un inhibiteur puissant avec un IC50% de 34µg/ml qui été 10 fois inférieur de la BHT.

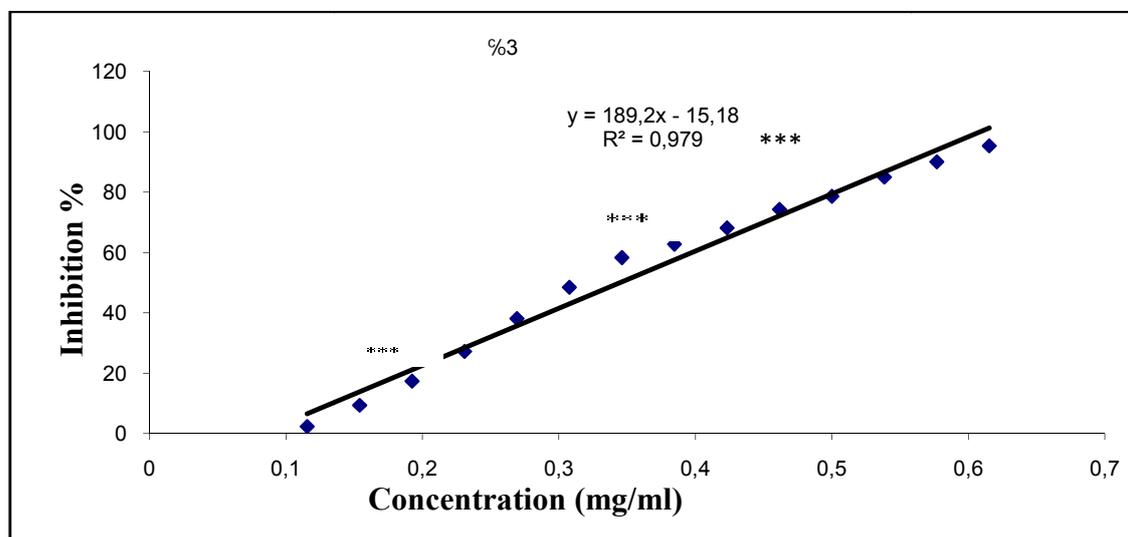


Figure 27: Effet scavenger d'extrait PHSME sur le radical DPPH. Chaque point représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). $*0.05 > p > 0.01$, $*** p < 0.001$, comparant avec le contrôle.

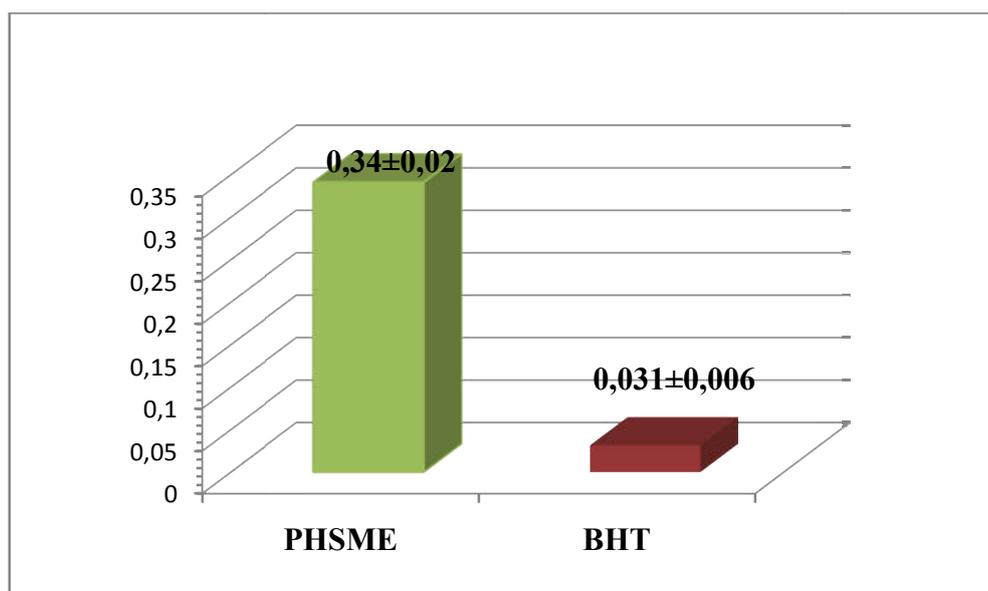


Figure 28: La concentration d'extrait PHSME et la molécule BHT qui inhibent 50% de DPPH (mg/ml).

Tableaux 8 : Pourcentage d'inhibition de DPPH par PHSME et le BHT .

Concentration de PHSME (mg/ml)	% inhibition de DPPH par PHSME	% inhibition de DPPH par BHT
0,069	93,65± 2,88	86,99 ±0,46
0,057	84,35±1,68	85,79±3,91
0,053	77,81 ±1,01	82,96±1,21
0,046	66,76±0,80	78,83±0,21
0,034	57,03±2,37	77,46±1,23
0,026	45,18±2,76	69,68±1,23
0,023	33,09±1,35	38,27±2,23
0,015	27,08±1,30	34,004±2,18
0,011	15,17±0,75	20,24±2,01
0,001	6,51±1,00	12,15±0,92

2. Test de β -carotène / acide linoléique

L'activité antioxydante des différentes concentrations d'extrait PHSME a été évaluée par spectrophotométrie suivant la décoloration du β -carotène à 490 nm.

Les résultats des pourcentages de l'activité antioxydante en fonction du temps sont représentés dans la **Figure 29**.

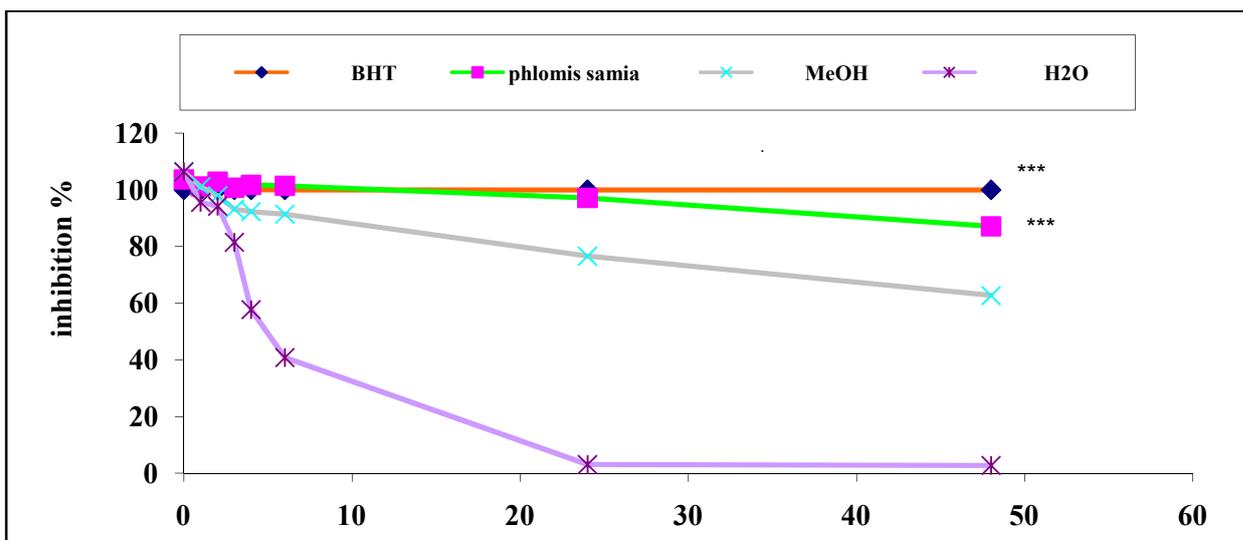


Figure 29 : Activité antioxydante d'extrait PHSME par rapport au BHT, MeOH et H2O par le test de β -carotène / acide linoléique. Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n = 3). $*0.05 > p > 0.01$, $*** p < 0.001$, comparant avec le contrôle.

L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique a été déterminé par le test de β -carotène / acide linoléique. Ce test mesure la capacité de l'extrait à inhiber la formation des radicaux libres hydroperoxydes diène conjugués pendant l'oxydation de l'acide linoléique (Tepe *et al.*, 2005). En absence des antioxydants, les radicaux libres formés provoquent l'oxydation du β -carotène et donc sa décoloration. Par contre, la présence des antioxydants dans l'extrait minimise l'oxydation du β -carotène qui conserve sa couleur (Tepe *et al.*, 2005).

Après 24 heures d'incubation, le pourcentage de l'activité antioxydante de l'PHSME était de 97.05 ± 0.94 %, résultat très hautement significatif ($p < 0.001$) comparant avec les contrôles négatifs, contre 99.97 ± 0.92 % pour le BHT utilisé comme molécule de référence présentant le contrôle positif (figure 30).

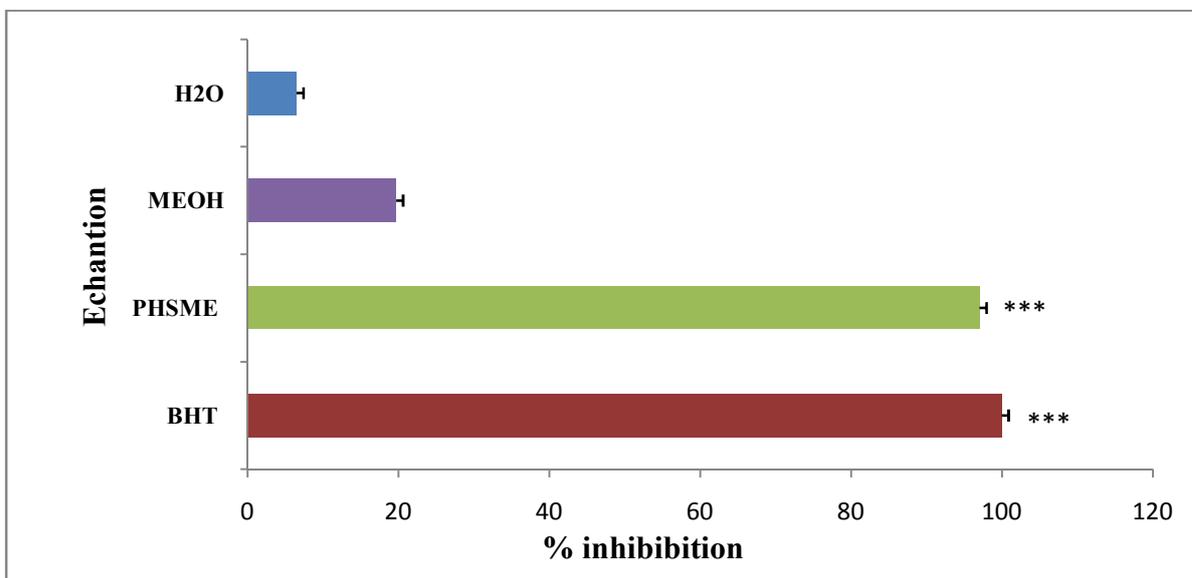


Figure 30 : Activité antioxydante des l'PHSME, du BHT, du MeOH et H2O (à 24 h), par le test de β -carotène / acide linoléique. *** $p < 0.001$ comparé avec le contrôle.

3 . Peroxydation des lipides in vitro :

1- L' inhibition de la lipides peroxydation de foie provoqué par FeSO_4 et H_2O_2 :

L'effet d'inhibiteur de la peroxydation des lipidique a été déterminé par le dosage de l'acide Thio barbiturique-substances réactives (TBARS) en utilisant l'homogénat du foie des rats comme source riche en lipides.

L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique de PHSME a été augmenté avec l'augmentation des concentrations d'échantillon par un pourcentage d'inhibition de $20,24 \pm 0,02\%$ à la concentration de 100 mg/ml et un pourcentage de $70,02 \pm 0,03\%$ à 200 mg/ml , comme le montre la Fig.31.

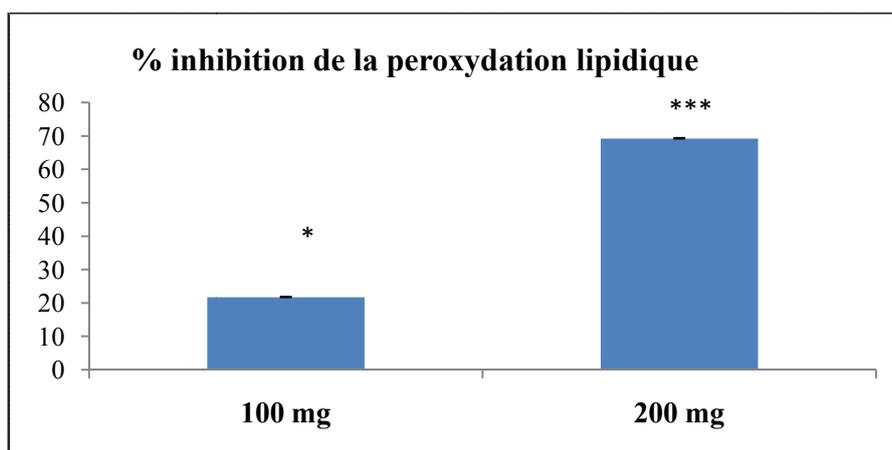


Figure 31: Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique de foie par deux concentration d'PHSME. Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n = 3).

0.05 > p > 0.01, * p < 0.001, comparant avec le contrôle.*

Test 2 : L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique a été déterminé par le dosage de l'acide Thio barbiturique-substances réactives (TBARS) en utilisant Le jaune d'œuf comme source riche en lipides. La Substance réactive de l'acide thiobarbiturique (TBARS) et mesurée par spectrophotométrie à 532 nm, la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec le malonaldéhyde (MDA) donne une couleur rose, ce dernier (MDA) est l'un des produits secondaires de la peroxydation lipidique.

D'après les résultats présentés dans la (**figure 32**) les concentrations 100mg/ml et 200mg/ml d'extrait PHSME possèdent un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique, avec les valeurs suivantes $54,54 \pm 0,01$ % ; $65,86 \pm 0,02$ % respectivement.

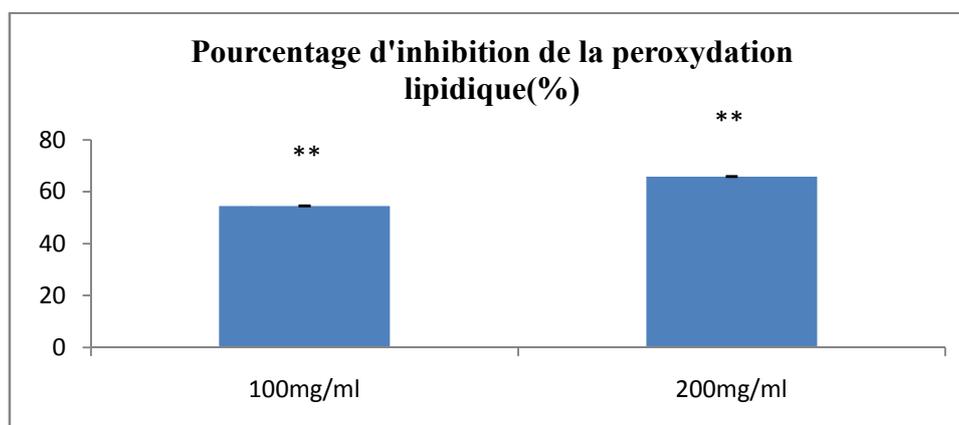


Figure 32 : le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'extrait PHSME.

Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n = 3). **0.05 > p > 0.01, *** p < 0.001, comparant avec le contrôle.*

4. Test du pouvoir réducteur (*Reducing Power Assay*) :

La capacité de l'extrait à donner un électron tout en convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} , cette réaction se manifeste par l'apparition de la couleur bleue mesurable à 700 nm. Donc une absorbance élevée indique que l'extrait possède un grand pouvoir réducteur

La figure 33 montre les capacités réductrices de PHSME et de vitamine c (Vit c). Le pouvoir réducteur de l'extrait a augmenté avec l'augmentation de la concentration de manière dépendante et il a été montré une puissance réductrice approchant à ceux de Vit c. Le pouvoir réducteur de PHSME et Vit c est dose dépendante.

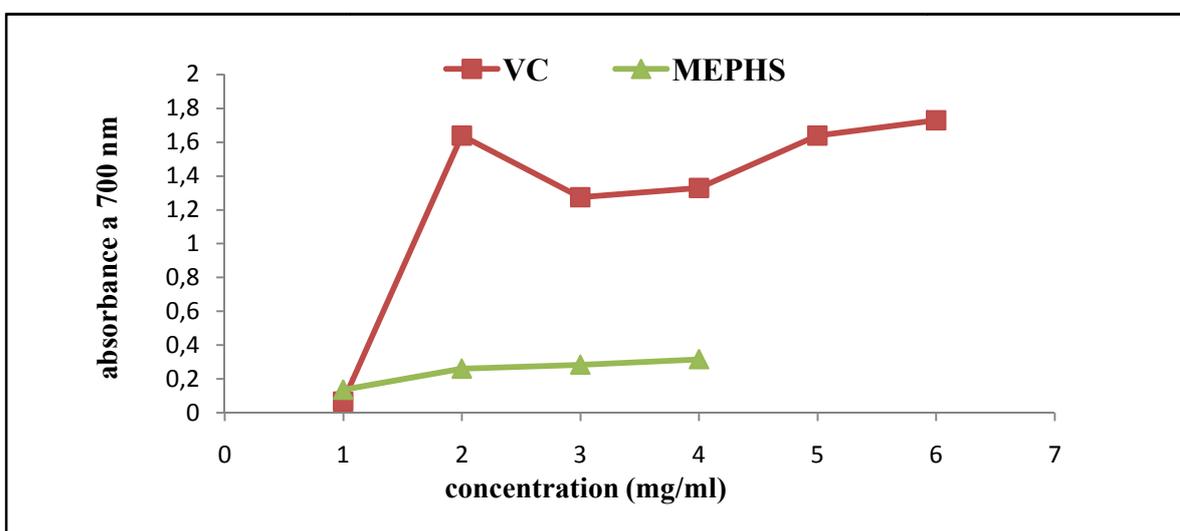


Figure 33 : Le pouvoir réducteur des concentrations d'extrait PHSME comparé avec l'acide ascorbique (Vit C)

5. Piégeage du radical hydroxyle :

La figure 34 montre le pouvoir de piégeage de radical hydroxyle par l'extrait PHSME à différentes concentrations et de la vitamine C (Vit c). Le pouvoir réducteur de l'extrait a augmenté avec l'augmentation de la concentration de manière dépendante et il a été montré une puissance réductrice approchant à ceux de Vc. Le pouvoir réducteur de PHSME et Vc est dose dépendante. à la concentration , le pouvoir réducteur d'extrait donne une activité meilleure que la vitamine cette valeur significative ($p < 0.01$, comparant avec le vit c).

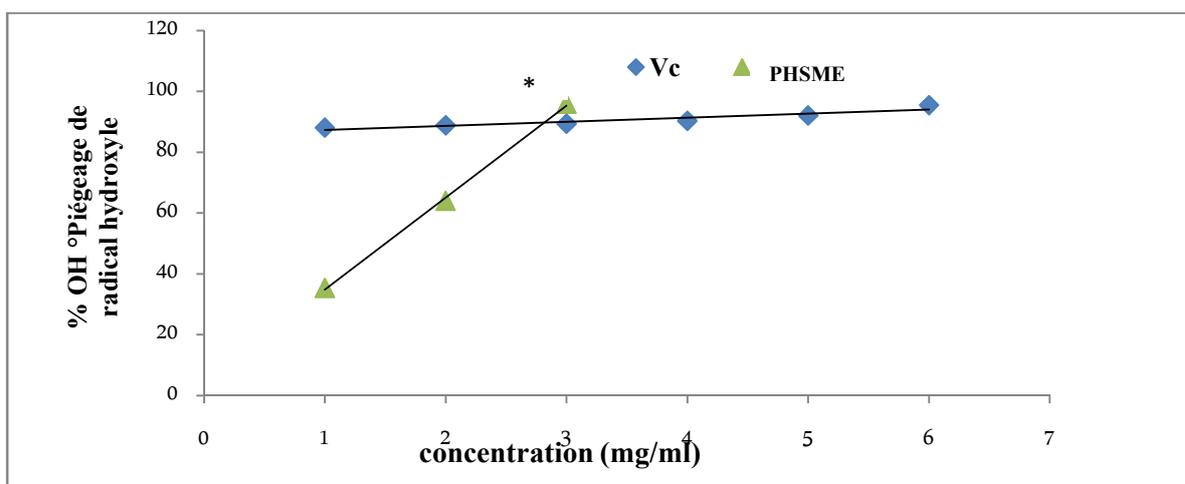


Figure 34: pouvoire de piégeage de radical hydroxyle par l'extrait PHSME et de la vitamine c (Vc).

6. L'Activité antiproliférative in vitro :

La prolifération cellulaire a été évaluée en utilisant un dosage de MTT, après incubation avec l'extrait PHSME pendant 48h, 72h aux concentrations de 4,5 à 45 mg / mL. Les effets d'inhibiteurs de la prolifération cellulaire des cellules MDA, et des cellules HepG2 ont été observés et comparés avec le groupe témoin. Notre essai in vitro a montré que l'extrait à base d'herbes présentait d'importants effets anti-prolifératifs sur les deux lignées cellulaires cancéreuses. Ces effets ont été dépendants de la dose et du temps (figure35,36). Les resultats montrent qu'il y a une diminution de 18% de viabilité des cellules après 72 heures du traitement par rapport à celles de 48 heures. La IC50 (la concentration à laquelle l'herbe présente une inhibition de 50% de la croissance des cellules tumorales) pour les lignées cellulaires MDA, HepG2 était comprise entre 2,72-5,47 mg / ml après 72 heures de traitement (tableau 11). Les cellules HepG2 étaient les plus sensibles aux extraits PHSME avec un IC50 de 2,7 mg / mL.

Il est bien de noter que l'extrait à base d'herbes a exercé une inhibition significativement élevée ($P < 0,05$) de la viabilité des cellules MDA, HepG2 entre 56 et 71% à la concentration la plus élevée (45 mg / mL) respectivement (**figure 35**).

TABLE 9 : Les valeurs de IC50des lignées cellulaires.

lignes cellulaires	IC 50 à 48h	IC 50 à 72h
Cellules HepG2	4,129 ± 0,063	2,729 ± 0,014
Cellules MDA-MB-468 Human Breast Carcinoma	5,06 ± 0,017	5,47 ± 0,023

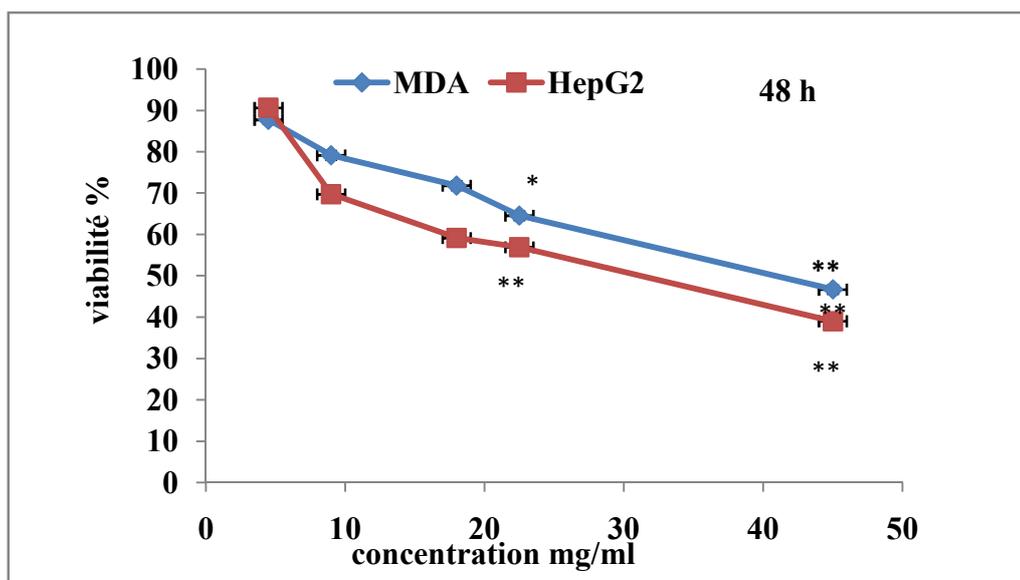


Figure 35 : Effet du traitement par l'extrait PHSME sur la viabilité des cellules HepG2 et MDA après 48 H.

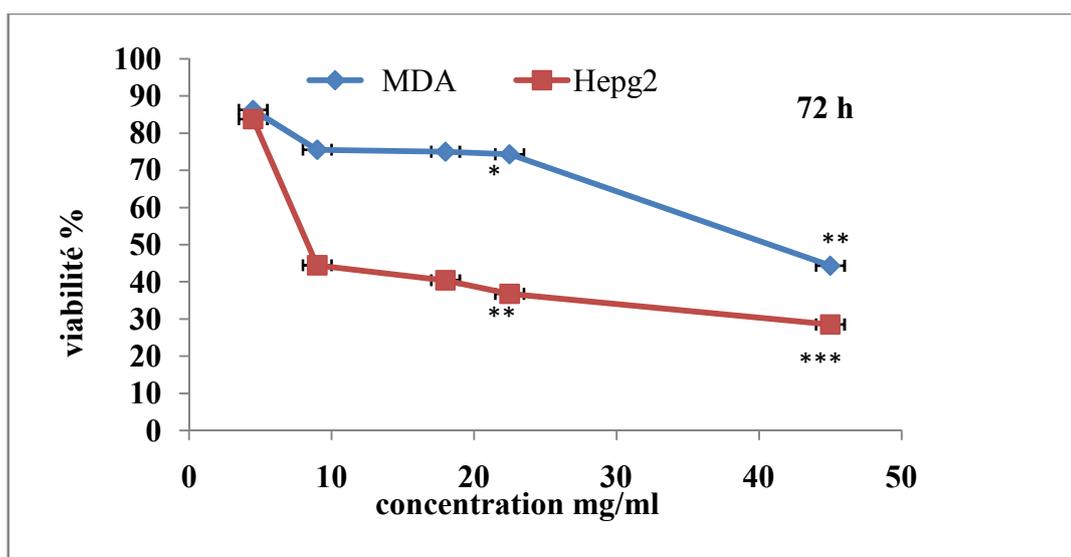


Figure 36 : Effet du traitement par l'extrait PHSME sur la viabilité des cellules HepG2 et MDA après 72 H.

7. Effet d'extrait PHSME sur l'apoptose :

Les cellules HepG2, MDA ont été traitées avec PHSME (45 mg / ml) pendant 48 h pour étudier l'activité anti-apoptotique par coloration avec l'annexine V-FTTC (FL1) et l'iodure de propidium. À-peu-près 20% à 36% des cellules ont été positives pour l'annexine V-FTTC (FL1) et l'IP comme contrôle non traité, alors que environ 1,5-1,7% des cellules traitées par PHSME ont été positives pour la coloration , ces cellules présentant une augmentation marquée d'apoptose (fig.37).

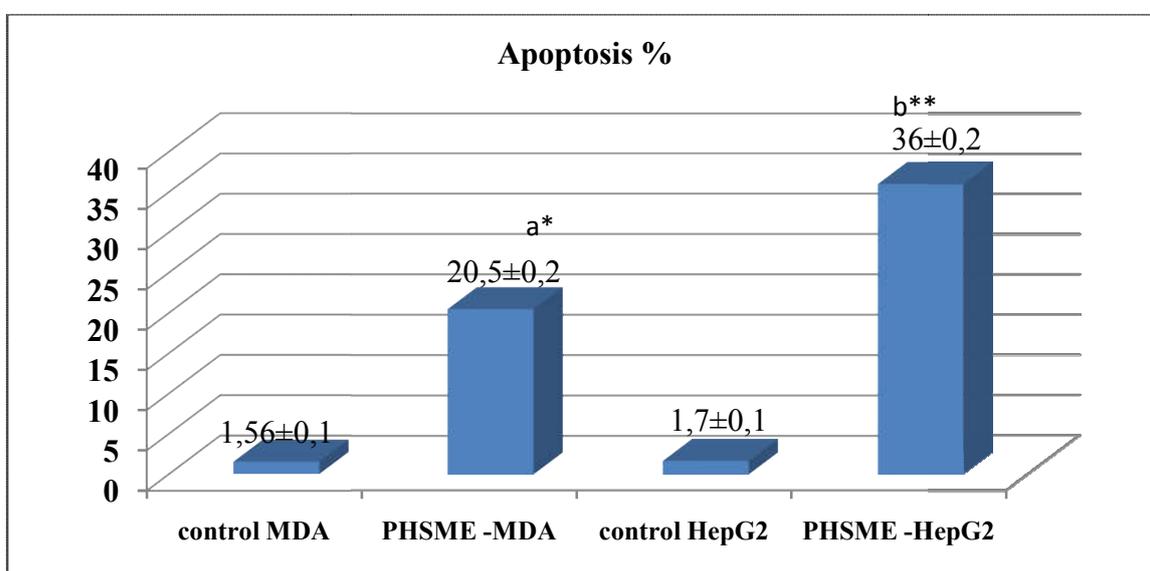


Figure 37 : L'effet d'extrait PHSME sur l'apoptose des cellules MDA et HepG2 a été incubé avec une dose de 45 mg / ml pendant 48 heures les cellules ont été colorées avec l'annexine V-FTTC (FL1) et l'iodure de propidium FL2.

(a comparer avec le control MDA), (b comparer avec control HepG2) les valeurs des résultats sont on moyennes ± Ecartype De trois expériences indépendantes.

8 . Effet d'extrait PHSME sur le cycle cellulaire :

L'analyse du cycle cellulaire après le traitement des cellules HepG2 et MDA avec PHSME a montré que, le pourcentage de SG1 phase était augmenté, le pourcentage de cellules à G1, S M a diminué. L'extrait PHSME a entraîné une progression importante du cycle cellulaire dans la phase SG1 (figure 38).

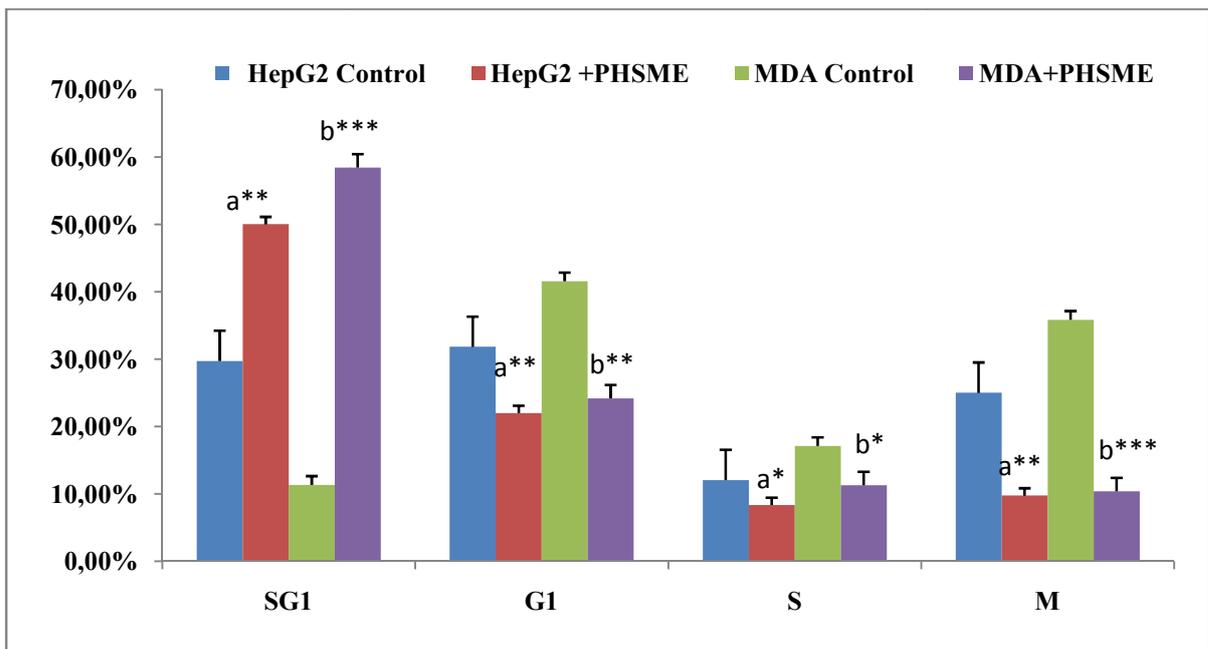


Figure 38: L'Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux: le pourcentage de cellules non traitées dans les phases SG1, G1, S, M du cycle cellulaire après le traitement 48h avec (45mg / ml) PHSME sur les cellules MDA et HepG2. (a comparer avec le control HepG2), (b comparer avec control MDA) les valeurs des résultats sont on moyennes \pm Ecartype De trois expériences indépendantes.

II -1- Influences du traitement sur les paramètres biochimiques :

1- Influence du traitement sur la concentration d'ASAT :

Les résultats obtenus dans notre étude (figure 39) ont montré que la Doxo provoquait après 48 heures de son injection une augmentation significative de la ASAT chez les deux groupes de rats traité par 15 mg/ kg de doxo (lot Doxo et lot PHSME+Doxo), par rapport au groupe de rats sains témoins ($P < 0.001$) ($207,43 \pm 9.39$ U/l et $164,38 \pm 0,73$ U/L) contre $121,27 \pm 9,12$ U/L.

les résultats montre aussi qu' aucun changement significatif de la concentration d' ASAT ($126,17 \pm 3,12$ U/L) , n' été remarqué chez le groupe de rat traité par l'extrait PHSME à une dose de 200 mg/kg. Ces résultats montrent également le traitement préventif de group Doxo par extrait PHSME a modifié et réduit la concentration d'ASAT avec une différence de 43,05 U/L hautement significative par rapport au groupe traité par la Doxo seule.

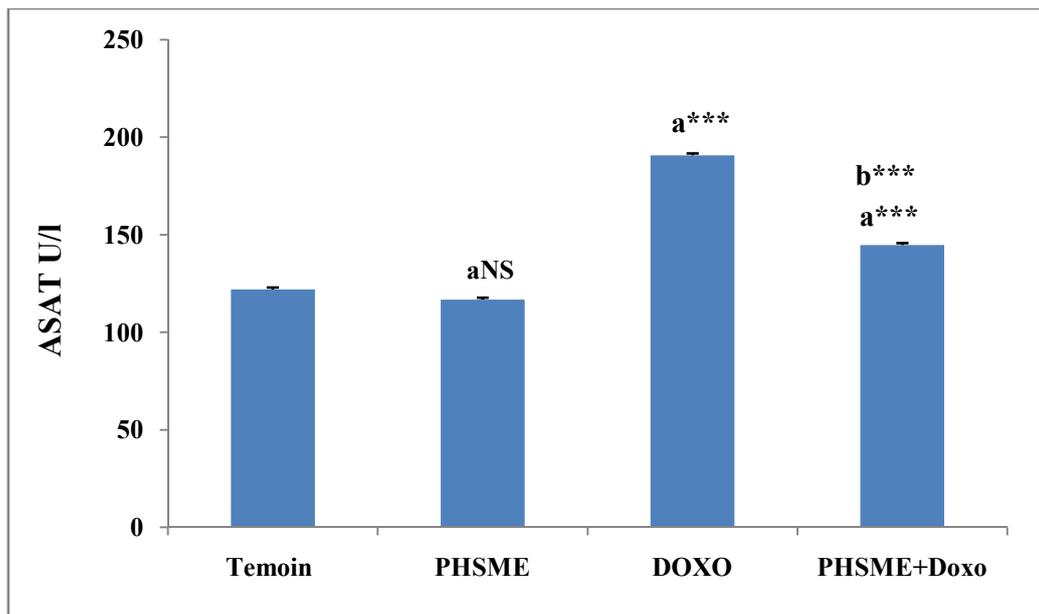


Figure 39 : Variation de la concentration d'ASAT sanguin (u/L) chez les rats témoins (T) et traités après traitement. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $0.05 > p > 0.01$, (***) $p < 0.001$ (a : tous les groupes vs temoin; b : PHSME+doxo vs DOXO).

2- Influence du traitement sur le taux d' ALAT :

Les résultats de l'influence de l'extrait *PHSME* de la partie aérienne de *Phlomis .samia* sur la concentration sérique d'ALAT chez des rats sains et des rats traité par la Doxo sont présentés dans la figure 40.

Chez le groupe de rats traité par la Doxo, nous avons constaté que l'injection de la Doxo à provoqué, après 48 heures, une augmentation significative de la concentration sérique du ALAT ($185,33 \pm 1.08$ U/l contre $106,9 \pm 1.04$ U/l) ($P < 0.001$) par rapport au groupe sain control, et aucun changement de cette concentration sérique d'ALAT ($103,38 \pm 2,29$ U/L) chez le groupe de rats traité par l'extrait PHSME à une dose de 200 mg/kg .par contre nous avons remarquer une démunissions significative de ce taux sérique par un traitement préventive avec l'extrait PHSME 15 jours avant l'injection de la Doxorébutine avec une différence de 60,31U/L. comme le montre la figure .

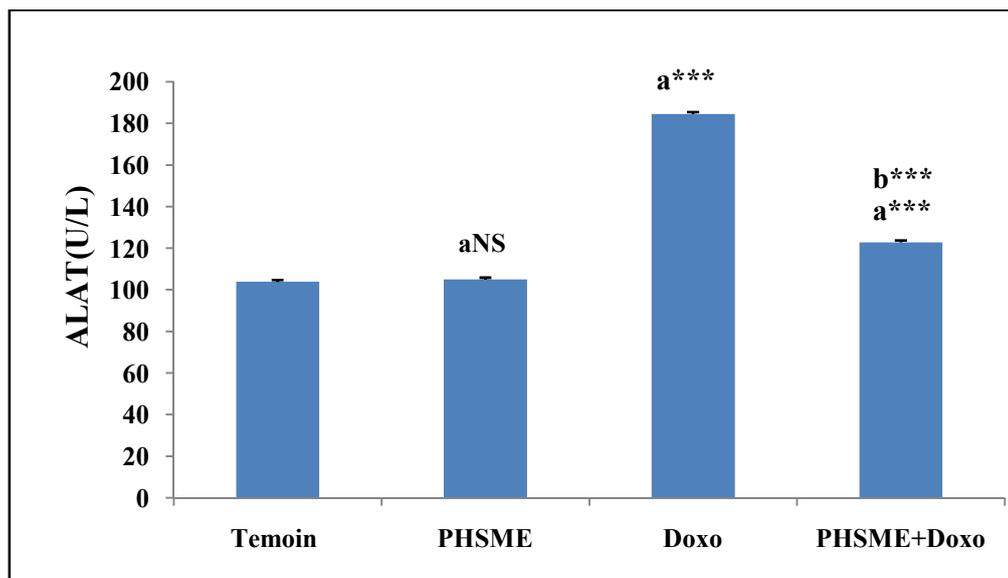


Figure 40 : Variation de la concentration d'ALAT sanguin (u/L) chez les rats témoins (T) et traités après traitement. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $0.05 > p > 0.01$, (***) $p < 0.001$ (a : tous les groups vs temoin; b : PHSME+doxo vs DOXO).

3- Influence du traitement sur le taux d'LDH :

Les résultats présentés sur la **figure 41** montre que la concentrations plasmatiques du **LDH** est significativement élevés chez le lot Doxo par rapport au contrôle avec un pourcentages allont jusqu'à 58 %.Le traitement avec l'extrait à significativement amélioré ce paramètre en diminuant la concentrations d'LDH par -38,85% Par rapport au group de rats traité par le Doxo seul. On constate qu'il y'a une différence significative de 27,08U/L de résultat entre le lot traité avec l'PHSME et le lot Témoin.

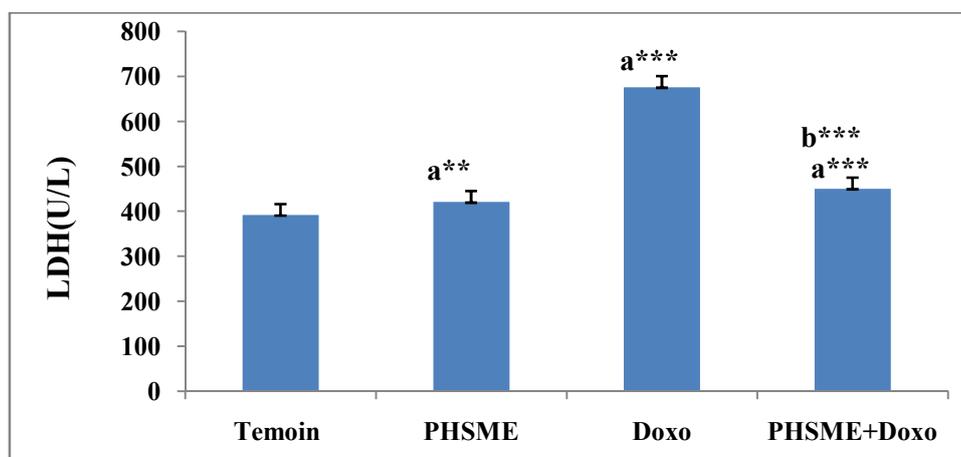


Figure 41 : Variation de la concentration de LDH sanguin (u/L) chez les rats témoins(T) et traités après traitement. *Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n=7) (NS) p > 0.05, * 0.05 > p > 0.01, (***) p < 0.001 (a : tous les groups vs témoin; b : PHSME+doxo vs DOXO).*

4- Influence du traitement sur le taux d'LDH :

D'après la figure 42, nous constatons qu'il n'y a aucun changement statistiquement significatif des niveaux du CPK sanguin chez les rats traités par extrait PHSME et le lot Témoin ($669,545 \pm 2,54 \text{U/L}$ et $614,59 \pm 1,84 \text{U/L}$) respectivement.

Les résultats de la figure montre aussi une augmentation très significative de taux de CPK ,chez les rat traité par la Doxo par rapport au témoin avec une valeur de $1097,46 \pm 5,28 \text{U/L}$ contre $669,54 \pm 2,54 \text{U/L}$ dans le même ordre .

nous constatons aussi qu'il a une amélioration significative ($P < 0.05$) avec une valeur de $775,30 \pm 2,37 \text{U/L}$ pour le lot préventive avec de l'extrait PHSME contre le traitement avec la Doxo seul.

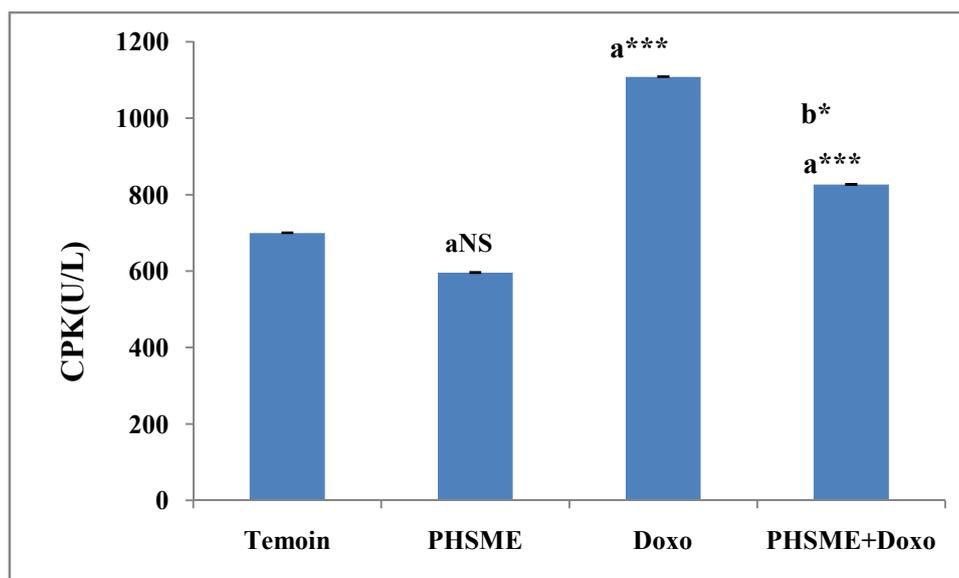


Figure 42 : Variation de la concentration de CPK sanguin (u/L) chez les rats témoins (T) et traités. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (a : tous les groups vs temoin; b :PHSME+doxo vs DOXO).

II-2-L'analyse des paramètres du stress oxydant:

Les constituants chimiques pour cette plantes comprennent les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes sont connus pour les propriétés antioxydantes et l'activité d'apoptose ,Cependant, il n'existe que quelques études d'extraits de *Ph.smia* décrivant leurs activités biologiques qui pourraient confirmer leur utilisation traditionnelle En médecine folklorique. Dans ce sens, le but de la présente étude était d'étudier les effets antioxydants et cardioprotecteur, d'extrait méthanolique des parties aériennes de Ph. Samia (PHSME).

1- Variation des concentrations en molonydialdéhyde (MDA) :

Les concentrations en MDA ont été déterminées sur des fractions cytosoliques du cœur .La figure 43 représente la variation du taux cardiaque en MDA chez des rats sains et des rats traité par la Doxorébutine a une dose de 15 mg/kg et traité par l'extrait méthanolique de la plant Algérienne *Phlomis .samia* (PHSME) par rapport au témoins.

Nous avant constaté une augmentation significative de taux d'MDA ($P < 0.001$) cardiaque chez des rats traité par anticancéreux Doxo par rapport aux rats sains témoins. Cette augmentation est à l'ordre de 139.65% (33.72 ± 1.26 contre 80.81 ± 1.15) Par contre un traitement de deux semaines par l'extrait méthanolique lyophilisé de *Phlomis.s* a baissé le

taux du MDA de 50.69 % chez les rats traités par l'anticancéreux précédé par extrait par rapport aux rats traités par Doxo seul .

Aucun changement n'a été remarqué (NS) en ce qui concerne lots PHSME lorsque en le compare avec lots témoin.

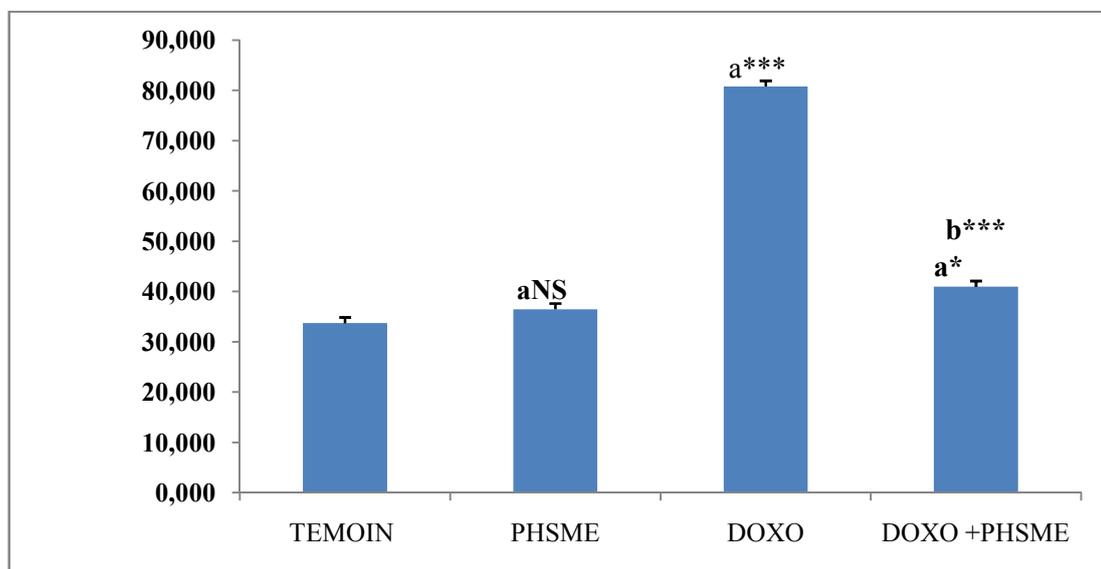


Figure 43 : Dosage de l'MDA tissulaire au niveau du coeur.

. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (a : tous les groupes vs témoin; b : PHSME+doxo vs DOXO).

2-Variation des concentrations en GSH cardiaque :

Le dosage de la forme réduite du glutathion tissulaire a montré qu'il a subi une baisse significative ($p < 0.001$) au niveau du cœur **-56,74%** , chez les rats de groupe Doxo par rapport au rats normaux contrôles (figure 44). Comparant le lot des rats traités par l'anticancereux avec le lots des rats Doxo+PHSME (lot préventive) , le traitement avec l'PHSME semble avoir un effet significatif dont on a noté une augmentation remarquable du taux du glutathion réduit du cœur **+52.89%** par rapport aux lots témoin .

. D'après ces données, on constate que Le traitement des rats normaux avec l'PHSME a significativement augmenté le taux de GSH au niveau des cœurs par rapport au lot normale contrôle.

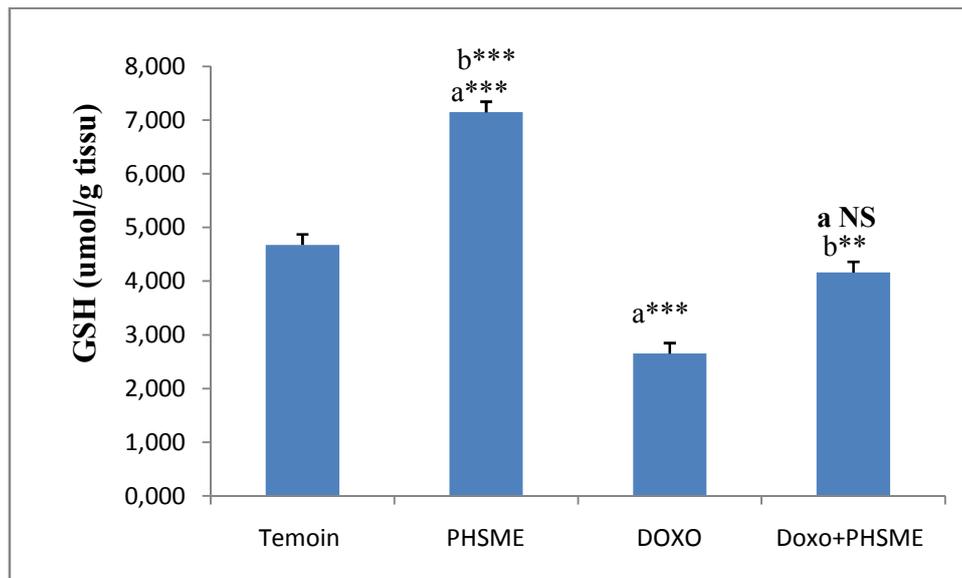


Figure 44 : Dosage de GSH tissulaire au niveau du coeur.

. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (a : tous les groups vs temoin; b :PHSME+doxo vs DOXO).

3-Variation d'activité de l'enzyme de Catalase cardiaque :

La catalase est l'une des enzymes antioxydantes les plus efficaces étant donné qu'elle n'est pas victime d'un phénomène d'inhibition aux fortes concentrations d' H_2O_2 , par ce qu'elle catalyse sa transformation en eau et en dioxygène.

Dans notre étude, nous avons constaté une chute de l'activité de la catalase chez les rats recevant la DOXO (0.51 ± 0.014) par rapport au groupe témoin normal ($1,7 \pm 0.031$). Par contre, nous avons remarquée une augmentation de l'activité de catalase chez le groupe préventif (PHSME+doxo) ($1,910 \pm 0.049$) par rapport au groupe DOXO (0.51 ± 0.014).

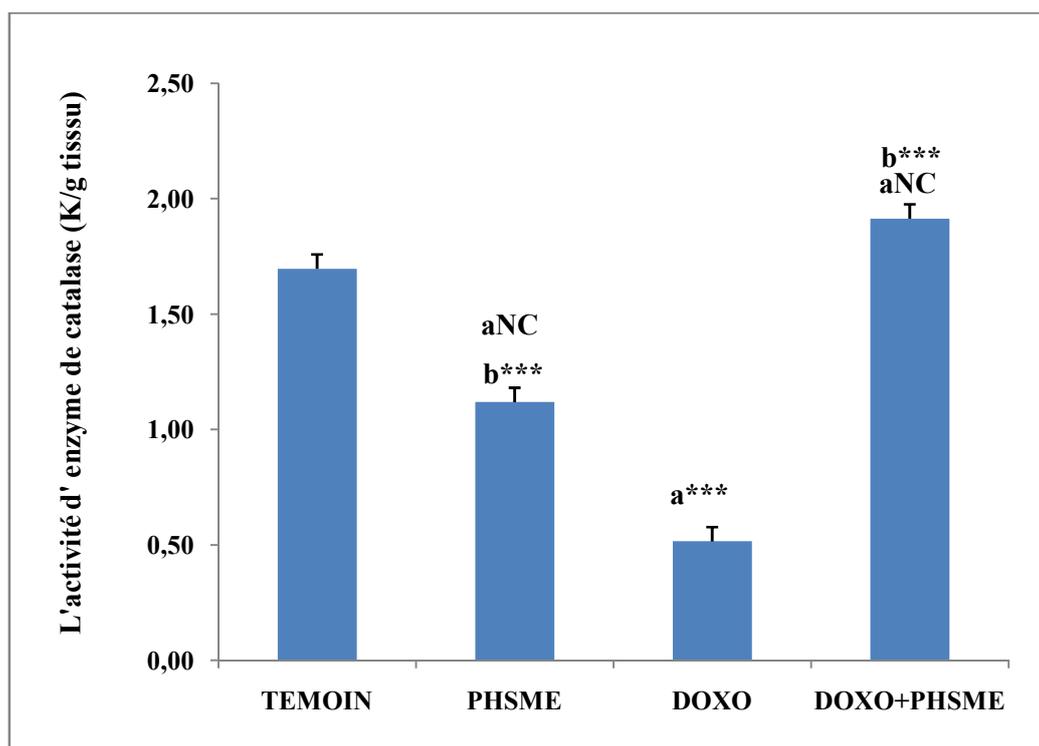


Figure 45 :L'activité d'enzyme de Catatase au niveau du coeur.

. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (a : tous les groups vs temoin; b :PHSME+doxo vs DOXO).

4-Variation d'activité de l'enzyme GST cardiaque :

L'activité de la GST a été déterminée sur une fraction cytosolique du coeur. La figure 46 présente les résultats l'influence d'un traitement de deux semaine par l'extrait Methanolique lyophilisé de *Phlomis samia* sur l'activité de l'enzyme de GST dans le coeur des rats sain et traité par le médicament anticancéreux la Doxorébutine .

Dans notre étude nous avons constaté une réduction significative de l'activité de GST au niveau du coeur chez les rats traité par le médicament anticancéreux la Doxorébutine par rapport a celles des rats sains témoins ($P < 0.001$). Cette réduction est à l'ordre de 29,59 % ($8,83 \pm 0,042$ contre $12,54 \pm 0,067$) ; Par contre un traitement de deux semaines par l'extrait methanolique lyophilisé de *Phlomis .s* a provoqué une augmentation significative de l'activité de GST au niveau cardiaque chez le lot préventive par rapport à celle enregistré chez les rats traité par la Doxorébutine ($P < 0.001$) $14,63 \pm 0,047$ contre $8,73 \pm 0.042$ respectivement.

Aucun changement significative n'a été remarqué chez les rat traité par l'extrait PHSME par rapport au rats sain témoin ($14,84 \pm 0,054$ contre $12,54 \pm 0,067$).

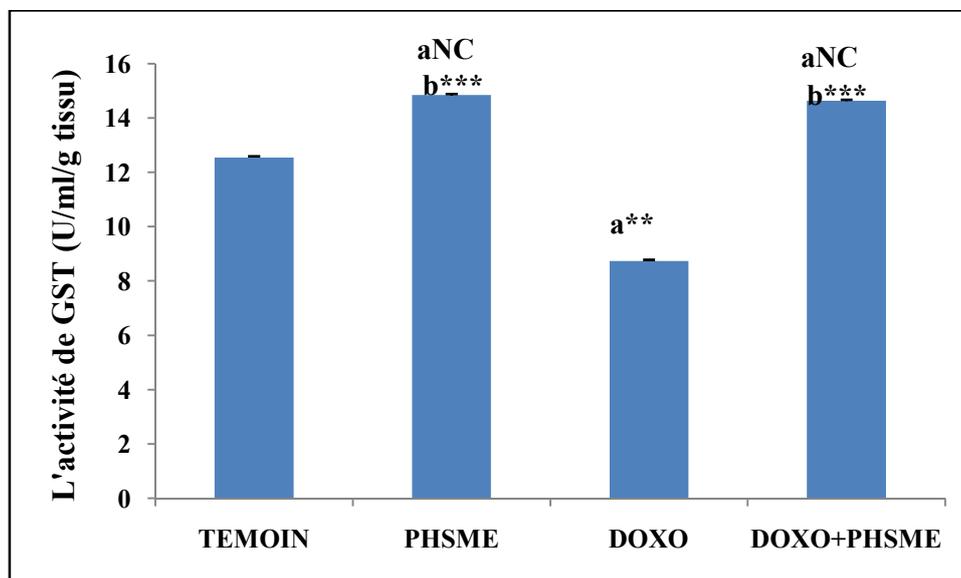


Figure 46 : L'activité d'enzyme de GST au niveau du coeur.

. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=7) (NS) $p > 0.05$, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (a : tous les groups vs temoin; b : PHSME+doxo vs DOXO).

II -3 - Analyse des coupes histologiques :

L'étude histologique du tissu myocardique a montré :

Figure 47 : Les images A et B montrent des coupes histologiques de rats du groupe témoin. On observe dans le tissu que les cellules montrent une organisation tissulaire normale sans la présence de cellules anormales ou de défauts structurels. La présence des fibres musculaires cardiaques intactes sont séparées par un tissu conjonctif remplissant l'espace intracellulaire (TC). Toutefois, chaque cellule reste bien individualisée, elle contient un noyau centré (N), allongé dans le sens de l'axe de la cellule.

Figure 48 : chez les animaux traités par doxorubicine seule, les images A et B montrent une anomalie au niveau de la structure des cellules myocardiques, principalement par la présence d'une dystrophie musculaire (DS), et une lyse des fibres musculaires cardiaque (LFMC), et une apparition d'une nécrose.

Figure 49 : Les images A et B montrent deux coupes histologiques du tissu cardiaque chez des rats ayant reçu d'PHSME seul. On observe dans le tissu que les cellules montrent une organisation tissulaire normale sans la présence de cellules anormales ou de défauts structurels, pas de dommage du tissu cardiaque. Son image rassemble à celui du groupe témoin.

Figure 50 : L'étude histologique de biopsies endomyocardiques de tissu des rats du groupe préventif (prétraité par PHSME plus la doxo). Les images A et B met en évidence la présence des artères et des fibres musculaire cardiaque intacte et marqué par une légère lyse (image C). En effet, il ya une correction par l'extrait PHSME qui a diminué remarquablement les lésions éminents chez les rats traité par la doxo seule.

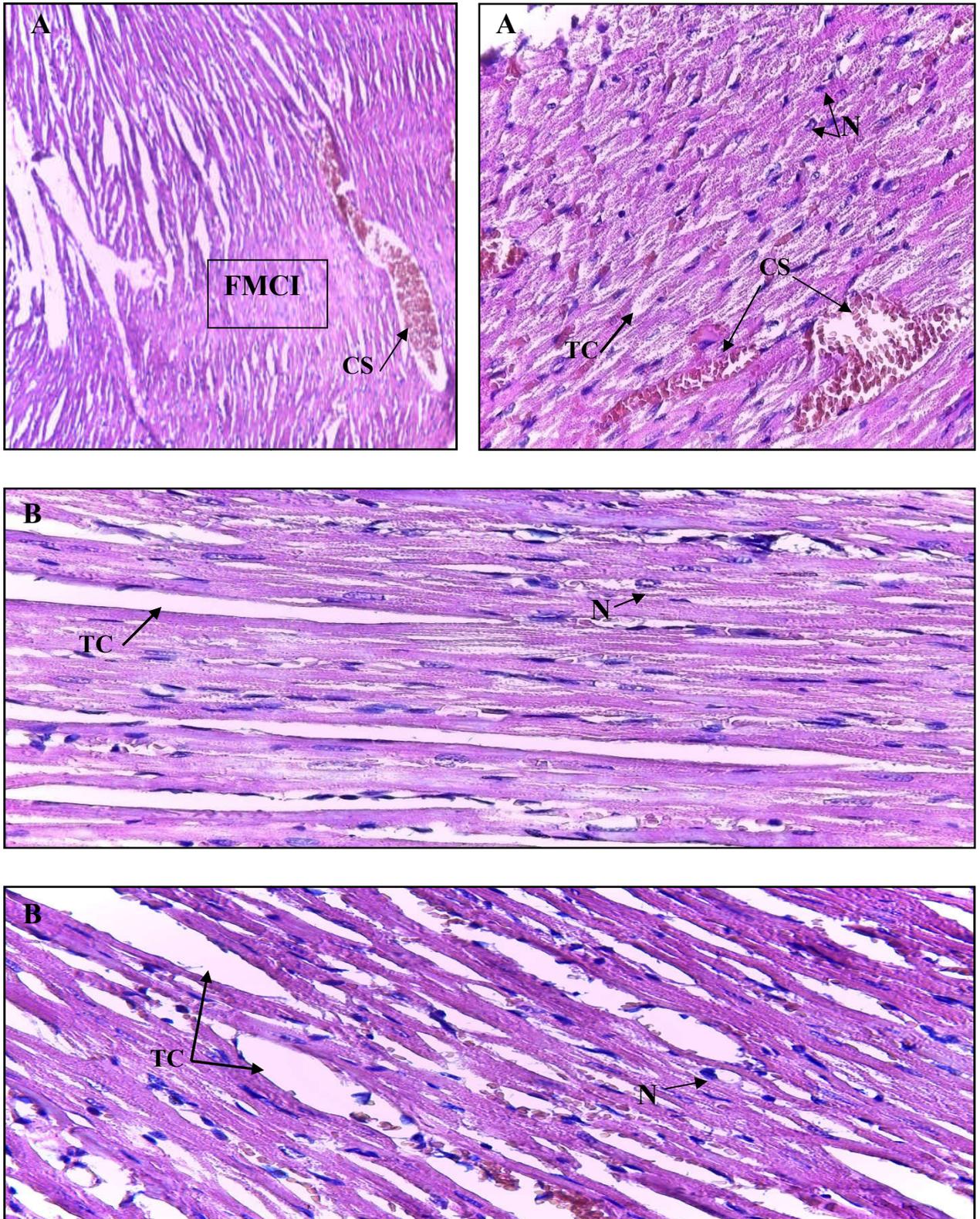


Figure 47 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe Témoin Coloration hématoxyline éosine A (G×100) et B (G×400) TC: Tissu conjonctif, FMCI : Fibre musculaire cardiaque intacte N : Noyau de cardiomyocyte CS : Capillaires Sanguins

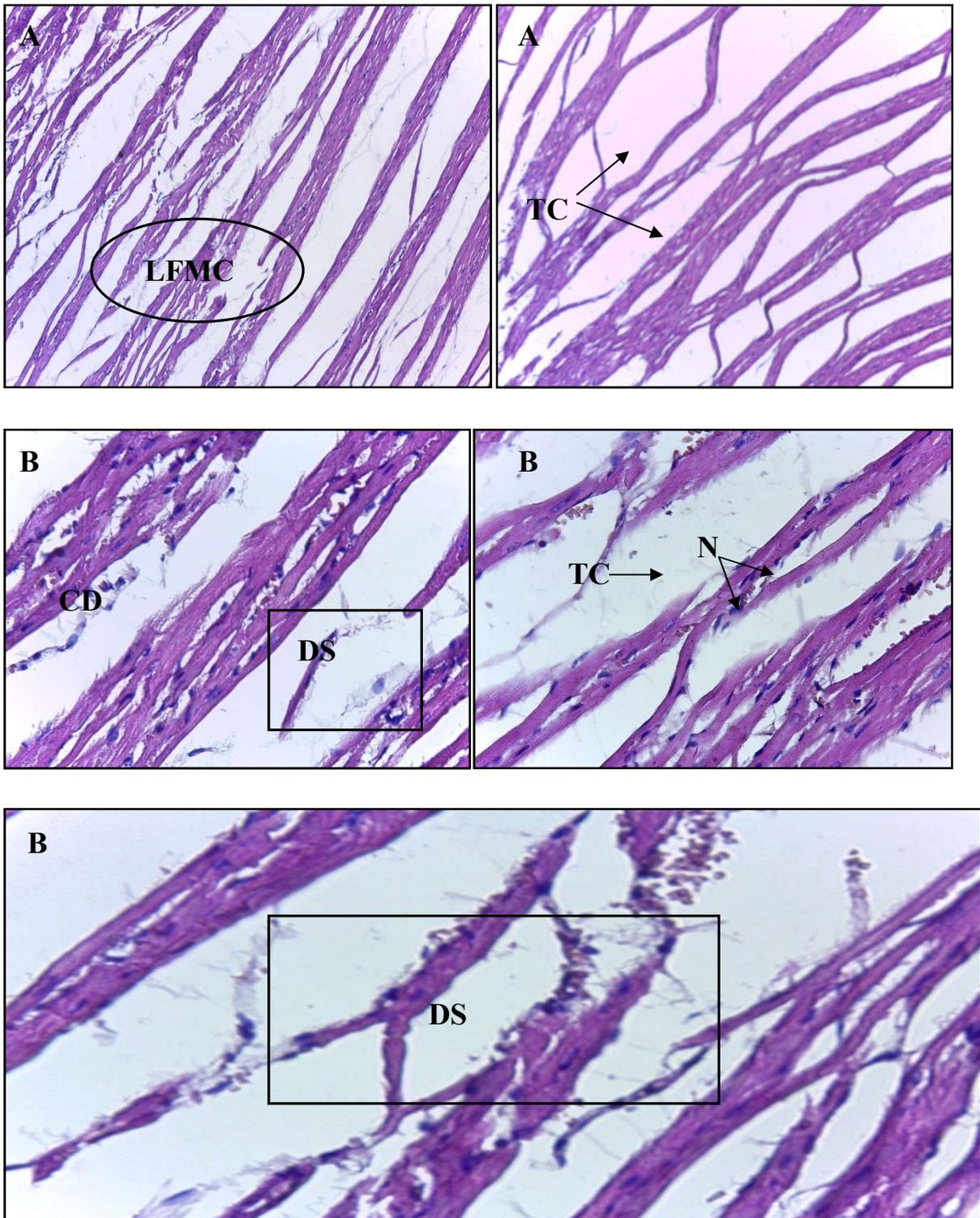


Figure 48 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe (DOXO)

Coloration hématoxyline éosine A(G×100) et B(G×400)

LFMC : Lyse des fibres musculaire cardiaque DS : Dystrophie Musculaire

TC: Tissu conjonctif CD : Cardiomyocytes Déformées

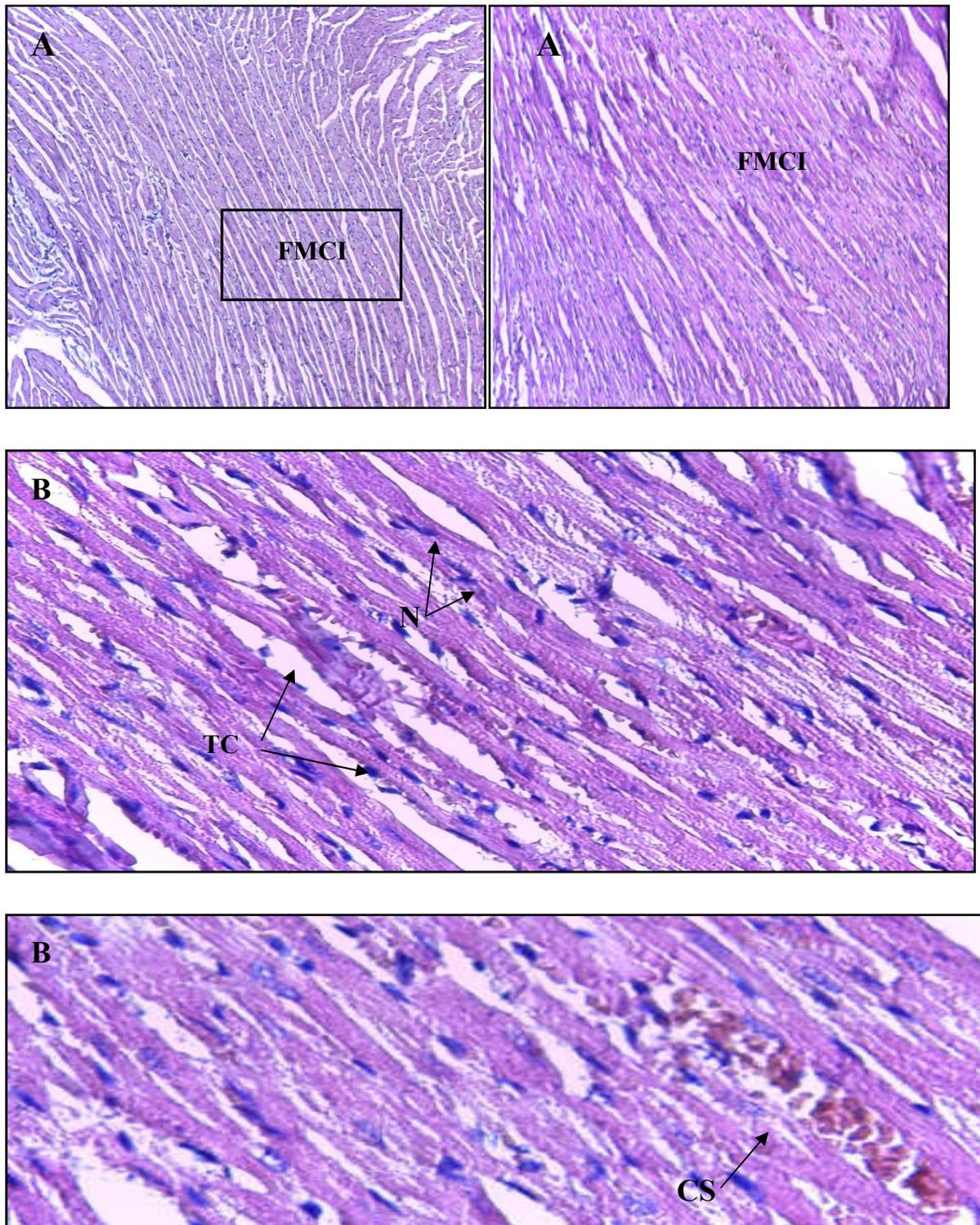


Figure 49 : Coupes longitudinales du myocarde du groupe traité par 200 mg/kg de l'extrait PHSME .Coloration hématoxyline éosine A(G×100) et B(G×400) TC: Tissu conjonctif, FMCI : Fibre musculaire cardiaque intacte N : Noyau de cardiomyocyte CS : Capillaires Sanguins .

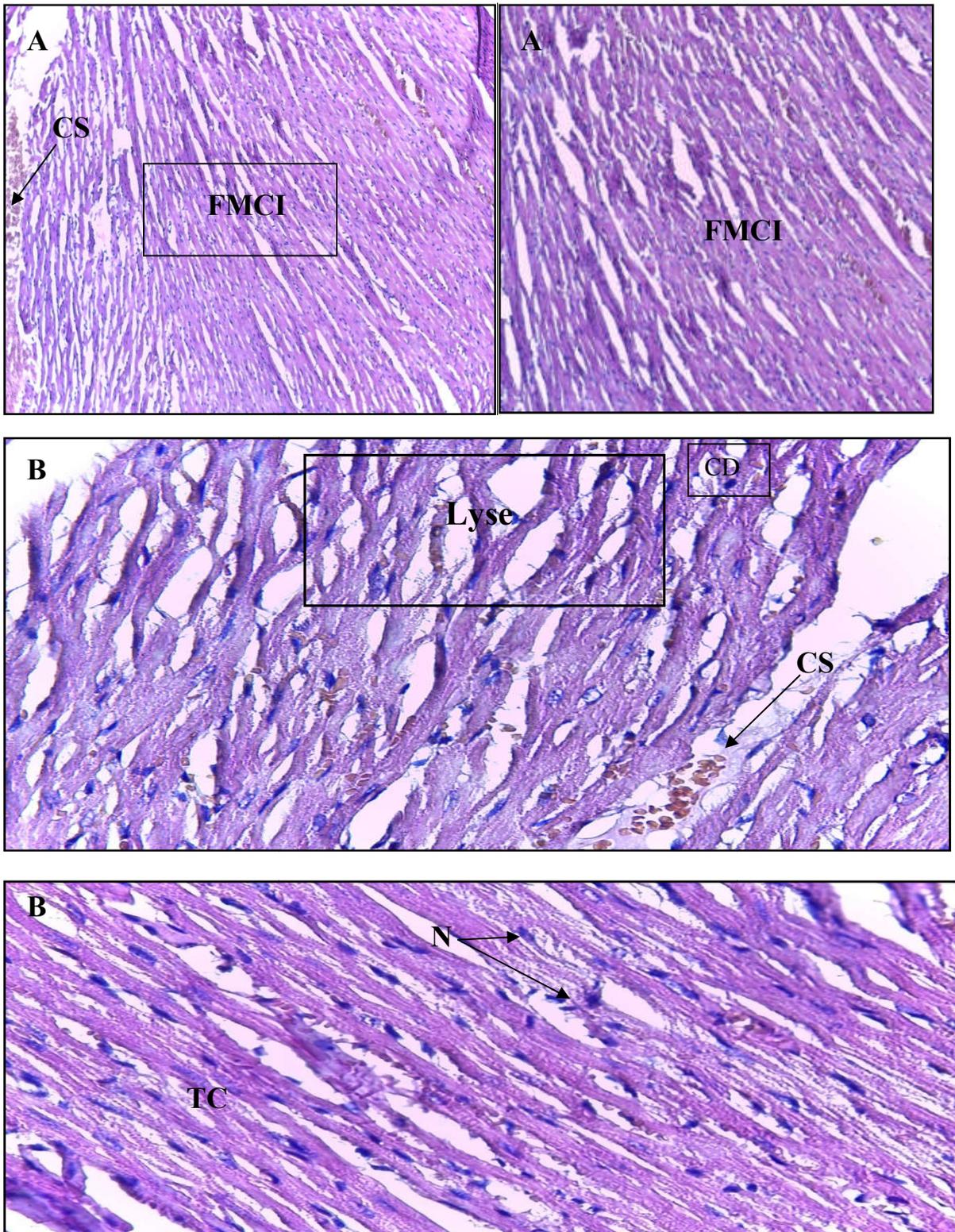


Figure 50: Coupes longitudinales du myocarde du groupe Doxo+PHSME (Prév)

Coloration hématoxyline éosine A(G×100) ,B(G×400) et C(G×400)

FMCI : Fibre musculaire cardiaque intacte , N : Noyau de cardiomyocyte TC: Tissu conjonctif , CS :capillaire sanguin .

Discussion

Discussion

La doxorubicine est un antibiotique anthracycline très actif Utilisé largement dans le traitement des patients atteints un Cancer du sein, cancer des ovaires, sarcomes, leucémies et lymphomes. Il est l'un des antitumoraux le plus efficace (Singal PK et Iliskovic., 1998).

Les antibiotiques appartenant à la classe des anthracyclines. Son utilisation est limitée par une forte incidence de cardiotoxicité (Kelishomi et al., 2008). Le principal mécanisme putatif pour la cardiotoxicité induite par la doxorubicine est la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) lors de son métabolisme intracellulaire. ROS Provoque divers dommages oxydatifs sur les composants cellulaires et les membranes attaqué en induisant la peroxydation lipidique À la perte irréversible de myofibrilles, à la dilatation du réticulum sarcoplasmique, à la vacuolisation cytoplasmique et au gonflement des mitochondries (Takemura & Fujiwara, 2007). Plutôt sur la toxicité sélective Pour le doxorubicine dans le tissu cardiaque plutôt que d'autres tissus tels que le foie est dû à de faibles niveaux de défenses antioxydants (Barry et al., 2007).

Dans le temps récent, l'attention a été Concentré pour l'utilisation d'antioxydants naturels pour la Prévention des troubles médiés par le stress oxydatif tels que le diabète, le cancer, la toxicité cardiaque et la toxicité hépatique (Li et al., 2006).

Les antioxydants Naturel obtenus à partir de plantes médicinales sont devenus Populaire en raison de leur faible coût, de leur facilité d'accès et de moins d'effets secondaires perçus.

Dans ce contexte Nous avons choisi *Phlomis. samia*, une plante médicinale Importante pour explorer son application thérapeutique potentielle dans la prévention de la cardiotoxicité induite par la doxorubicine.

Certaines espèces de *Phlomis* ont été utilisées dans la médecine folklorique comme stimulants, toniques (Saracoglu et al., 1998), guérisseurs de plaies (Bucar et al., 1998) et analgésiques (Zhang et al.,1991). Il existe des preuves indiquant diverses activités telles que : anti-inflammatoire, immunosuppresseur, antimutagène (Saracoglu et al., 1995) le balayage des radicaux libres (Kyriakopoulo et al., 2001) et l'antimicrobien (Couldis et al.,2000) pour *Phlomis*. Les plantes du genre *Phlomis* ont été démontré qu'elles contiennent différentes classes de glycosides comprenant Iridoïdes, flavonoïdes, phénylpropanoïdes, phénylétioïnes Et diterpenoids. Le groupe de flavonoïdes est connu pour sont effet anti-

inflammatoire, anti-allergique, antithrombotique, Vasoprotecteur, inhibition de la promotion de la tumeur et Protégé la muqueuse gastrique. Ces propriétés ont été Attribué à l'influence des flavonoïdes sur la production des prostaglandines et leurs effets antioxydants (Couldis et al., 2000). Certains des glycosides phénylpropanoïdes sont connus pour posséder des Propriétés biologiques, y compris cytotoxiques, cytostatiques, Anti-inflammatoire, antinociceptive, immunosuppresseur et Effets antimicrobiens (Kamel et al., 2000 ; Ismailoglu et al., 2002) et beaucoup de glycosides iridoïdes Isolé des plantes a montré des activités biologiques significatives, par exemple. Choléré, purgatif, hépatoprotecteur, vasoconstricteur, Analgésique, sédatif, anti-inflammatoire et antimicrobien Activités (Ismailoglu et al., 2002). Récemment, les effets de balayage des radicaux libres de des glycosides phénylpropanoïdes et iridoïdes ont été rapportés De certaines espèces de *Phlomis* (Ismailoglu et al., 2002).*Phlomis samia* Desfontaines (Lamiaceae) est une plante endémique algérienne rare, communément Connu sous le nom de Kayat El Adjarah (Quezel, & Santa, 1968) Au meilleur de nos Connais *P. samia* N'a fait l'objet d'aucune recherche pharmacologique En ce qui concerne l'effet cardioprotective et apoptotique . alors que des études antérieures n'ont montrés que une forte activité antimicrobienne des huiles essentiels extraite de ceux espèce

Tenant compte de ces données, notre étude a porté sur l'étude phytochimique et pharmacologique préliminaire de l'espèce *Phlomis samia* bovie de noé, ainsi que sur l'évaluation de l'activité cardioprotective , antioxydante et proapoptotique d'une part, la Doxorubicine et ses perturbations métaboliques et d'autre part, sur les biomarqueurs du stress oxydant associé au cardiotoxicité induite par l'anticancereux .

Etude du matériel végétal:

L'extrait méthanolique de la partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de *Phlomis samia* (avec un rendement de 12.78 %) a subi un screening phytochimique qualitatif et quantitatif. Ce qualitatif a révélé la présence de certains isoprénoïdes: les alcaloïdes sels et les saponosides à génines stéroïdiques et triterpéniques, en plus d'autres composés phénoliques : flavonoïdes, tanins et coumarines. Selon (Newman et al., 1974 ; Markham et al., 1982) les composés que pourraient contenir un extrait brut sont des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins. Nos résultats sont en partie

comparables a ceux obtenus par (Sarkhail et al., 2003) qui ont montrer que L'analyse préliminaire phytochimique par Chromatographie sur couche mince en utilisant des réactifs spécifiques ont indiqué la présence de glycosides iridoïdes et les composés phénoliques tels que les glycosides flavonoïdes et phénylpropanoïdes dans des extraits totaux de *Phlomis olivieri Benth.*, *Phlomis anisodonta Boiss.* Et *Phlomis persica Boiss.* Une autre etude de (Kabouche et al., 2005) a montrer la présence d'un glycoside phenylethanoid, verbascoside et trois connue flavonoïdes à savoir, la lutéoline, la lutéoline 7-b-D-glucopyranoside et chrysoeriol dans l'extrait de *Phlomis crinita* (Cav.) qui été recueillies auprès djebel El-Ouahch, Constantine, Algérie.

Le screening phytochimique quantitatif a montré que la plante contient 73.14 ± 0.15 mgEAG/gE polyphénols totaux parmi les quels 21.61 ± 0.17 mgEQ/gE flavonoïdes. Ces résultats nous donnent une bonne prévision concernant l'activité biologique de la plante, malgré qu'elle soit générale et imprécise, elle reste encourageante surtout que ces composés phytochimiques dont on a prouvés la présence sont connus par leurs effets pharmacologiques et d'être impliqués dans de nombreuses activités biologiques .

Investigations chromatographiques par HPLC d'extrait PHSME

D'une manière générale l'HPLC, qui fait intervenir une phase stationnaire solide constituée de particules fines et une phase mobile liquide, demeure la technique la plus souvent utilisée car elle présente de nombreux avantages telles que sa simplicité de mise en oeuvre, sa reproductibilité, une gamme étendue de phases stationnaires commercialement disponibles permettant de moduler les interactions avec le soluté, et ses diverses possibilités de couplages avec d'autres techniques chromatographiques et/ou des systèmes de détection.

les différents systèmes de détection pouvant être couplés avec l'HPLC, les systèmes de détection les plus communément utilisés sont les détections par absorption dans l'ultravioletvisible (UV-vis), fluorescence, diffusion de lumière (DEDL), électrochimie, spectrométrie de masse (MS, Mass Spectrometry) et résonance magnétique nucléaire (RMN).

L'HPLC a majoritairement été utilisée pour l'analyse des composés phénoliques de l'extrait PHSME. Il peut être remarqué que la séparation des polyphénols , et particulièrement celle des flavonols,

Les conditions expérimentales utilisées lors des analyses chromatographiques permettent d'envisager un ordre d'élution possible des composés polyphénoliques. Les composés les plus polaires sont moins retenus par la colonne C18. L'ordre d'élution des molécules étant aussi déterminé par la nature et le gradient des solvants utilisés.

On peut donc envisager que pour un solvant d'élution tel que l'acétonitrile les premiers constituants à être élués soient : les acides hydroxybenzoïques, suivis des flavan-3-ols, des acides hydroxycinnamiques, des coumarines, des flavanones, des dihydrochalcones, des flavonols et des flavones. Si les polyphénols devaient contenir des groupements apolaires (groupement méthoxy par exemple), ils seraient alors plus retenus par la phase stationnaire. S'ils devaient posséder des sucres, ils seraient alors élués avant leur forme aglycone. Et enfin, dans le cas d'une acétylation éventuelle du sucre, les temps de rétention seraient alors augmentés (Abad-Garcia et al., 2009).

Le profil d'élution des composés issus de l'extrait a été suivi à 280 nm, longueur d'onde caractéristique des composés phénoliques. En effet, tous les phénols sont détectés dans la région des ultra-violets avec un pic d'absorption maximum à 280 nm du à la présence du cycle phénolique. Le cycle B présent dans les différentes classes de flavonoïdes est caractérisé généralement par un pic d'absorption qui se situe dans un intervalle de mesure compris entre 300 et 380 nm, exception faite pour les anthocyanes dont le cycle B présente un maximum d'absorption entre 460 et 560 nm. Le Tableau 4 concilie les différentes longueurs d'onde généralement utilisées dans le cas de l'étude des composés phénoliques (Merken et Beecher, 2000; Stecher et al., 2001; Robbins, 2003).

Cette première analyse qualitative a été affinée par surcharge de témoins commerciaux en utilisant plusieurs acides phénoliques et flavonoïdes de différentes natures. Les temps de rétention et les longueurs d'onde correspondant aux maxima sont consignés dans le Tableau 4. La superposition des chromatogrammes à 280 nm illustrée dans le Tableau 3, et la comparaison du pic cible à celui du témoin, ne nous a permis que de suspecter la présence éventuelle dans l'extrait brut étaient: chlorogénique acide ferulic acide luteolin ; Apigenin et α caumarique acide (Figure 26)

Les résultats obtenus sont compatibles avec le travail de Zhang et Wang (2009), L'analyse par HPLC des composés phénoliques dans l'acétone et du méthanol des

extraits de *P. umbrosa* et *é* ont montré que l'acide protocatéchique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, (-) - épicatechine, l'acide benzoïque, la rutine, l'acide salicylique, et l'acide rosmarinique sont présents dans tous les échantillons. Aussi, des traces de l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide p-coumarique, et cinnamique ont été détectés. Y étaient des composés qui ne pouvaient pas être identifiés; Toutefois, en fonction de leurs comportements chromatographiques et spectres UV, leur classe chimique peut correspondre à l'inconnu des composés phénoliques.

Plusieurs études ont montré que Les flavonoïdes sont les principaux phytoconstituants Isolés du genre *Phlomis*. Ceux-ci incluent Apigénine, lutéoline, naringénine, érydiocol, chryseriol, kaempferol et leurs glycosides. La majorité Des flavonoïdes identifiés dans le genre *Phlomis* sont les flavones, les flavonols Et fréquemment 7 ou 3-glycosylés. Luteolin 7-glucoside, luteolin-7-O - β - glucopyranoside, chrysoeriol-7-p-coumaroylglucoside Et le chrysoériol-7-glucoside constituent le plus souvent Flavonoïdes glycosylés fondés dans le genre *Phlomis* (El- Negoumy et al., 1986; Kyriakopoulou et al., 2001; Marin et al., 2007).

D'après les résultats obtenus par le screening phytochimique et l'analyse par HPLC, il était utile de réaliser certains tests pharmacologiques. Commencant par le test de toxicité de la plante : le test d'innocuité. Ce test est appelé aussi essai de toxicité anormale. Il est surtout utilisé pour tester les produits nouveaux en industrie pharmaceutique. Il consiste à administrer à des souris une dose unique de la substance par la voie appropriée et la durée d'observation est de 72 heures. Les produits dont DL50 est inconnue, la plus grande quantité de produit est administrée afin que le rapport dose souris/dose humain soit le plus grand possible, et c'est le cas de notre extrait où aucune éventuelle toxicité n'a été observée avec les différentes doses testées jusqu'à 5g/kg d'PHSME. Dans notre étude la période d'observation était d'une semaine après administration unique pour le premier et le troisième jour, c'était juste pour s'assurer s'il y a une toxicité après le métabolisme des constituants de l'PHSME. L'absence d'éventuelle toxicité peut nous conduire à penser à la faible teneur en alcaloïdes connus par leur toxicité à fortes doses.

L'activité antioxydante in vitro

L'évaluation de l'effet de *Phlomis samia* est un objectif principal dans notre étude, raison pour laquelle il était indispensable de l'étudier in vitro avant de passer à l'étude in vivo. Pour cela plusieurs tests sont réalisés : L'activité antioxydante par le test au β -

carotène / acide linoléique (Aslan et al., 2006), et L'effet scavenger par le test de DPPH (Cuendet et al., 1997; Burits & Bucar., 2000).

Le test de β -carotène / acide linoléique a montré que le pourcentage de l'activité antioxydante de l'PHSME était de $97.05 \pm 0.94 \%$ contre $99.97 \pm 0.92 \%$ pour le BHT (composé antioxydant synthétique). La capacité antioxydante des plantes est principalement due à leur richesse en composés phénoliques, qui sont capables à donner des atomes d'hydrogènes pour inhiber la peroxydation lipidique (Amic et al., 2003). La présence et le nombre de groupements OH libres sont des facteurs déterminants de l'activité antioxydante des polyphénols (Sharififar et al., 2008).

Nos résultats est en accord avec Zhang et Wang (2009) qui ont montré que les extraits Méthanolique de *P. umbrosa* et *P. megalantha*, a exercé des effets marqués sur l'inhibition De l'oxydation de l'acide linoléique par un pourcentage de $82.4 \pm 0.07 \%$ et $87.8 \pm 0.10\%$ respectivement , qui était aussi forte Comme références positives par rapport ou BHT et VitE .

Le test de DPPH effectué sur l'PHSME pour évaluer son effet scavenger a montré qu'il a une IC50 de $34 \mu\text{g/ml}$ contre $32.92 \pm 0.62 \mu\text{g/ml}$ pour le BHT. Une étude pareille réalisée sur l'extrait méthanolique de *P. megalantha*, *P. umbrosa* a montré une forte hydrogénation Capacité et peut neutraliser efficacement DPPH Radicaux. Les valeurs IC50 dans les capacités de balayage étaient de l'ordre de $15,7$ et $20,2 \mu\text{g/ml}$ respectivement. En ce qui concerne les Composés phénoliques purs (protocatechique, chlorogène, benzoïque, L'acide rosmarinique et la rutine), l'acide protocatechique avaient La plus haute capacité de balayage des radicaux, suivie par le rosmarinic Acide, acide chlorogène et rutine (Zhang & Wang Zhe-zhi 2009).

D'autres études ont montrer que Forsythoside B, acteoside (le principal alcool phényléthylglycoside dans le genre *Phlomis*) purifié de *Phlomis caucasica* Et le samioside préparé à partir de *Phlomis samia* s'est avéré être Des piègeurs puissants du radical 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyle (DPPH) (Kyriakopoulou et al., 2001; Delazar et al., 2008).

Par comparaison à cette étude, on peut dire que l'effet scavenger de l'PHSME est aussi très élevé. Les résultats obtenus par l'étude phytochimique et pharmacologique de

l'PHSME nous ont permis de conclure que cette plante est riche en composés phénoliques doués d'activités biologiques et pharmacologiques très importantes. En plus, la capacité puissante de la plante vis à vis les radicaux libres et l'oxydation donne un grand espoir concernant son effet contre le stress oxydant *in vivo*.

Le teste de l'inhibition de la peroxydation lipidique a été effectuer par deux sources riches on lipides homogénat de foie et le jaune d'œuf ,D'après les résultats, nous avons trouvé que l'PHSME à la concentration de 200 mg a un effet inhibiteur plus puissant qu'à la concentration de 100 mg. Ces résultats sont relativement en accord avec les études de Bounatirou et al, 2007 qui ont montré que l'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique varie d'une plante médicinale à une autre et avec des concentrations élevées. d'autre résultats indiquent que les flavonoides évidemment inhiber Le OH produit par le système $Fe^{2+} + H_2O_2$, inhibe encore la peroxydation lipidique Dans le microsome du foie de souris (Guang-Hong et al., 2014).

L'activité de réduction de puissance est un bon indicateur d'antioxydant activité. La plante ayant une puissance réductrice élevée en général a également signalé un fort potentiel antioxydant.

En outre, Les résultats montrent que l'PHSME contient des composés qui entrent en compétition avec la ferrozine pour chélater le fer ferreux (Fe^{2+}). La capacité chélatrice d'un produit est très importante du fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transition catalyseurs de la peroxydation lipidique *in vivo*. Les métaux de transition comme le fer ferreux (Fe^{2+}), peuvent faciliter la production des espèces réactives de l'oxygène dans les systèmes biologiques. Ainsi, la capacité d'un produit à chélater le fer lui accorde une précieuse capacité antioxydante en retardant l'oxydation catalysée par les métaux (Halliwell & Gutteridge, 1984). Le fer est connu comme le pro-oxydant le plus important des lipides en raison de sa grande réactivité. Ainsi, les produits chélateurs offrent une protection contre l'endommagement oxydatif des cellules en éliminant les ions Fe^{2+} qui participent dans la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux pyroxyles et alcoxyles qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique (Demirtas et al., 2013). Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes et les acides phénoliques possèdent une remarquable activité chélatrice envers les ions métalliques (Capecka et al., 2005). Ainsi, il a été rapporté par Verdan et ses

collaborateurs (2011) que l'effet chélateur de certains flavonols (quercétine, myricétine et morine) est dû en partie à leur pouvoir de fixer les différents métaux comme Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} et Zn^{+2} via leurs groupements hydroxyles des trois cycles. Sachant que les deux groupes: 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C sont les plus intéressants.

L'aptitude d'un composé de donner des électrons lors d'une réaction d'oxydoréduction peut être exploitée pour mesurer son activité anti-oxydante. Cette capacité de donation d'électron est appelée pouvoir réducteur (Le et al., 2007). La mesure du pouvoir réducteur des composés purs ou sous forme d'extrait brut peut se faire par détection spectrophotométrique (à 700 nm) du complexe $(Fe^{+3})_4[Fe^{+2}(CN^-)_6]_3$. Les résultats de ce travail montrent que l'PHSME a exercé un effet réducteur, qui pourrait être dû à sa richesse en composé polyphénoliques. Il est connu que ces molécules servent de bons donneurs d'électrons et d'hydrogènes qui sont dérivées principalement de leur cycle B. En conséquence, ils peuvent mettre fin à la réaction radicalaire en chaîne par conversion des espèces réactives de l'oxygène à des produits plus stables (Le et al., 2007).

La Réduction De Fe^{+2} par l'activité donatrice d'électrons des composés Reflète le mécanisme antioxydant possible des composés. Dans cette expérience, les ions ferriques sont réduits à Les ions ferreux avec la couleur du mélange réactionnel changeant Du jaune au vert bleuâtre. Les résultats pour l'activité de la puissance réductrice ferrique de l'extrait PHSME est indique un pouvoir Potentiel de réduction dépendant de la dose. ces résultats on accord avec les étude de (Zhang & Wang Zhe-zhi .,2009) qui Montre La puissance réductrice des échantillons était proportionnelle Aux concentrations utilisées. Ils sont similaires À la concentration de 0,01 mg / mL et Divergeait avec l'augmentation de la concentration de réaction 0,5 mg / mL, et les extraits de *P. megalantha* se sont révélés meilleurs Réducteurs radicaux que les extraits de *P. umbrosa* Dans ce système, suggérant qu'ils ont une électronisation forte Capacités. Cependant, ils sont encore légèrement moins Efficace que BHT, et En ce qui concerne les cinq purs Composés phénoliques, protocatechiques , chlorogènes, rosmariniques L'acide et la rutine sont remarquablement puissants en faisant don Des électrons aux radicaux libres réactifs, en les transformant en Des espèces non réactives plus stables et terminant La réaction en chaîne des radicaux libres, Les résultats ont bien corroboré avec le Test DPPH et aussi en accord avec (Meir et al., 1995. Santiago et al., 2013), qui montre que L'extrait d'acétate d'éthyle de *T. asiatica* a son potentiel antioxydant Activité par test pouvoir réducteur et cette activité et dose dépendent.

D'après les résultats l'PHSME possède un pouvoir réducteur inférieur à celle du Vit C. Les résultats de ce travail sont relativement en accord avec d'autres études qui ont montré que le pouvoir réducteur varie d'une plante médicinale à une autre (Savoie et al., 2008 ; Sridevi et al., 2013).

Puis, Piégeage du radical hydroxyle d'extrait PHSME et Vit c.

Le radical hydroxyle est le plus connu par sa réactivité, sur les bio-macromolécules des cellules vivantes et ces dommages biologiques caractérisés par sa capacité à stimuler la peroxydation des lipides, qui se produisent lors de l'attaque des phospholipides membranaires (Valko et al., 2007). Notre extrait étudié à la concentration de 200 mg/ml a montré une plus grande activité de piégeage des radicaux hydroxyles. Lorsque l'on compare nos résultats avec ces études (Miller, 1990 et Iliskovic, 1998) on peut démontrer que notre plante peut être considérée comme un bon piègeur de radical hydroxyle.

L'activité de balayage de H₂O₂ a été détectée et comparée à l'acide ascorbique, le peroxyde d'hydrogène est un agent oxydant faible et peut inactiver quelques enzymes directement habituellement par oxydation du groupe thiol (-SH), qui la sépare rapidement de la membrane cellulaire, et une fois la H₂O₂ à l'intérieur de la cellule. Il peut probablement réagir avec les Fe⁺² et éventuellement des Cu⁺² ions pour former un radical hydroxylique et cela peut être l'origine de plusieurs de ses effets toxiques (Bhatia et al., 2011)

Effet de PHSME sur la viabilité cellulaire

La prolifération cellulaire a été évaluée en utilisant un dosage de MTT, après incubation avec PHSME pendant 48h, 72h aux concentrations de 4,5 à 45 mg / mL.

Notre dosage in vitro a montré que l'extrait à base d'herbes présente d'importants effets anti-prolifératifs entre 56 et 71% d'inhibition à la concentration la plus élevée (45 mg / mL), sur les lignes cellulaires cancéreuses MDA, HepG2., c'est la première expérience en termes d'influence de PHSME sur les cellules cancéreuses, ce qui est encourageant pour vérifier d'autres effets et mécanismes impliqués. Ses résultats sont en accord avec plusieurs expériences à base d'extrait des plantes.

Phényl propanoïde acide caféique, alcool phényléthylique et Glycosides de phényléthylalcool isolés de *Phlomis armeniaca* ont une activité cytotoxique contre plusieurs types de cellules cancéreuses. Cependant, ils n'ont pas affecté la croissance et la viabilité de Hépatocytes primaires cultivés de rat (Saracoglu et al., 1995). Verbascoside, isoverbascoside, Forsythoside B et 3- Ester méthylique d'acide O-cafféoylquinique isolé de *Phlomis Brunneogaleata* a montré une activité cytotoxique contre les lignées cellulaires L6 (Kirmizibekmez et al., 2004).

L'extrait hydroalcoolique de propolis rouge brésilien a inhibé la croissance des cellules cancéreuses d'hépatite 2 (HepG2) selon les résultats de la cytométrie en flux qui ont indiqué des effets partiellement médiés par la mort cellulaire programmée confirmée par l'externalisation de la phosphatidylsérine, l'analyse de clivage de l'ADN, l'augmentation de la phase SUB G1-G0 dans l'analyse du cycle cellulaire et la perte de potentiel membranaire mitochondrial (Olivier da Silva et al., 2017).

Une autre étude a montré que le triterpénoïde, d'extrait éthanolique des graines d'avocat (*Persea americana*), a une activité cytotoxique avec une très faible valeur IC50 12.03 µg/mL (Andi Nur Fitriani., 2017).

Les L'huile essentielle de la plante *Elsholtzia ciliata* a prouvé une activité antiproliférative sur trois lignées cellulaires cancéreuses (glioblastome humain (U87), cancer pancréatique (Panc-1) et cancer du sein triple négatif (MDA-MB 231) in vitro. Les valeurs EC50 de l'huile essentielle contre ces cellules se situaient dans la plage de 0,017-0,021% et la viabilité des cellules MDA-MB231 (jusqu'à 76,4%) à la concentration la plus élevée de 10 mg / mL (Lauryna Rudziulyte et al., 2017).

Effet de PHSME sur l'apoptose

Les cellules HepG2, MDA ont été traitées avec PHSME (45 mg / ml) pendant 48 h pour étudier l'apoptose avec coloration à l'annexine V-FTTC (FL1) et l'iodure de propidium. 20% à 36% des cellules sont positives pour l'annexine V-FTTC (FL1) et l'IP dans le contrôle non traité. Les cellules traitées par PHSME présentent une augmentation marquée de l'apoptose.

Selon les différentes références publiées aucune étude n'a souligné les effets proapoptotiques de la plante *Phlomis*, par contre d'autres études ont démontré que l'extrait Sho-saiko a induit l'apoptose des cellules HL60 par deux ingrédients actifs.

Le wogon et des extraits de réglisse, pourrait agir comme un prooxydant provoquant ainsi Apoptose des cellules HL60. le Baicalein et l'acide glycyrrhétinique, Augmentent la concentration intracellulaires des espèces réactif d'oxygène dans les cellules HL60 .

les composants de Sho-saiko, baicalein (Un flavonoïde) et Acide glycyrrhetic. Ces principaux constituants, a induit une apoptose et a stimulé La génération d'espèces réactives d'oxygène dans les cellules traité. il été expliquer que le Baicalein, agit comme un antioxydant typique, mais Réduit les métaux de transition par action de groupes phénoliques, Entraînant une réduction supplémentaire de la molécule d'oxygène pour former Radical superoxyde (Yoshino et al., 1999). Peroxyde d'hydrogène Et un autre radical hydroxyle peut être formé à partir de superoxyde radical, le piègeur d'espèces réactives d'oxygène, Suggère un rôle important des espèces réactives d'oxygène dans L'induction de l'apoptose des cellules HL60 (Toshiko Makino., 2006).

les flavonoïdes comme la génistéine et la quercétine, ainsi que pour les mélanges flavonoïdiques ont une capacité d'une part d'altérer l'expression de quelques gènes spécifiques, qui peuvent promouvoir la carcinogénèse par leur deméthylation à des concentrations faibles, et d'autre part d'inhiber potentiellement les processus cancérogènes, par activation de la cascade pro-apoptotique à des concentrations élevées (King-Batoon et al., 2008 ; El Touny et Banerjee, 2009).

Effet d'extrait PHSME sur le cycle cellulaire

L'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses a été démontrée comme une stratégie efficace pour la thérapie du cancer (Du & Ho.,2001) (Ishiko , 2001). Une variété de stimuli sont connus pour pouvoir déclencher l'apoptose dans les cellules cancéreuses, ce qui inclut l'irradiation (Bishay ,2001 ;Naumann .,2001), Choc thermique (Kondo ,2000 ; Feng, 2001) , oxyde nitrique (Vouldoukis ,2000) Cependant, la plupart de ces stimuli sont souvent confrontés au problème de la spécificité médiocre, puisque les cellules normales sont également endommagées. Par conséquent, il a rendu ce traitement moins approprié pour une utilisation clinique. Trouver un médicament potentiel induisant l'apoptose avec une spécificité élevée pour les cellules cancéreuses devient l'objet de la recherche sur le cancer connexe.

Les médicaments chimiothérapeutiques sont connus pour induire une cytotoxicité dans les cellules tumorales à travers divers mécanismes, dans lesquels les événements de signalisation jouent un rôle important en fonction du type de cellule et des stimuli (Tian et al., 2006) il est nécessaire de trouver de nouveaux médicaments anticancéreux qui peuvent tuer des cellules cancéreuses avec Toxicité minimale, l'effet cytostatique des extraits de plantes entières sur les cellules cancéreuses est souvent bien meilleur que l'effet de leurs composés biologiquement actifs (Yano et al., 1994).

Les anthracyclines induisent des perturbations au niveau du cycle cellulaire. Chaque phase du cycle est associée à au moins un point de contrôle (*checkpoint*) qui autorise ou non le passage à la phase suivante. Le cycle cellulaire, d'une durée approximative de 24 heures (entre 10 et 40 heures), est une succession de phases de repos et de synthèse d'ADN. Toutes les étapes de la division cellulaire nécessitent des synthèses protéiques et donc l'activation de leur transcription au niveau de l'ADN. Un certain nombre de régulation sont dues à deux types de molécules : les cyclines et les *cyclin dependent kinases* d'une part, et d'autre part les facteurs de transcription (Albert et al., 1995)..

Entre les différentes étapes du cycle cellulaire se situent des points de contrôle qui ont pour but de vérifier l'intégrité de la transmission de l'ADN de la cellule mère vers les cellules filles. De par leur position stratégique, les arrêts en *OIS* et *OzIM* sont les mieux connus. Selon les rapports récents, l'utilisation d'extraits végétaux est très Efficace en thérapie anticancéreuse, en raison de la complémentarité ou Effet synergique de composés particuliers de l'extrait (Li Et al., 2000). L'effet cytostatique des extraits végétaux entiers Sur les cellules cancéreuses est souvent beaucoup mieux que l'effet de leur composés biologiquement actifs particuliers (Yano et al., 1994; Vickers, 2002). De ce point de vue, il est important d'Étudier le mécanisme des effets anticancéreux d' Extrait **PHSME** .

Il n'y a pas eu d'enquête sur l'effet d' Extraits *Phlomis samia* sur la survie, l'indice mitotique, L'induction d'apoptose ou le cycle cellulaire de cellules saines et cancéreuses.

La diminution du nombre cellulaires pour les deux lignées cancéreuses étudiées suite à leur traitement par 450 µg/ml d'extrait pourrait être due soit à l'effet toxique, où les cellules éclatent et meurent par nécrose, ou à l'effet apoptotique où l'PHSME active la machinerie cellulaire responsable du déclenchement de l'apoptose. Afin d'éclaircir la nature de l'effet de l'PHSME sur les lignées cancéreuses étudiées, une analyse de leur cycle cellulaire par cytométrie en flux a été réalisée. Les cellules sont analysées individuellement en utilisant un agent fluorochrome qui permet de quantifier leur teneur en

ADN (l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN de chaque cellule). Toutefois, la cytométrie en flux ne permet pas de distinguer entre les phases G0 et G1, ni entre la phase G2 et la phase M. Donc, cette technique permet de diviser le cycle cellulaire en trois phases selon la teneur des cellules en ADN: i) La phase G0/G1, c'est la phase d'activation de la cellule où la quantité d'ADN =2n. ii) La phase S, c'est la phase de synthèse d'ADN où sa quantité passe de 2n à 4n. iii) La phase G2/M, c'est la phase de mitose ou de division cellulaire où la quantité d'ADN =4n. Par conséquent, Cette technique détecte également les cellules dont la quantité d'ADN est inférieure à 2n ou les cellules en phase sous-G1. Ces cellules correspondent aux cellules apoptotiques ou à leurs débris. En outre, les cellules à quantité d'ADN supérieure à 4n peuvent être détectées en fin de diagramme (cellules polyploïdes) et sont généralement les cellules cancéreuses qui présentent ce type d'aberration génétique (Givan, 2011).

d'après nos résultats L'analyse du cycle cellulaire après le traitement de HepG2, les cellules MDA avec PHSME a prouvé que, le pourcentage de SG1 phase a augmenté, le pourcentage des cellules à G1, S M a diminué. L'extrait PHSME a entraîné une progression importante du cycle cellulaire dans la phase SG1.

Notre résultats sont pareil avec Les résultats de (Agnieszka Majewska et al.,2006) l'expérience a révélée les différents Effets des concentrations faibles et élevées de l'extrait de *Rhodiola Rosea* sur la survie des cellules HL-60 , L'indice de la prophase, et sa spécificité vis-à-vis du cycle cellulaire. Des concentrations plus faibles de se extrait (45 et 90 g / ml) A causé une élimination beaucoup plus faible des cellules à la phase G2 / M Du cycle cellulaire, et une accumulation plus élevée de cellules à la Profase après 6 h d'incubation. Cependant, après 12 h, une Diminution marquée de l'indice de prophase, liée à la Réduction de l'indice mitotique et l'apparition simultanée d'une grande quantité de cellules dans l'apoptose, a été observé. Cela suggère que le traitement avec des concentrations inférieures arrêtent les cellules à la phase M et / ou à la frontière De la phase G2 / M, et rentrer dans l'apoptose.

Une autre étude de Subramanian kaviarasan et al .,2006 a montré que l'Extrait polyphénolique des graines de fenugrec (FPET) a fortement inhibé la viabilité des Cellules humaines du foie Chang (NCCS, Pune) Et cela a été une conséquence de l'induction de l'apoptose Comme déterminé par cytométrie de flux. ce traitement a provoqué

l'accumulation de cellules dans le pic Sub-G1, qui est la caractéristique De l'apoptose (Wu et Cederbaum, 1999).

D'autre extrait de pomme de terre, y compris les acides phénoliques Et les anthocyanines. Induit une apoptose dans les LNCaP et PC-3 cellules;. Voies de mort cellulaires induites par l'extrait de pomme de terre sont associer à activer la protéine kinase par des mitogènes Et l'activation kinase N-terminale, et ces kinases activées L'Apoptose indépendante de caspase (Lavanya Reddivari et al.,2007).

Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes, dérivés des plantes médicinales ou de l'alimentation, activent l'apoptose au niveau des différentes lignées cancéreuses via l'activation des caspases, notamment la caspase-3 suivie du clivage du PARP (Hu et al., 2009).

Plusieurs travaux ont également indiqué que les polyphénols dérivés des plantes médicinales, principalement les flavonoïdes, exercent un effet protecteur chez les êtres humains contre plusieurs pathologies dégénératives comme le cancer (Marino et al., 2011). En effet, il a été suggéré que les effets protecteurs des flavonoïdes d'origine alimentaires contre le cancer sont basés sur leur capacité d'empêcher l'insurrection de micro-tumeurs et/ou d'activer directement l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Surh, 2003). Il a été montré que la quercétine et la naringénine possèdent une forte activité pro-apoptotique contre certaines lignées de cellules cancéreuses (Galluzzo et al., 2009).

Il Est bien connu que les polyphénols dérivés de plantes induisent leur cytotoxicité aux cellules tumorales par des mécanismes médiés par ROS ,Aussi Leurs propriétés antioxydants et antiprolifératives légères(Yammamoto et al., 2003), Nos résultat ont démontrer que l'extrait de Ph samia est riche en polyphénoles et flavonoïdes, qui peut être augmentent les ROS intracellulaires qui participent à un ensemble de réponses qui conduisent à l'apoptose dans les lignées cellulaires HepG2, MDA .

L'acide chlorogénique (CGA) est l'un des polyphénols les plus abondants d'extrait PHSME . Il a été révélé que CGA était capable d'inhiber la prolifération inflammatoire des cellules RSC-364 médiée par l'IL-6 en induisant l'apoptose. CGA était également capable de supprimer l'expression des molécules clés dans les voies de signalisation JAK / STAT et NF- κ B, et d'inhiber l'activation de ces voies de signalisation dans la réponse inflammatoire médiée par IL-6 (lou & zhou et al., 2016), diminué la prolifération cellulaire et réduise l'expression de BCL2 des cellules cancéreuses pulmonaires humaines A549 (Yamagata et al., 2018)

Aussi L'acide férulique a inhibé significativement la croissance cellulaire des cellules HepG2 d'une manière dépendante de la dose et ces cellules présentent des caractéristiques d'apoptose par une augmentation des dommages nucléaires et Fragmentation de l'ADN. il ont également observé que l'acide férulique a causé une génération en excès d'espèces réactives d'oxygène (Prabhakar et al., 2015)

L'effet de l'extrait de *Phlomis samia* souligne qu'il pourrait Être utilisé avec d'autres cytostatiques pour améliorer leurs Effets ,et réduire la toxicité dans la thérapie complémentaire du cancer.

Evaluation du statut oxydatif au sein du tissu cardiaque

D'après les résultats in vitro précédentes, nous pouvons dire que : L'extrait donne une bonne activité antioxydante soit une capacité de piégeage des radicaux libres et la réduction de fer est un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et un puissant pouvoir réducteur. Nous a encouragés à évaluer cette dernière in vivo sur les rats comme deuxième étape. En effet, des analyses portant l'évaluation du statut oxydatif au sien du tissu cardiaque ont été réalisées.

Tout d'abord, nous avons commencés par les bio marqueurs CPK, LDH, ALT et AST étaient Significativement élevé 72 h après l'injection de DOXO 15 mg/kg par rapport à ces niveaux chez les rats témoins .L'administration de la doxorubicine a provoqué une augmentation des marqueurs biochimique de la fonction du cœur par induction du stress oxydant qui provoque des lésions cardiaques comme l'infarctus cardiaque (Iarussi et al ., 2001).

L'augmentation de l'activité des enzymes hépatiques dans le sang peut être due pratiquement à des lésions tissulaires dans le foie, les reins et le cœur ou en raison de modifications de la perméabilité de la membrane cellulaire ou également une augmentation de la synthèse ou une diminution du catabolisme des aminotransférases (Frag et al., 2010).

En outre, l'ASAT, L'ALAT, La LDH et La CPK sont les biomarqueurs les plus sensibles, directement impliqués dans l'étendue des dommages cellulaires et de la toxicité, car ils sont cytoplasmiques et libérés dans la circulation après l'atteinte cellulaire (Soudani et al., 2011a) .

D'après Kaczor et al. (2005), les niveaux élevés de la LDH dans le plasma peuvent être attribués à une augmentation généralisée de la perméabilité membranaire, cela est dû à l'hépatotoxicité induite par la Doxorébutine. Même les cellules nécrosées déversent leurs contenus cytosolique qui conduit à la fuite des enzymes des cellules, donc à la diminution des taux d'ALT et d'AST à l'intérieure des cellules et à l'augmentation de ces taux dans le sérum. La mesure de l'activité enzymatique (CPK, LDH et les transaminases) peut être un indicateur de lésions cardiaque (Walker DB, 2006).

D'après notre étude, le groupe traité par DOXO a confirmé une atteinte significatives cardiaque Par contre, le groupe préventif a révélé une diminution significative des taux sérique (ASAT et ALAT).

L'effet temporisant de l'extrait PHSME sur la toxicité de DOXO a régularisé les taux des biomarqueurs biochimiques et a permis de rétablir les activité normales de ces enzymes, notre recherche et comparable a celles présenté par :

L'étude d'Andreadou et al 2007 qui a induit une cardiotoxicité avec la dose 20 mg /kg (Xuwan, 2002).

AL-MAJED et al., 2002 a confirmée que DOXO en une seule dose de 15 mg kg-1 (I.p.) induit une cardiotoxicité manifestée biochimiquement par Une augmentation significative de la CPK sérique et de la LDH après 48 h. Ces résultats sont en accord avec expérience antérieure de (Nagi & Mansour, 2000) .

Le prétraitement des rats par l'extrait méthanolique de *P.samia* fait diminuer le taux de CPK et LDH Et a assurer la protection de l'intégrité cellulaire cardiaque contre les lésions provoquées par la doxorubucine.

Nous pouvons déduire que nos résultats corroborant avec d'autre études telles que les traitements suivants :

En 2002 AL-MAJED A A et al : l'Administration de ALPHA-LIPOIC ACID (LA)100 mg /kg par voie orale pendant 5 jours a créer une protection importante contre la cardiotoxicité induite Par DOX ; L'amélioration de la cardiotoxicité était évidente par des réductions significatives de la CPK sérique et LDH.

En 2010 Elberry et al : Le traitement par Cranberry [*Vaccinium macrocarpon*] 100 mg/kg/day, p.o., pendant 10 jours a amélioré le élévation de LDH, CK-MB et troponine-1 Niveaux sériques - induite par DOX et inversé l'ECG changements .

En 2012 Palani S et al : Le traitement avec l'extrait éthanolique de *Flacourtia indica* 250 mg / kg et 500 mg /Kg pendant 14 jours. améliore les Défense antioxydante cardiaque des tissus et empêché Altération des paramètres du profil lipidique, tels que LDL, TAG et TC, ainsi que les enzymes sériques, Tels que ASAT, ALAT, CPK et LDH.

les meme resultats en 2013 Uma Mahesh B et al : Le traitement par extrait *Boswellia ovalifoliolata* l'extrait éthanolique (BO) 250 et 400 mg / kg, p.o., Pendant neuf jours a augmenté le Activité antioxydante dans le tissu cardiaque, Les changements d'ECG inversés provoqués par DOXO et La réduction des taux sériques de ALT, AST, LDH et CK- MB.

Plusieurs mécanismes ont été suggérés pour la cardiotoxicité induite par DOXO, Tels que le stress oxydatif, dues au niveaux accrus Des radicaux libres (ROS), Fer intracellulaire (Myers, 1998 ; Ghibu, 2012) et une diminution des taux d'antioxydants comme exemple le Glutathion (GSH) (Troyano, 2001).

Ce stress oxydatif augmente les niveaux du Calcium intracellulaire (Troyano, 2001), et accélère la peroxydation lipidique Qui endommage la membrane cellulaire et d'autres composants cellulaires (Mimnaugh, 1985).

Peut également induire une cardiotoxicité en modifiant le métabolisme des lipides. Abdel-aleem et al. A suggéré que la cardiotoxicité DOX Peut s'expliquer en partie, par l'inhibition de l'oxydation des acides gras cardiaques, Causant un déséquilibre énergétique et une insuffisance cardiaque congestive (Abdel-aleem, 1997).

D'autre études ont prouvés que le traitement au DOXO augmente le taux totale du total du cholestérol (TC) plasmatique , les triglycérides (TAG) et les lipoprotéines de basse densité (LDL), ce qui confirme que DOXO peut interférer avec le Biosynthèse (activation de l'adénosine monophosphatase cyclique) (Minotti, 1996) Ou l'absorption de lipides (inhibant la lipoprotéine lipase) (Thayer, 1985) .

Les lipides membranaires sont riches en acides gras poly-insaturés, principalement l'acide arachidonique et l'acide linoléique, qui sont la cible privilégiée des radicaux libres (Sharififar et al., 2008).

Le radical libre est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, former un radical diène conjugué, oxydé par la suite en radical peroxyde (Favier, 2003).

Cette réaction est appelée peroxydation lipidique, elle forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer et al., 1992).

Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution: soit être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane) qui sont éliminés par voie pulmonaire à cause de leur volatilité (Favier, 2003).

Après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, le radical peroxyde peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonenal (Ahmad, 1995).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. L'attaque des lipides circulants aboutisse à l'oxydation des LDL (lipoprotéines de densité légère) captées par des macrophages en formant le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Peynet et al., 2005; Ramel et al., 2004).

L'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et ainsi le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Favier, 2003).

La capacité antioxydante des plantes est principalement due à leur richesse en composés phénoliques, capables à donner des atomes d'hydrogènes pour inhiber la peroxydation lipidique (Amic et al., 2003). La présence et le nombre de groupements OH libres sont des facteurs déterminants de l'activité antioxydante des polyphénols (Sharififar et al., 2008).

D'après nos résultats, l'augmentation du taux de MDA est significative concernant les rats traités par une seule dose 15 mg/kg du doxorubicine. Ce qui induit l'élévation de la peroxydation lipidique.

après l'administration précoce de l'PHSME nous avons enregistré une diminution significative du taux de MDA, ces résultats prouvent l'effet préventif de l'extrait sur la peroxydation lipidiques par sa propriété anti radicalaire et captation des radicaux libres d'autres études sont pareils a nos résultats : un traitement par (*Allio staviu*m) 250 et 500 mg / kg pour 30 jours a effectivement empêché L'augmentation d'acide thiobarbiturique Substances réactives (TBARS) et diminué le statu Antioxydant endogène due a une dose unique de DOXO (30 mg/kg) (Mukherjee et al., 2003), aussi le Traitement avec *Calligonum comosum* et *Cordia* 100 mg/kg(p.o) pendant 10 jours a augmenté le taux de GSH cardiaque et a réduit des taux sériques de MDA (Ashour et al., 2012).

Le stress oxydant dans les cellules ou les tissus se réfère à renforcer la production d'espèces réactives de l'oxygène et/ou la déplétion dans le système de défense antioxydante. Les ROS générés dans les tissus sont efficacement piégés par le système enzymatique antioxydant comme la GPx et la GR, ainsi que les antioxydants non enzymatiques comme le GSH, la vitamine A, C et E (Schlorff et al., 1999). Le glutathion est le plus abondant thiol de basse masse moléculaire, il agit comme un antioxydant physiologique de protection dans des systèmes biologiques (Fatima et Mahmood, 2007). De même, le GSH est un élément crucial du mécanisme de défense antioxydante (Sathishsekar, 2005), fonctionne comme un capteur de radicaux libres réactifs direct (Romão et al., 2006). La déplétion du GSH cardiaque est souvent associée à la cardiotoxicité de la DOXO (Vergely, 2007). Cela est pareil aux résultats de nos recherches dans laquelle on a observé une chute significative du GSH cardiaque chez les animaux traités par la doxorubicine. Cette baisse est certainement due à l'action toxique des métabolites toxiques réactifs de la DOXO qui sont neutralisé par le GSH provoquant son diminution (Li, 2007).

Par contre, l'administration de l'extrait méthanolique PHSME a augmenté le taux de glutathion réduit (GSH) dans le groupe préventif par rapport au lot groupe traité par la DOXO. Ceci démontre le pouvoir protecteur anti radicalaire de l'extrait qui sont capable d'empêcher la chute du GSH et stimulant sa régénération.

les résultats de cela sont pareil a ceux obtenus dans l'étude de l'activité cardioprotecteur de Abdel-wahab, 2003.

Le traitement par Extrait de feuilles d'olives [*Olea Europaea*] 6 et 12 mL / L , en Eau potable, pour 12 journées a augmenté les niveaux de GSH cardiaque (Kumral et al., 2015) aussi un traitement par Cranberry 100 mg / kg / jour pour 10 jours consécutifs a amélioré le élévation des Niveaux sériques LDH, CK-MB et troponine-1 et inversé l'ECG changements induite par DOX. Cela a empêché la réduction de la maladie cardiaque et les Niveaux tissulaires de GSH, CAT, SOD, glutathion réductase (GR) et la glutathion peroxydase (GPX) (Elberry et al., 2010)

Nos résultats suggèrent que l'extrait Methanolique de *Phlomis samia* a pu soit : augmenter la biosynthèse du glutathion , réduire le stress oxydatif conduisant à une baisse de sa dégradation ou bien en influençant sur les deux mécanismes en même temps (Sathishsek & Subramanian, 2005). D'autre part, les composés polyphénoliques sont connus par leurs capacités de recycler la vitamine E et de piéger les radicaux libres cela peut donc participer directement dans la réduction de l'utilisation du GSH (Babu et al., 2006). L'augmentation de la concentration du GSH dans le cœur chez les rats traités par la plante pourrait être un facteur responsable de la réduction de la concentration du MDA dans ces tissus (Pari & Latha, 2005).

La cardiotoxicité est depuis longtemps reconnue comme une complication de la chimiothérapie du cancer avec doxorubicine. Il y a Plusieurs hypothèses pour expliquer la cardiotoxicité par la doxorubicine. Parmi celles ci, l'hypothèse des radicaux libres est la plus complète A étudié.

La doxorubicine subit une réduction d'un électron Par une activation métabolique provoquée par le NADPH-cytochrome- P-450 réductase ou d'autres enzymes contenant de la flavine (Bachur et al., 1978) Cette réduction génère un radical libre de doxorubicine et semiquinone. dans La présence d'oxygène moléculaire, la semiquinone rapidement Réduit l'oxygène au superoxyde avec une régénération intacte Doxorubicine. Le superoxyde est rapidement transformé en peroxyde d'hydrogène Spontanément ou par la superoxyde dismutase. La doxorubicine semiquinone peut alors réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour Donner un radical hydroxyle (Kalyanaraman et al., 1984). Cette espèce réactive d'oxygène est hautement toxique. Cet espèces réagissent avec des molécules cellulaires y

compris les acides nucléiques, Des protéines et des lipides ce qui provoque des dommages cellulaires.

cette hypothèse de radicaux libres a été obtenue a partir d'études in vitro comprenant des rapports selon lesquels:

1) doxorubicine Augmente la peroxydation lipidique et la production de radicaux libres dans Tissu cardiaque (Olson, 1981).

2) des piègeurs de radicaux libres tels que la N-acétylcystéine (Powell & McCay, 1988), la vitamine E , la superoxyde dismutase (Hida, 1995) et La catalase sont gravement diminués lors de l'oxydation induite par la doxorubicine.

3) les recherches in vitro sur des cellules cardiaques cultivées ont montré que la suppression des activités des systèmes antioxydantes augmente la Toxicité de la doxorubicine. Cependant, Des résultats contradictoires ont été rapportés que les chasseurs de radicaux libres ont échoué de prévenir la Cardiotoxicité cumulée de doxorubicine (.James Kang et al., 1996).

Car la Doxorébuclin est connu pour provoquer un stress oxydant dans les cellules , plusieurs paramètres indiquant le statut antioxydant ont également été examinés a savoir que : Le stress oxydant dans la cellule peut être induit soit par une production accrue de ROS ou l'inhibition du système de défense antioxydant. Cet équilibre entre la production et le catabolisme des oxydants est essentiel pour le maintien de l'intégrité biologique des tissus (Fatima et Mahmood, 2007).

Les enzymes antioxydantes (SOD, GPx, GSTet CAT) limitent les effets des molécules oxydantes dans les tissus , jouent un rôle dans la défense contre les dommages oxydatifs cellulaires étant piègeurs de radicaux libres (Gutteridge, 1995).

La glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la catalase constituent mutuellement une équipe de soutien de défense contre les ROS (Ahmed et al., 2008 ; Soudani et al. , 2011b).

De petites déviations dans les concentrations physiologiques pourraient avoir des effets considérables sur la résistance des lipides cellulaires, des protéines et de l'ADN aux dommages oxydatifs (Bagchi et al., 2002).

Nos résultats ont désignent une diminution de l'activité de la GST et la CAT cardiaque chez les rats traités par le Doxorébuclin (15 mg/kg). cette diminution de l'activité

des enzymes antioxydantes ont été signalées dans différents tissus (Elberry A A et al ., 2010 ; Nair CK et al .,2014 ; Khan G et al ., 2014).

Étant donné que les enzymes citées ci-dessus ont un rôle protecteur contre les dommages induits par les radicaux libres, leur induction pourrait être comprise comme une réponse adaptative au stress oxydant (Soudani et al., 2011a). La diminution dans les activités de la GST et la CAT chez les rats traités par le Doxo suivant notre étude peut être due à l'accumulation intracellulaire des ROS(la même explication a été donnée par Kalayarasan et al. (2008). Selon Pigeolet et al. (1990).

La diminution de l'activité enzymatique de la catalase peut être due a une augmentation massive de H₂O₂ ce qui augmente le stress oxydant au niveau cardiaque.

Par contre une augmentation significative d'activité de catalase et de GST a été remarquée chez les rats du groupe prétraité par PHSME.

L'augmentation d'activité de ces enzymes indique le pouvoir protecteur antiradicalaire fourni par des extraits végétales , cela a été décrit auparavant par plusieurs études (Yilmaz et al.,2006; Singh et al., 2008 ; Patel et al., 2011).

Nos constatations sont similaire avec plusieurs d'autres études : celle publiée par Nair et al., (2014) qui a constaté que le traitement par des Caroténoïdes a 50 et 100 mg / kg, démontré une Cardioprotection en empêchant des Dommage peroxydatif dans les lipides membranaires par Augmentation d'activité de SOD, CAT et GST.

De même, une autre étude de Zarei. et al (2013) a démontré que par traitement d'extrait des racines de *Hemidesmus indicus* 50-100 mg / kg pendant 14 journées a provoqué la normalisation des Marqueurs d'enzymes sériques, y compris LDH, CPK, AST, Et ALT et également amélioré le système antioxydant dans le tissu cardiaque en augmentant la SOD, CAT et GST.

De même La catéchine a pus réduire la cardiotoxicité avec petite dose , ses Activités Antioxydants peux être attribué à ces capacité de Chélation de fer (Osman Kozlucaet al .,1996).

Les différentes analyses histopathologiques ont été effectuées afin de confirmer si l'administration de la doxorubicine en une dose 15 mg/kg unique a induit les différents

changements normalement observés lors du développement d'une cardiotoxicité et si l'extrait apparaisse être un agent protecteur efficace contre la cardiomyopathie.

Chez les rats du groupe DOXO nous avons remarqué des dommages tissulaires, principalement par la présence d'une dystrophie musculaire (DS), et une lyse des fibres musculaires cardiaques (LFMC). Ces dommages morphologiques montrent une anomalie au niveau de la structure des cellules myocardiques .

Par contre le lot prétraité par l'PHSME relate une diminution remarquable des lésions éminentes chez les rats traités par la DOXO seule.

Le prétraitement protège de manière significative Le myocarde issu de la toxicité induite par la DOXO ceci est similaire a plusieurs travaux (Saad, 2001; Santos et al., 2002).

Barman et al., 2013 ont trouvés que Examen histopathologique de différentes sections cardiaques A révélé que la doxorubicine a causé une anomalie histologique (Changements dans le tissu cardiaque), Cependant, le traitement par extrait hydro ethanolique de *Urtica parviflora* A empêché les changements et a maintenu la structure histologique Presque semblable à celui du contrôle normal.

Dans une Autre experience de Vikas S. Warpe et al.,(2015) L'administration de doxorubicine a montré une hyperémie (++), infiltration cellulaire (+++) et la nécrose (+++) qui signifie que l'hyperémie S'est produite dans 25% du zone du coeur du rat, une infiltration cellulaire Et une nécrose s'est produite dans une zone de coeur de 75 a 100%,Ces Infiltration et nécrose dans de grandes zones du cœur est confirmées la Cardiotoxicité chez le rat, aussi Les résultats de l'analyse histopathologique ont donc indiqué que le coeur des rat a été partiellement protégé par un prétraitement avec ellagic acid (200 mg / kg) aussi un prétraitement à 20 et 40 mg / kg avec de tannic acid a presque conservé le Architecture normale du myocarde (Jianping Zhanga et al .,2017).

les flavonoïdes avec les groupes OH À 3',4'-position dans le b-ring, et une double liaison entre C-2 et C-3 a marquer un rôle important pour leurs effets protecteurs contre Cardiotoxicité induite par DOXO.

Dans l'ensemble, l'agent le plus efficace : le luteolin, Le 7-O-b-D glucopyranoside qui a montré un effet cardioprotectif par Inhibition des niveaux intracellulaire des ROS et [Ca²⁺] induit par le DOXO (Shu-Qi Wang et al .,2010) .

Selon la littérature. Beaucoup d'extraits ont un double mécanisme d'action cardioprotective, tel que l'Activités antioxydantes et antiapoptotiques,

Certains extraits phytochimiques ont reçu plus d'attention par les chercheurs que d'autres, comme l'extrait garlic, le resvératrol, l'extrait de safran, Et l'extrait de Ginkgo biloba.

Parmi les Mécanismes cardioprotecteurs des extrait phytochimiques on cite :

1. Amélioration du profil lipidique plasmatique et la réduction des niveaux de TAG Et LDL): Barman et al. A constaté que l'extrait de *Urtica Parviflora* Feuilles (400 mg / kg par jour pendant 3 semaines) fait diminuer significativement le taux plasmatique de TAG et LDL chez les rats traité par la DOX (Barman et al., 2013), des résultats Similaires ont été signalés avec les extraits chimiques de *Flacourtia Indica* (Palani et al., 2012), *Curcuma longa* (Mohamad et al., 2009) et lipistat polyherbal Combinaison (Koti et al.,2009).

2. la Modification de l'expression des gènes: Choi et al. A constaté que le prétraitement des Cellules du muscle cardiaque H9c2 exposées au DOXO avec l'extrait *Schisandra fructus* (SFE) a une concentration de 1500 ug/mL a induit l'expression de Glutathion S-transférase (GST) enzyme.dans ces cellules, a régler l'expression des gènes impliqué dans Le métabolisme du glutathion et sa désintoxication (Choi et al., 2008).

Arafa et al, a rapporté que le traitement par le resvératrol chez des souris injectées par DOXO avec 20 mg / kg, a amélioré L'expression du gène du TGF-B1 (Arafa et al., 2014).

3. Modulation du calcium intracellulaire et amélioration de la Fonction contractile ventriculaire gauche (LV): Liu et al. A constaté que Traitement de souris intoxiquées par DOX tous les jours avec 100 mg / kg de saponines [Extrait de *Panax notoginseng*] pendant 5 jours a amélioré la Contraction de muscle LV par la régulation de l'afflux de Ca^{+2} dans la cellule du myocarde (Liu et al., 2008).

des résultats Similaire ont été signalés pour les saponines au bas Dosages (10-40 mg / kg) par Wang et al.,(2015). Chez des Patients qui présente un cancer du sein, Yi et al, a constaté que l'ajout d'extrait de *Ginkgo biloba* (EGB 761) à DOX amélioré le diamètre systolique ventriculaire gauche (LVSD), Diamètre diastolique du ventricule gauche (LVDD), Vitesse d'écoulement (E / A) et fractionnaire Raccourcissement (FS) (Yi et al.,2008).

Periplogenine, un extrait de *A. marmelos*, A montré une action similaire à celle du glycoside sur des rats Wister albinos intoxiqué par DOX a augmenté les niveaux intracellulaires de Ca^{+2} et amélioré la Contractilité myocardique (Panda et al.,2009). D'autres extraits végétaux et produits phytochimiques Comprennent EGB-761 (Agha et al.,2001), *Berberis vulgaris* (Lv X et al.,2012), *Rhodiola rosea* (Salidroside) (Zhang H et al.,2012), *Ixora coccinea* (Momin et al,2011) et *Vaccinium myrtillus* (Ashour et al.,2011). ont démontré l'inversion des changements d'ECG induit par le DOXO.

4. L'extrait de *Berberis vulgaris* (à 50-200 mg / kg / jour) a été Prouvé pour améliorer la cardiotoxicité DOXO en limitant son Transformation en doxorubicinol (un métabolite actif) dans Le cytoplasme des cellules cardiaques de rat (Hao et al.,2015).

Les résultats positifs prouvés par notre extrait PHSME sur l'effet cardioprotecteur dans la cardiotoxicité induite par la doxorubicine. suggère une utilité possible d'PHSME en tant que agent cardioprotecteur.

Conclusion

Conclusion et perspectives:

A notre connaissance, cette étude a été la première à évaluer l'effet protecteur d'extrait méthanolique de la plante médicinale algérienne *Phlomis samia* sur la cardiotoxicité induite par la Doxorubicine. L'administration du Doxo à 15 mg/kg aux rats pendant 15 jours a provoqué une perturbation métabolique révélée par l'apparition des atteintes de la fonction cardiaque, des paramètres sérique, ainsi que le profil lipidique. Cette perturbation est associée à une altération structurale du cœur. De plus, le statut antioxydant a été affecté, nous suggérons ainsi un stress oxydant généré par le Doxo, qui a perturbé la capacité défensive de l'organisme.

Le traitement associatif du PHSME avec le Doxorubicine a fait diminuer le niveau de la toxicité, en modulant les niveaux des bio marqueurs de stress oxydant, et en régulant l'activité des enzymes antioxydantes. Cette combinaison a aussi révélé une amélioration du métabolisme biochimique et histologique.

D'autre part l'étude de l'effet de l'extrait PHSME sur l'activité apoptotique sur des lignes cellulaires MDA et HepG2 a montré une activité cytotoxique et un blocage de cycle cellulaire à la phase G1. Les résultats obtenus peuvent être résumés dans les points suivants :

L'importance des antioxydants (PHSME) dans la réduction des effets toxiques induits par le Doxorubicine chez les rats

_ Une perturbation du métabolisme biochimique après le traitement par le Doxo a été révélée par l'augmentation des taux sériques en :CPK, LDH, ASAT, ALAT.

_ La supplémentation du PHSME a considérablement réduit cette perturbation, ce qui prouve son effet protecteur.

_ Le dosage des bio marqueurs du stress oxydant (GSH, MDA) et des enzymes antioxydantes (GPX, GST, CAT) a permis une meilleure caractérisation de l'effet antioxydant de PHSME vis-à-vis la toxicité de la Doxorubicine.

_ Une altération structurale du tissu cardiaque a été observée après le traitement des rats par la Doxo, une association avec l'PHSME a protégé la structure tissulaire du cœur, ce qui certifie l'effet protecteur de *Phlomis samia*.

D'après les résultats de nos travaux nous avons aboutis les constatations suivantes:

Conclusion et perspectives

- L'extrait Methanolique de *Phlomis samia* a prouvé une activité antioxydante puissante dans les tests in vitro,
- A normalisé les taux des différents paramètres dosés in vivo,
- Les différentes analyses histologiques ont confirmé l'effet préventif et la correction de la toxicité de la doxorubicine.
- nous avons découvert un nouvel usage thérapeutique potentiel de la plante *Phlomis samia* ce qui nous donne un grand espoir d'une action préventive chez l'être humain dans le domaine de la chimiothérapie
- L'extrait PHSME a une activité anti-prolifération avec l'essai MTT sur deux types de lignées cellulaires HepG2 et MDA.
- l'extrait PHSME l'émette la progression du cycle cellulaire dans la phase S/G1, ce qui implique son effet anticancéreux très puissant et utile dans le traitement de cancer du foie et du sein.

Cette recherche nécessite d'autres études approfondies pour mieux renforcer nos données sur les effets révélés. Il serait souhaitable de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres du statut antioxydant (SOD, Vitamine E, Vitamine C,...). Il serait intéressant aussi que de déterminer d'autres marqueurs d'apoptose pour mieux comprendre les mécanismes impliqués.

. Des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour déterminer d'une part les composés actifs de PHSME et d'autre part le mécanisme par lequel ses composés accomplissent leur rôle.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

A

Abad-Garcia B, Berrueta L A, Garmon-Lobato S, Gallo B et Vicente F (2009) : "A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1216(28): 5398-5415.

Abbot B , Kaplan A , Clin Chem The CV, Mosby Co, Louis St (1984). Creatinine kinase. Toronto. Princeton , 1112-116.

Abdel-wahab MH, El-Mahdy MA, Abd-Ellah MF, Helal GK, Khalifa F, Hamada FMA (2003): Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart . *Pharmacological Research*,48, 461-465 .

Abdel-aleem S, El-Merzabani MM, Sayed-Ahmed M (1997) Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29 789–797.

Abuja PM and Albertini R (2001) : Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta* 306 (1-17). (1989). in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763-1769.

Abushouk AI, Ismail A, Abdo Salem AM, Afifia AM, Abdel- Daimd MM (2017) Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity , *Biomedicine & Pharmacotherapy* 90 935–946

Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW (2002): The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch., *Mol Cell.*, 9 : 423- Cory S, Adams JM. *Nat Rev Cancer.* 2002, 2 : 647-656.

Afanas'ev I.B, Dorozhko, AI, Brodskii, AV, Kostyuk, VA, and Potapovitch, AI. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763-1769.

Agha AM, El-Fattah AA, Al-Zuhair HH, Al-Rikabi AC(2001) :Chemopreventive effect of Ginkgo biloba extract against benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice: amelioration of doxorubicin cardiotoxicity, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* CR 20 39–50.

Agullo G, Gamet-Payrastre L, Manenti S, Viala C, Remesy C, Chap H and Payrastre B(1997): Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 53: 1649-1657.

Agnieszka Majewska, Hoser Gra'zyna , Furmanowa Mirosława , Urbańska Natalia , Pietrosiuk Agnieszka , Zobel Alicja , Mieczysław Kura's (2006) : Antiproliferative and antimitotic effect, S phase accumulation and induction of apoptosis and necrosis after treatment of extract from *Rhodiola rosea* rhizomes on HL-60 cells , *Journal of Ethnopharmacology* 103 43–52

Ahmed RS, Suke SG, Seth V, Chakraborti A, Tripathi AK, Banerjee BD. Protective effects of dietary ginger on lindane-induced oxidative stress in rats.

Références bibliographiques

- Ahmad S (1995).** Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. 1st Ed. Chapman & Hall. New York. pp: 1-457.
- Ajith TA, Aswathy MS, Hema U(2008) :** Protective effect of *Zingiber officinale* roscoe against anticancer drug doxorubicin-induced acute nephrotoxicity. *Food Chem Toxicol*;46:3178–81.
- Akbas SH, Yegin A, Ozben T(2005) :** Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin Biochem* ; 38(11) : 1009-14.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M and Fukami Y(1987):** Genistein, a specific inhibitor of tyrosine kinases. *J Biol Chem* 262: 5592-5595,
- Albaladejo RG, Aparicio A, Silvestre S (2004):** Variation patterns in the *Phlomis* composite (Lamiaceae) hybride complex in Iberian Peninsula. *Bot J Linn Soc*; 145: 97-108.
- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff J, Roberts, K et Watson JD (1995) :** *BiologieMoléculaire de la cellule.* (3 rd Editon), Flammarion Medecine Sciences: Paris, France.
- Alibert, G, RanjevaR, Boudet MA(1977) :**Organisation subcellulaire des voies dsynthèse des composés phénoliques. *Physiol. Veg*, 15 : 279-301
- Algeciras-Schimmich A, Shen L, Barnhart BC, Murmann AE, Burkhardt JK, Peter ME. (2002) :** Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol.*, 22 : 207-220.
- Al-Majed AA, et al (2002) :** Alpha-lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. *Pharmacol Res*, 46(6): p. 499-503.
- Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TM (1993) :** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7915-7922.
- Amic D, Davidovic-Amic D, Bešlo D and Trinajstic N (2003) :** Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatica Chemica Acta* 76, 55-61.
- Andi Nur Fitriani Abubakar, Suminar Setiati Achmadi, Irma Herawati Suparto (2017) :**Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* Volume 7, Issue 5, , Pages 397-400.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC(2000) :** Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria *Biochem J.*, 345 : 271- 278.
- Andreadou I, SigalaF, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, Savvari P, Gorgoulis V, Papalabros E, Kremastinos D(2007):**Acute doxorubicin

Références bibliographiques

cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J.Mol. Cell Cardiol*, 42, 549-558.

Andrieu-Abadie N, Levade T, Laurent G, Hatem S, Mercadier J (1999) : Le céramide à l'origine de la cardiotoxicité de la doxorubicin? *Médecine/sciences*, 15, 1322-4.

Andrieu-Abadie N, JaffrezouJP, Hatem S (1999). L-Carnitine prevents doxorubicin induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation *FASEB J*. 13, 1501–1510.

Appel JM (2007) : Anthracycline-induced chronic cardiotoxicity and heart failure. *Acta Oncol.*, 46(5): p. 576-80.

Arafa MH, Mohammad NS, Atteia HH, Abd-Elaziz HR (2014) : Protective effect of resveratrol against doxorubicin-induced cardiac toxicity and fibrosis in male experimental rats, *J. Physiol. Biochem.* 70 701–711.

Arosio P, Levi S (2010) : Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*, 1800(8), 783–92.

Ashour OM, Abdel-Naim AB, Abdallah HM, et al., (2012) Evaluation of the potential cardioprotective activity of some Saudi plants against doxorubicin toxicity, *Z. Naturforsch.* 67 297–307.

Ashour OM, Elberry AA, Alahdal A, (2011) : Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats, *Med. Sci. Monit.* 17 BR110-5.

Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adigüzel A, Sahin F and Özkan H (2006) : Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharm. Biol.* 44, 247-252.

Alvarez, B and Radi, R (2003) : Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids*. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. 25, 295–311 432

B

Babior,BM (2004) : NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 42–47.

Babu PVA, Sabitha KS, Shyamaladevi CS (2006) : Therapeutic effect of green tea extract on oxidative stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological*

Bachur N R, Gordon SL, and Gee MV(1978) : *Cancer Res.* 38, 1745–1750.

Bahorun T(1997) : Substances naturelles actives : La flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food. Agric. Res. Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.

Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M and Gazin M (1996) : Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res.* 1-6.

Références bibliographiques

Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) : Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*. **9**: 191-203.

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

Barouki R(2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/sciences* n°3, vol.22, 266-72.

Barman NR, Prasanna K, Kar, Prakash K, Hazam, Himadri S. Pal, Arvind Kumar, Sanjib Bhattacharya, Pallab KH (2013) : Cardioprotective effect of *Urtica parviflora* leaf extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats *Chinese Journal of Natural Medicines* , **11(1)**: 0038–0042

Barriere C, Centeno D, Lebert A, Leroy-Setrin S, Berdague J, Land Talon R (2001) : Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters* **201**, 181-185.

Barry E, Alvarez JA, Scully RE, Miller TL, Lipshultz SE (2007): Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management. *Expert Opin Pharmacother*, **8**, 1039–58.

Bartosz G(2003) Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. **9**: 5-21.

Baskin SI and Salem H(1994) : Oxidant, Antioxidant and Free Radicals. Academic press Inc. **363** (25-62).

Beckman KB and Ames BN (1998) : The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* **78**, 547-581 .

Beckman KB, Ames B(1998): The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological reviews* Vol. **78**, No. **2**, **78**: 474-581.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990) : Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxyde. *Proc Natl Acad Sci USA*; **87**:1620–4.

Beaudeau JL, Vasson MP (2005) : Sources cellulaires des espèces réactives de l’oxygène. In **Ben Amor I., Neffati A, Ben Sgaier M, Bhourri W, ihed Boubaker J, Skandrani I., Bouhlel I, Kilani S, Ben Ammar R, Chraief I, Hammami M, Ghouli M, Chekir-Ghedira L, Ghedira K (2008)** : Antimicrobial Activity of Essential Oils Isolated from *Phlomis crinita* Cav. ssp. *mauritanica* Munby, *J Am Oil Chem Soc* **85**:845–849

Ben Amor I L, Boubaker J , Ben Sgaier M , Skandrani I, Bhourri W, Neffati A, Kilani S , Bouhlel I, Ghedira K, (2009) Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species *Journal of Ethnopharmacology* **125** 183–202

Benmahdi A(2001) : Identification des Principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie* **6**: 11-27.

Références bibliographiques

Berggren M, Gallegos A, Gadaska JR, Gadaska PY, Warneke J, Powis G (1996) : Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res*;16:3459–3466 cancer. Wiley-Liss Inc.

Berry CE and Hare JM(2004) : Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 555, 589-606.

Berry GJ, Jordan M (2005): Pathology of radiation and anthracycline cardiotoxicity. *PediatrBlood Cancer*, 44 (7), 630-7.

Berry GJ, Jordan M (2005): Pathology of radiation and anthracycline cardiotoxicity. *PediatrBlood Cancer*, 44(7), 630-7. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*, 1998, 78 : 547-581.

Bhatia L,Bichnoi H,Chauhan P(2011): in vitro comparative antioxydants activity of ehanolique extracts of *Glycosmis pentaphylla* and *Bbouhinia variegata* *Recent sci technol* 3(7):1-3.

Bicknell, GR, et Cohen GM (1995) : Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*.vol. 207, no 1, P. 40-47.

BIELSKI BH (1982):Chemistry of ascorbic acid radicals. *Ascorbic acid: chemistry, metabolism, and uses*. *Adv.Chem. Ser.* 200: 81-100;

Birt DF, Hendrich S, Wang W (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics*. 90: 157-177.

Bird BR and SM Swain (2008) : Cardiac toxicity in breast cancer survivors: review of potential cardiac problems. *Clin Cancer Res.*, 14(1): p. 14-24.

Bishay K, Ory K, Olivier M F, Lebeau J, Levalois C, Chevillard S(2001) : *Carcinogenesis* , , 22: 1179–1183,

Block G, Patterson B, Subar A (1992) : Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*;18:1–29.

Blouin E, Halbwachs-Mecarelli L and Rieu P(1999) : *Eur. J. Immunol.* 29, 3419^3431 *Weekbl.Sc*, 8, 109.

BODANNE5, R S, CHAN PC (1979) :Ascorbic acid as scavenger of singlet oxygen. *FEBS Lett.* 105: 195-196.

Bonnefont-Rousselot D, Thérond P, Delattre J(2003) : Radicaux libres et anti-oxydants. In *Delattre J, Durand G, Jardillier JC. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires : 59-81. Médecine-sciences Flammarion Paris.*

Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Delattre J(2006) : Radicaux libres et antioxydants. In : *Delattre J, Serdar Z, Aslan K, Dirican M, Sarandol E, Yeşilbursa D, Serdar A. Lipid and protein oxidation and antioxidant status in patients with angiographically proven coronary artery disease. Clin Biochem, ; 39(8) : 794-803*

Botta B, Menendez P, Zappia G, Lima RAD, Torge R and Monache GD(2009) : Prenylated isoflavonoids: botanical distribution, structures, biological activities and

Références bibliographiques

biotechnological studies. An update (1995-2006). *Current Medicinal Chemistry*, **16**: 3414–3468.

Bouma J, Beijnen JH., Bult A, and Underberg WJ (1986): Anthracycline antitumour agents. A review of physicochemical, analytical and stability properties. *Pharm.*

Bounatirou S, Smiti S, Miguel MG, Faleiro L, Rejeb MN ,Neffati M, Costa MM, FigueiredoAC, Barroso JG, Pedro LG (2007).Chemical composition, antioxidant and antibacterialactivities of the essential oilsisolatedfromTunisian *Thymus capitatus*Hoff. et Link. *Food Chemistry*, 105 :146–155.

Bounatirou S (2007): Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capita*.

Bowie A and O'Neill LAJ (2000) : *Biochem. Pharmacol.* 59, 13[^]23.

Bratton D L, Fadok V A, Richter D A, Kailey JM, Guthrie LA and Henson P(1997) : Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calciummediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* **272**, 26159-65

Bravo L (1998). "Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance." *Nutrition Reviews* **56**(11): 317-333.

Brenner Cand Kroemer G (2000). Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* **289** (5482): 1150-1.

Bricker JT, Green DM, D'Angio G (1993). Cardiac toxicity after treatment for childhood Bouillet P, Purton JF, Godfrey DI, Zhang LC, Coultas L, Puthalakath H, Pellegrini M, Cory S, Adams JM, Strasser A. *Nature*. 2002, 415 : 922-926. BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes.

Bristow MR, Minobe WA, Billingham ME, Marmor JB, Johnson BM, Ishimoto BM, et al. (1981) : Anthracycline-associated cardiac and renal damage in rabbits. Evidence for mediation by vasoactive

Bristow MR, Masson JW, Daniels JR (1978). The use of myocardial biopsy to monitor cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep*, 62, 1607–8.

Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans C(1998) Structural dependence of flavonoïdes interactions with Cu²⁺ ions : implication for their antioxidant properties. *The Biochemical journal*. **330**: 1173-1178.

Brunneton J (1999). Flavonoïdes. In : *Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinale*, 3^{ème} édition, Technique et Documentation (Paris), pp: 310-353.

Brunet J (1993). *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. 2ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.

Brunet J(2009). *Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales*, (4e éd), revue etaugmentée, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, Paris, p 1288 .

BrunetJ(1999).*Pharmacognosie,Phytochimie,Plantesmédicinales*,(3èmeéd.).Editions Tec & Doc Lavoisier, p 1120.

Brzozowska J, HanowerP, Tanguy, J (1973). Polyphenols des feuilles de cotonniers et influence sur leur composition d'un choc hydrique ou nutritionnel. *Phytochemistry*, 12: 2353-2357.

Références bibliographiques

Bsoul SA, Terezhalmly GT. Vitamin C in health and disease (2004) : J Contemp Dent Pract.;5:1–13.

Bucar F, Ninov S, Ionkova I, Kartnig T, Schubert-Zsilavec M, Asenove I, et al. (1998) : Flavonoids from *Phlomis nissoli*. *Phytochemistry*;48(3):573–5.

Buja LM, Eigenbrodt ML and Eigenbrodt EH Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med*.117: P. 1208-1214

Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferez C, Franklin S, Ghayur T, Li P (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*.Vol. 269 ,pp. 1885-1888.

Burtis A et al (1999). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed AACC.

Burits M and Bucar F (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research* 14, 323-328.

Burtis A et al (1999). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed AACC.

Burk RF (2002). Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care* , **5** : 47-49. species in Sprague-Dawley rats. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, substances. *Lab Invest*;45:157–68.

C

Cabrol C et al (2003) : Anatomie du cœur humain ; Université Pierre et Marie Curie ; Niveau PCEM2 – EIA cardiologie.p (45).

Cadeddu C, et al (2010) : Protective effects of the angiotensin II receptor blocker telmisartan on epirubicin-induced inflammation, oxidative stress, and early ventricular impairment. *Am Heart J*,. 160(3): p. 487 e1-7.

Cadenas E and Davies JA (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging. *Free Radic. Biol. Med*. 29, 222-230.

Calder PC (2001) Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 36, 1007-1024.

Calis I, Kirmizibekmez H, Tasdemir D, Ruedi P(2004) : Two new triterpene and a new nortriterpene glycoside from *Phlomis viscosa*. *Helv Chim Acta* 87:611–9.

Cann RL and Wilson AC (1983) Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics* 104, 699-711.

Capecka E, Mareczek A, Leja M (2005) : Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chemistry* **93**, 223-226.

Casagrande F, Darbon JM (2001) Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol*.;61:1205–15.

Cash T, Pan Y, Simon, MC (2007) Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free radical biology & medicine*. **43**: 1219-1225.

Références bibliographiques

Castaneda-Ovando, A, Pacheco-Hernandez MdL, Paez-Hernández ME, Rodriguez JA et Galan-Vidal CA (2009) : "Chemical studies of anthocyanins: A review." *Food Chemistry* **113**(4): 859-871.

Celika S, Gokturkb R S, Flamini G, Cioni PL, Morelli I (2005): Essential oils of *Phlomis leucophracta*, *Phlomis chimerae* and *Phlomis grandiflora* var. *grandiflora* from Turkey, *Biochemical Systematics and Ecology* **33** 617e623

Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC (1993) : Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.*;13:2165–70.

Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, Weintraub NL, Tang C (2004). Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **43**, 165–170.

Chang CL, Wang GJ, Zhang LJ, Tsai WJ, Chen RY, Wua YC, Kuo YH. (2009) : Cardiovascular protective flavonolignans and flavonoids from *Calamuschinensis*. *Phytochemistry*, **10** : 1–9.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL and Lesnefsky EJ (2003a) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**, 36027-36031.

Chen W, Qiu J, Shen YM et al (2012). Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti-cancer drugs. *Drug Discov The*, **6**(5), 230–7

Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, 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**, 4592–8.

Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD & Green DR (2005); PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* **309**:p.1732-5.

Choi EH., Lee N, Kim H.J, et al (2008) Schisandra fructus extract ameliorates doxorubicin-induced cytotoxicity in cardiomyocytes: altered gene expression for detoxification enzymes, *Genes Nutr.* **2** 337–345.

Christudas S, Veeramuthu D , Savarimuthu I (2013) : In vitro antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Toddalia asiatica* (L) Lam. Leaves in Triton WR-1339 and high fat diet induced hyperlipidemic rats, *Food and Chemical Toxicology* **60** 135–140.

Cikala M, Wilm B, Homayer E, Bottger A, David CN. Curr Biol. (1999), Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra* **9** : P.959-962.

Clal Saracoglua, I.; Varel, M.; Hadab, J.; Hadab, N.; Takedab, T.; Donmez, A. A.; and Calisa, I. (2003): Phenylethanoid Glycosides from *Phlomis integrifolia* Hub.-Mor. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen ·0939-5075/1100-0820 .

Collin S, Crouzet J (2011). Agence universitaire de la francophonie. Polyphénols et procédés : Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire. Edition Lavoisier, p 13.

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

Références bibliographiques

Constantinou A, Kiguchi K and Huberman E(1990): Induction of differentiation and DNA strand breakage in human HL-60 and K-562 leukemia cells by genistein. *Cancer Res* 50: 2618-2624.

Costentin. J, Défossez A, Fellmann D (2008) :Histologie bases fondamentales

Corbett KD, Berger JM (2004). Structure molecular mechanisms and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 33, 95–118.

Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW and Arnheim N (1992) A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7370-7374.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AV, Berghe DK (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of natural products*. **61**: 71-76.

Cotelle N (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*. 1: 569-590.

Cottin Y, Touzery C, Dalloz F, Coudert B, Toubreau M, Riedinger A (1998) Comparison of epirubicin and doxorubicin cardiotoxicity induced by low doses: evolution of the diastolic and systolic parameters studied by radionuclide angiography. *Clin Cardiol* ; 21(9):665.

Couldis M, Tanimanidis A, Tzakou O, Chinou IB, Harvala, C (2000): Essential oil of *Phlomis lanata* growing in Greece: chemical composition and antimicrobial activity. *Planta Med*; 66: 670- 672.

Couldis M, Tanimanidis A, Tzakou O, Chinou IB, Harvala C(2000) Essential oil of *Phlomis lanata* growing in Greece: chemical composition and antimicrobial activity. *Planta Med*;66:670–2.

Cowan MM (1999) : Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582.

Crozier A, Clifford MN, Ashihara H (2006) : Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

Crozier A, Del Rio D, Clifford MN(2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, **31** : 446–467.70

Cuendet M, Hostettmann K and Potterat O (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80, 1144-1152.

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

Cushnie TPT and Lamb AJ(2005a) : Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**: 343–356.

Cushnie TPT, Lamb and AJ (2005b). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, **101**: 243–248.

Cutts.S M, et Phillips DR (1995).«Use of oligonucleotides to define the site of interstrand cross-links induced by Adriamycin». *Nucleic Acids Res*, 23(13), 2450_2456.

Références bibliographiques

Cutts SM et Phillips DR(1995) : «Use of oligonucleotides to define the site of interstrand cross-links induced by Adriamycin». *Nucleic Acids Res.* vol. 23, no 13, p. 2450-2456.

D

Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, Zhang CY, Krauss S, Ranger AM, Datta SR, Greenberg ME, Licklider LJ, Lowell BB, Gygi SP, Korsmeyer SJ(2003). *Nature.*, 424 : 952-956.

Das, Manika., Das, Dipak. K(2010) : Resveratrol and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, 31: 503–512.

DASSIER (2006) : anatomie du cœur et des vaisseaux ; HEGP Paris 75015 ;p (6589)

de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* ; 62 : 1276-82.

Daugherty A (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 94, 437–444

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

Decoursey TE, and Ligeti E (2005) : Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2173–2193

Degterev A, Boyce MY ,uan J (2003) : A decade of caspases. *Oncogene*;22:P.8543- 67.

Delattre J, Beaudoux, JL, Bonnefont-Rousselot, D. Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques : 45-86. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris.

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

Delazar A, Sabzevari A, Mojarrab M, Nazemiyeh H, Esnaashari S, Nahar L, Razavi SM, Sarker, SD (2008) : Free-radical-scavenging principles from *Phlomis caucasica*. *Natural Medicine (Tokyo)* 62, 464–466.

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

Delemasure S (2006) Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclins. From basic concepts to clinical data]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*,. 55(2): p. 104-12.

Delemasure S a, CV (2006). Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclins. From basic concepts to clinical data, 104–112.

Del Rio, LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Corpas FJ, Pastori GM, Bueno P, Lopez-Huertas E (1996) : Peroxisoms as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions.* 24: 434-438.C

Demirci B , Toyota M, Demirci F , DadandiK M Y, Baser H C (2008): Anticandidal pimaradiene diterpene from *Phlomis* essential oils. *C. R. Chimie* xx1e10.

Références bibliographiques

Demirci F; Guven K; Demirci B; Dadandi MY ; Baser KHC (2008): Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens , Food Control 19 1159–1164.

Deneke SM, Fanburg BL (1989). Regulation of cellular glutathione. Am J Physiol Lung CellMol Physiol, **257**: 163 - 173.

Densiov ET, Afanas'ev IB (2005) :IN: Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. Eds: Taylor & Francis Group (U.S.A), Pp: 703-861.

Depty E ; Hatem SN , Andrieu N ;De Vaumas C ; Henaff M ; Rucker-Martin C (1999): Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes ;(43), p(398–407).

Demirtas I, Erenler R, Elmastas M, Goktasoglu A (2013) : Studies on the antioxidant potential of flavones of *Allium vineale* isolated from its water-soluble fraction. Food Chemistry **136**, 34-40.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA and Capasso F(1999) : Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Science, **65**(4): 337–353.

Di Mauro S and Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory - Chain diseases. The New England Journal Medecine 348, 2656-2668.

Didier C, Kerblat I, Drouet C, Favier A, Beani JC, Richard MJ (2001) Induction of thioredoxin by ultraviolet-A radiation prevents oxidative-mediated cell death in human skin fibroblasts. Free Radic Biol Med;**31**:585–598.

Donatiello C(2002) : La toxicité cardiaque des anthracyclines dans le traitement des tumeurs de l'enfant. Thèse de doctorat : Univ. Genève

Dong Z, Saikllmar P, Weinberg 1 M et Venkatachalam M A(1997) : «Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases». Am J Pathol. vol. 151, no 5, p. 1205-1213.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans M, Roberfroid M, et al. 1998 Functional food science and defence against reactive oxygen species. Br J Nutr;**80**:S77–S112.

Doroshov JH (1991). Doxorubicin-induced cardiac toxicity. Journal of Medicine, 324, 843-845.

Doroshov JH (1991). Doxorubicin-induced cardiac toxicity. Journal of Medicine, 324, 843-845.

Dubois GE, Grosbay GA, Saffron P (1977) : Non nutritive Sweeteners: Taste structure relationships with for some new simple dihydrochalcones. Science, 195: 397-399.

Duchnowicz P, Broncel M, Podsędek A and Koter-Michalak M(2012) : Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (in vitro study). European Journal of Nutrition, **51**: 435–43.

Références bibliographiques

Ducros V, Favier A(2004) : Métabolisme du sélénium Selenium metabolism EMC-Endocrinologie 1 19–28.

DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, et al. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. FEBS Lett. ; 436 : 71-5.

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

Durackova Z, Djrolo F, Hougbe H, Avode G, Attoulou V, Addra B, Kodjoh N, Avimadj M., (2008). Oxidants, Antioxydants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdzakova A (ed). P :19-43.

Dykes L & Rooney, LW(2006). Sorghum and millet phenols and antioxidants. Journal of cereal Sciences **44**, 236 - 241.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Cell. (2000) : Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Droin NM, Green DR. Biochim Biophys Acta. **2004**, 1644 : 179-188. Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. 102 : 33-42.

Du HY, Ho PC (2001) : Cancer Chemother. Pharmacol, 47: 481–490.

E

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ and Brand MD (2003) A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. Embo J 22, 4103-4110.

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

Edenharder R, Grünhage D (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102. Mutat. Res, 540: 1–18.

Elberry AA, Abdel-Naim AB, Abdel-Sattar EA(2010) : Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, Food Chem. Toxicol. 48 1178–1184.

El Gharras H (2009) : "Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review." International Journal of Food Science and Technology 44(12): 2512-2518.

Elmore S (2007) : Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol 35, 495-516.

El-Negoumy SI, Abdalla MF, Saleh NAM (1986) : Flavonoids of *Phlomis aurea* and *P. floccosa*. Phytochemistry 25, 772–774.

El Touny LH, Banerjee PP(2009) : Identification of a biphasic role for genistein in the regulation of prostate cancer growth and metastasis. Cancer Research **69**, 3695-3703.

Références bibliographiques

Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC(2000) : Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Evan GI, Vousden, Mol Cell Biol.*, 20 : 929-935.

Essig DA and Nosek TM (1997) : Muscle fatigue and induction of stress protein genes: a dual function of reactive oxygen species? *Can J Appl Physiol* 22, 409-428.

Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H and Jurgens G (1992) : The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 13, 341.

Evan, G, et Littlewood T (1998) : A matter of life and cell death .*Science.* vol. 281, no5381, P. 1317-1322

Evans WC(2002) : Trease and Evans Pharmacognosy. 15th ed. London: W.B. Saunders;. p. 246–8

F

Fahn S et Cohen G (1992) : The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease : evidence supporting it. *Ann Neurol*, 1992, 32 : 804-812.

Fang X, Dahammika Nanayakkara NP, Phoebe Jr, Pezzuto C.H, Douglas JM Kahinghorn A, Farnsworth NR.(1985). Plant anticancer agents XXXVII. Constituents of *Amanoa Oblongifolia*. *Planta Med.* Vol. 4, pp. 346-347.

Fatima S, Mahmood R (2007) : Vitamin C attenuates potassium dichromate-induced nephrotoxicity and alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport in rats. *Clin Chim Acta*, ; 386(1-2) : 94-9.

Favier A(1994) : Biological indicators of oxidative stress in humans. In : Favier A, Neve J, Editors. Trace elements and free radicals in oxidative diseases. Champaign, AOCS Press, : 57-80.

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

Feldmann G, Haouzi D, Moreau A, Durand-Schneider AM, Bringuier A, Berson A, Mansouri A, Fau D, Pessayre D. Hepatology(2000) : Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. 31 : 674-683.

Feng H Y ,Zeng L , Whitesell E, Katsanis (2001) : Stressed, *Blood* , 97: 3505–3512.

Ferriola PC, Cody V and Middleton E(1989): Protein kinase C inhibition by plant flavonoids, kinetic mechanism and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 38: 1617-1624,

Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, Chen JW, Feinstein SI (1999) : Phospholipid Hydroperoxides Are Substrates for Non-selenium Glutathione Peroxidase. *The journal of biological chemistry*, 274 : 21329 - 21334.

Fogli S, Nieri P, Reschi MC (2004) : The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage. *FASEB J*;18:664–75.

Fontaine E (2009) : Production et élimination des radicaux libres oxygènes . parentérale, département de médecine aiguë spécialisée, Hôpital Albert Michallon, BP 217, 38043 Grenoble cedex

Références bibliographiques

Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010): Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, **31** : 435–445.

FREEMAN B A, Ca'u'o J D (1982) : Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426; **CHANCE B, SIES H, BOVERIS A.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979, 59 : 527-605.

Fuchs SY, Adler V, Bushmann T, Wu X, Ronai Z (1998) : Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene*. Vol. 17 ,pp.2543-2547

Fuhr U, Kummert AL The fate of naringin in humans(1995) : a key to grapefruit juice-drug interactions. *Clin. Pharmacol. Ther.*; 58 : 365-73.

Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M (2007) : Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*, ; 2(3) : 377-87.9.

G

Galati G, Teng S, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ (2000) : Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact.*;17:311–49.

Galluzzo P, Martini C, Bulzomi P, Leone S, Bolli A, Pallottini V, Marino, M (2009) : Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant versus estrogen receptor alpha-dependent mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**, 699-708.

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

Gamet-Payraastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H and Payraastre B (1999) : Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen Pharmacol* 32: 279-286,.

Gardai S J, Bratton D L, Ogden CA and Henson PM (2006) : Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* **79**, 896-903.

Garrido c, galluzzi l, brunet m, puig pe, didelot c, kroemer g (2006) : mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *cell death differ*;13:p.1423-33.

Gerhardt W et al. (1979): Creatine kinase B-Subunit activity in serum after immunohinhibition of M-Subunit activity. *Clin Chem*, (25/7), 1274-1280.

Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS , Poirier GG (1999) : Cleavage of automodified poly (ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 274:p.28379-84.

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

Ghibu S, Delemasure S, Richard C, et al. (2012) : General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid, *Biochimie* 94 932–939.

Ghibu S (2009) : Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*, 54(5): p. 391-8.

Références bibliographiques

Ghibu S (2008) : [An endogenous dithiol with antioxidant properties: alpha-lipoic acid, potential uses in cardiovascular diseases]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*,. 57(3): p. 161-5.

Givan AL (2011) : Flow cytometry: an introduction. *Methods in Molecular Biology* **699**, 1-29.

Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G (1993). The Fenton reagents. *Free Rad Biol Med*, 15: 435 - 445.

Gonzalez-Garcia M, Garcia I, Ding L, O'Shea S, Boise LH, Thompson CB, Nunez G. Proc Natl Acad Sci U S A(1995) : bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *N92* : 4304-4308.

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

Granados-Principal SNew advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem Toxicol.* 48(6): p. 1425-38.

Graziani Y, Winikoff J and Chayoth R (1977) :.Regulation of cyclicAMP level and lactic acid production in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 497: 499-506,

Graziani Y, Erikson E and Erikson RL(1983): The effect of quercetin on the phosphorylation activity of the Rous sarcoma virus transforming gene product in vitro and in vivo. *Eur J Biochem* 135: 583-589,

Grenier MA, Lipshultz SE (1998). Epidemiology of anthracycline car-diototoxicity in children and adults. *Semin Oncol*, 25, 72–85.

Griendling KK and Harrison DG (1999) *Circ. Res.* 85, 562^ 563.

Grinberg M, Sarig R, Zaltsman Y, Frumkin D, Grammatikakis Reuveny E, Gross A J (2002) : tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis *Biol Chem.* 277 :12237-12245

Guang-Hong Wu, Ting Hu, Zi-Yi Li , Zhuo-Lie Huang , Jian-Guo Jiang(2014) : In vitro antioxidant activities of the polysaccharides from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. *Food Chemistry* 148 351–356

Gaudable J, Favier A (1997) : radicaux libre oxygénés et antioxydants ,*nutr clim Métabol* 11 :115-20.

Gupta S (2005): «Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging». *Immuno/ Rev.* Vol. 205, pp. 114-129.

Guerrero AD, Chen M & Wang J (2007) : Delineation of the caspase-9 signaling cascade. *Apoptosis*;13:p.177-86.

Guetteridge JM (1993) free radicals in disease processes : a complication of cause and consequence. *Free radical research communications.* **19**: 141-158.

Guetteridge JM (1993) free radicals in disease processes : a complication of cause and consequence. *Free radical research communications.* **19**: 141-158.

GUTTERIDGE JM. 1993,Free radicals in disease processes : a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun*, 19 : 141-158.

Gutteridge JM, Mitchell J(1999) : Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull*, ; 55(1) :49-75.

H

Hakim, I.A.,Alsaif, M.A., Alduwaihy, M. (2003) :Tea consumption and the prevalence of

Références bibliographiques

coronary heart disease in Saudi adults: results from a Saudi national study. *Preventive Medicine Journal*, **36**: 64–70.

Halliwell B (2007): Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1147–50.

Halliwell B, Wasil M, Grootvels M(1987) : Biologically significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. *FEBS Lett.* **213**, 15.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999a) : Free Radicals in Biology and Medicine. In Halliwell B., Gutteridge JMC, eds, : 1-543.

Halliwell B (1989) : Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*, **70** : 737 - 757.

Halliwell B (1996) : Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie*, **44**: 6-13.

Halliwell B and Gutteridge JMC (2006) : Free Radicals in Biology and Medicine (4th edn), Oxford University Press

Halliwell B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathologie Biologie* 1996; **44**: 6-13.

Halliwell Barry 2006. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.31 No.9

Halliwell, A., Gutteridge, J.M.C. (1990) The antioxidant of human extracellular fluids. *Archives of bioch*

Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology.* **142**: 31-2.

Halliwell A, Gutteridge JMC (1990) The antioxidant of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics.* **280**: 1-8.

Hallman PCH, De Vries HM, Van Leeuwen SD, Mengelers M.JB and Katan MB (1995) : Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition.* **62**: 1276-1282.

Hallman PCH, Trijp LMP, Buysman MNCP, Gaag MS, Mengelers JB, De vries JHM, Katan MB (1997) : Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters.* **418**: 152-156.

Hames BD, Hooper NM, Houghton JD (1999) : L'essentiel en biochimie. Berti éd's, 155-160.

Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D and Cadenas E (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* **278**, 5557-5563.

Hande K R (1998) «Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II>>. *Biochim Biophys Acta.* vol. **1400**, no 1-3, p. 173-184.

Hao G, Yu Y, Gu B (2015) : Protective effects of berberine against doxorubicin- induced cardiotoxicity in rats by inhibiting metabolism of doxorubicin, *Xenobiotica* **45** 1024–1029.

Harbone JB (1993) : Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed; Academic Press: London.

Harkins TT, Lewis TJ, Lindsley JE (1998): Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. *Biochemistry (Mosc)*, **37(20)**, 7299–312.

Références bibliographiques

Harpur US, Calis I, Saracoglu I, Donmez AA, Nagatsu A (2006) : Secondary metabolites from *Phlomis syriaca* and their antioxidant activities. *Turk J Chem*;30:383–90.

Harrison R (2002) : Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology and Medicine*. 33, 774-797.

Haslam E (1996) : Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat Pro*, 59: 205-215. Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut*, 96: 67–202

Haton C (2005) : Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France, pp : 43.

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

Heimeur N, Idrissi Hassani LM, Amine Serghini M (2004) : Les polyphénols de *Pyrus mammosensis* (Rosaceae). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 3 (1): 37-42.

Helft G, Leger P (2009) : Que retenir de la littérature récente concernant les antithrombotiques. What's new on antithrombotics? *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, 58 : 230-235.

HEMILA H, ROBERTS P, WIKSTROM M (1985) : Activated polymorphonuclear leucocytes consume vitamin C. *FEBS Lett*. 178: 25-30;

Hendrich AB (2006) Flavonoid-membrane interactions possible consequence for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta pharmacologica Sinica*. 27: 27-40.

Hentgartner MO Nature (2000) : The biochemistry of apoptosis. 407 : 770-776

Hengartner MO, Horvitz HR. (a) Curr Opin Genet Dev (1994) : Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. 4 : 581-586.

Hengartner MO, Horvitz HR. elegans C (1994) : cell survival gene *cled-9* encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene *bcl-2*. (b) *Cell* 76 : 665-676.

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

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

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D (1993) : Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease, the Zutphen Elderly study. *Lancet*;342:1007–11.

Herr I and Debatin KM (2001) : Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 98, 2603-14.

Hetts SW (1998) : To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*. 279.P: 300-320.

Heyworth PG (2003) : Chronic granulomatous disease. *Curr. Opin. Immunol*. 15, 578–584

Hida H, Coudray C, Calop J, and Favier A (1995) *Biol. Trace Element Res*. 47, 111–116 chemistry and biophysics. 280: 1-8.

Higson FK, Kohen R, Chevion (1988) : Iron enhancement of ascorbate toxicity. *Free Rad. Res. Commun*. 5, 107

Références bibliographiques

Ho YC, Yang SF, Peng CY, Chou, MY, Chang YC(2007) : Epigallocatechin-3- gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, **36** : 588–93

Hodek P, Trefil P, Stiborova, M(2002): Flavonoids-potent and versatile biologically Active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, **139**: 1-21.

Hodgson JM, Croft KD (2010) : Tea flavonoids and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 495–502.

HOFFMANN L(2003) : Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinat hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de Louis Pasteur-Strasbourg I.

Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB and Rhee SJ (2004): Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* **340**, 107-115.

Horan PG, McMullin MF and McKeown PP (2006) : Anthracycline cardiotoxicity. *Eur Heart J.*, **27**(10): p. 1137-8.

Hortoba' gyi GN (1997) : Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview. *Drugs*; **54**: 17.

Houlot R (1984) : Techniques d'histologie et de cytologie. Paris : Edition Maloine,.
Hoshino T, A Hara, M Inoue, J Honda, Y Imai, K Oizuumi, M M Yokoyami Lab, **36** : 39-43.

Hrdina R, Gersl V, Klimtová I, Simůnek T, Machácková J, Adamcová M (2000): Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica Hradec Král Univ Carol Fac Medica Hradec Král*, **43**(3), 75–82.

Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ(1997) Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members , *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94** : 12401-12406.

Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G(1999) : Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* **18** : 3586-3595.

Hu YW, Liu CY, Du CM, Zhanga J, Wu WQ, Gu ZL (2009) : Induction of apoptosis in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells in vitro by flavonoïds from *Astragalus complanatus*. *Journal of Ethnopharmacology* **123**, 293-301.

Hulbert AJ (2005) On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* **234**, 277- 288.

I

Iarussi. D P, Indolfi F, Casale P, Coppolino M A, Tedesco et M T Di Tullio (2001): «Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood». *Curr Med Chem*, **8**(13), 1649-1660.

Références bibliographiques

Iarussi et al (2001): the Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity in Childhood Current Medicinal Chemistry. Recent Advances, 8(13), 1649-1660(12).

Ibrahim MA, et al(2009) : Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT(1)-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. Pharmacol Res, 60(5): p. 373-81.

IchikawaY, Ghanefar M, Bayeva M, Wu R, Khechaduri A, Naga Prasad SV, et al (2014): Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. J Clin Invest, 124(2), 617–30.

Igney FH, Krammer PH (2002), Death and anti-death: tumourresistance to apoptosis. Nat Rev Cancer. 2 : 277-288.

Iliskovic N, Li T, Khaper N, Palace V, Singal PK (1998): Modulation of adriamycin-induced changes in serum free fatty acids, albumin and cardiac oxidative stress. Mol. Cell. Biochem, 188, 161–166.

Imaizumi K, Morihara T, Mori Y, Katayama T, Tsuda M, Furuyama T, Wanaka A, Takeda M, Tohyama M (1999) The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosisfollowing exposure to amyloid beta protein. **J. Biol. Chem** 274 : 7975-7981.

Imlay JA (2003) : Pathways of oxidative damage. Annu. Rev. Microbiol. 57, 395–418

Ingal PK, Deally CM, Weinberg LE(1987) : Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. J Mol Cell Cardiol;19:817–28.

Ip C, Thompson HJ, Zhu Z, Ganther HE (2000) : In vitro and in vivo studies of methylselenic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemopreventive. Cancer Res;60:2882–2886

Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M ,Burns K, Mattmann C, Rimoldi D French LE, Tschopp J (1997):Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. Nature.Vol. 388, pp. 190-195.

Ishii K, Furuta T, Kasuya Y (2003) : High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. Journal of Chromatography. 749: 49-56.

Ishiko O, T Sumi, H Yoshida, S Ogita , R Yamada(2001) :Int. J. Oncol 18: 1151–1155.

Ismailoglu UB, Saracoglu I, Harput US, Sahin-Erdeli I(2002) :Effects ofphenylpropanoid and iridoid glycosides on free radical-induced impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aortic rings. JEthnopharmacol;79:193–7.

Iwashina T(2000) : The structure and distribution of the flavonoids in plants. Journal of Plant Research, 113: 287–299.

Iwashita K, Kobori M, Yamaki K, Tsushida T. Flavonoids inhibit cell growth and induce apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells. Biosci Biotechnol Biochem. 2000;64:1813–20.

Izzo AA(1996) : PAF and the digestive tract. A review. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 48(11): 1103-1111.

Références bibliographiques

J

James Kang Y , Chen Yan, Epstein Paul N (1996) Suppression of Doxorubicin Cardiotoxicity by Overexpression of Catalase in the Heart of Transgenic Mice Vol. 271, No. 21, Issue of May 24, pp. 12610–12616, 1996

Jang, M, Park, B.C, Lee, A.Y, Na, K.S, Kang, S, Bae, K.H, Myung, P.K, Chung, B.C, Cho, S, Lee do, H. , Park, SG (2007). Caspase-7 mediated cleavage of proteasome subunits during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*;363:p.388-94.

Janicke, RU, Sprengart, ML, Wati, MR , Porter, A.G. (1998) : Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*;273:p.9357-60.

Jarrige R & Ruckebusch Y (1995) : Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion. Editions Quae, p 57.

Javanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic M.J (1994) : Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. **116**: 4846-4851.

Jelnar Al-kaldah Z, R Abudahab, F U Afifi (2010) : Nutrition research, **30** :271-278.

Jenkins A.J., Hill M.A. and Rowley K.G. (2007). Diabetes and Oxidant Stress. *Atherosclerosis and Oxidant Stress. A New Perspective*. Holtzman J.L (ed).p123-160.

Ji LL, Fu R and Mitchell EW (1992) : Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *J Appl Physiol* **73**, 1854-1859

Jianping Zhanga, Lijing Cuib, Xue Hana, Yuanyuan Zhanga, Xuan Zhanga, Xi Chud, Fenghua Zhanga, Ying Zhange,, Li Chua,e, (2017) : Protective effects of tannic acid on acute doxorubicin-induced cardiotoxicity: Involvement of suppression in oxidative stress, inflammation, and apoptosis *Biomedicine & Pharmacotherapy* **93** 1253–1260.

Jimenez-Gonzalez L, Alvarez-Corral M, Munoz-Dorado M and Rodriguez-Garcia I (2008) : Pterocarpan: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, **7**: 125-154.

.Jin YH, Yoo KJ, Lee YH, Lee SK J Biol Chem (2000) : **275** : 30256-30263. Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells.

Jin Z, et W S El-Deiry (2005): «Overview of cell death signaling pathways». *Cancer Biol Ther*. vol. 4, No 2, pp. 139-163.

Junjing Z, Yan Z, and Baolu Z(2010) : Scavenging effects of dexrazoxane on free radicals. *J Clin Biochem Nutr*., **47(3)**: p. 238-45.

Jin Z, El-Deiry WS (2005) : Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*;4:p.139-63.

K

Kabouche A , Kabouche Z, Seguin E, Tillequin F., Bruneau C (2005) : A phenylethanoid glycoside and flavonoids from *Phlomis crinita* (Cav.) (Lamiaceae), *Biochemical Systematics and Ecology* **33** 813e816

Références bibliographiques

- Kalyanaraman B, Sealy RC, and Sinha BK (1984)** : Biochim. Biophys. Acta 779, 270275
- Kalayarasan S, Sriram N, Sureshkumar A, Sudhandiran G (2008)** : Chromium (VI)-induced oxidative stress and apoptosis is reduced by garlic and its derivative S-allylcysteine through the activation of Nrf2 in the hepatocytes of Wistar rats. J Appl Toxicol.; 28(7) : 908-19
- Kamel MS, Mohamed KM, Hassanean HA, Ohtani, K, Kasai R, Yamasaki K (2000)**: Iridoid and megastigmane glycosides from *Phlomis aurea*. Phytochemistry; 55: 353-357.
- Kang YJ, Chen Y, Epstein PN (1996)**: Surexpression of doxorubicin cardiotoxicity by over-expression of catalase in the heart of transgenic mice. J Biol Chem, 271, 12610–6.
- Kanofsky, JR et al (1988)** : Singlet oxygen production by human eosinophils. J. Biol. Chem. 263, 9692–9696
- 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
- Kasai h, Okada y, Nishimura s, Rao m S, and Reddy jK (1989)** : Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. Cancer Res 49: 2603–2605,
- Katagiri M, Ohtani K, Kasai R, Yamasaki K, Yang CR, Tanaka O (1994)** : Diterpenoid glycosyl esters from *Phlomis younghusbandii* and *P. medicinalis* roots. Phytochemistry; 35(2): 439-42.
- .Keaney JF, Schwaery GT, Xu A, Nicolosi RJ, Loscalzo J, Foxall TL, Vita JA (1994)**:17 β -oestradiol preserves endothelium vasodilator function and limits low density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine. Circulation, **89 (5)** : 2251 - 2259.
- Kehrer, JP(1993)**: Free radicals as mediators of tissue injury and disease .critical reviews in toxicology . 23 (1):21-48
- Keizer HG, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Joenje H (1990)**: Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. Pharmacol Ther, 47(2), 219–31.
- Kelishomi RB, Ejtemaemehr S, Tavangar SM, Rahimian R, Mobarakeh, JI, Dehpour AR (2008)** Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. Toxicology 243, 96–104.
- Kelly K J R M, Sandoval KW, Dunn BA, Molitoris et Dagher PC (2003)**: «A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis». Am J Physiol Cell Physiol. Vol. 284, No 5, pp. C1309-1318.
- Kerr JF (2002)** History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. Toxicology **181-182**, 471-4.
- Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR (1972)** : Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer **26**, 239-57.
- Kerr 1 F(1971)** : «Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death». J Pathol. vol. 105, no 1, p. 13-20.

Références bibliographiques

Keshan Disease Research Group (1979) : Observations on effects of sodium selenite in prevention of Keshan Disease. *Chinese Med J*;92:471–476

Khan MTH, Ather A, Thompson KD and Gambari R(2005) : Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, **67**:107–119.

Khan G, Haque SE, Anwer T, Ahsan MN, Safhi MM, Alam MF(2014) :Cardioprotective effect of green tea extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, *Acta Poloniae Pharm. Drug Res.* 71 861–868.

Kim TK (1997):In vitro transcriptional activation of p21 promoter by p53. *Biochem Biophys Res Commun.*Vol. 234,pp. 300-302

Kim K, Takimoto R, Dicker DT, Chen Y, Gazitt Y, El-Deiry WS(2001) : Enhanced TRAIL sensitivity by p53 overexpression in human cancer but not normal cell lines, *Int J Oncol* 18 : 241- 247.

Kim HE, Krug MA, Han I, Ensley J, Yoo GH, Forman JD, Kim HR. (2000) : Neutron radiation enhances cisplatin cytotoxicity independently of apoptosis in human head and neck carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 6 : 4142-4147.

Kim TH (b), Zhao Y, Barber MJ, Kuharsky DK, Yin XM (2000) : Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. *J Biol Chem* 275 : 39474- 39481.

King RJB(1996): Cancer biology. Harlow, Essex, England: Longman.

King-Batoon A, Leszczynska JM, Klein CB(2008) : Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environmental & Molecular Mutagenesis* **49**, 36-45.

Kinsky N (1989) : Antioxydants function of carotenoides. *Free Rad. Biol. Med.* 7, 617.

Kirmizibekmez H, Calis I, Perozzo R, Brun R, Donmez A, Linden A, Ruedi P, Tasdemir D(2004) : Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP Reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *Planta Medica* 70, 711– 717.

Kirmizibekmez H, Montoro P, Piacente S, Pizza C, Doenmez A, Calis I.(2005): Identification by HPLC- PAD-MS and quantification by HPLC-PAD of phenylethanoid glycosides of five *Phlomis* species. *Phytochem Anal*; 16(1): 1-6.

Kivinen K, Kallajoki M , Taimen P(2005) : Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix. *Exp Cell Res*;311:p.62-73.

Knecht KT and Mason RP (1988) : In vivo radical trapping and biliary secretion of radical adducts of carbon tetrachloride-derived free radical metabolites. *Drug Metab. Dispos.* 813-817.

Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer S (1995) : 270 : 96-99. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. Koenig U, Eckhart L, Tschachler E. *Biochem Biophys Res Commun. J. Science.* 2001, 285 : 1150-1154.

Références bibliographiques

Koechlin-Ramonatxo C(2006) : Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*. **20**:165-177.

Kohen, R., Nyska, A (2002) : Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*. **30**: 620-650..

Kondo T, T Matsuda, T Kitano, A Takahashi, M Tashima, H Ishikura, HUmehara, N Domae, T Uchiyama , T Okazaki (2000) :, *J. Biol. Chem*, , 275: 7668–7676.

Konig A, Schwartz GK, Mohammad RM, Al-Katib A, Gabilove JL (1997) : The novel cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol downregulates Bcl-2 and induces growth arrest and apoptosis in chronic B-cell leukemia lines. *Blood*.;**90**:4307–12.

Kooij A, Bosch KS, Frederiks WM and Van Noorden CJF (1992): High levels of xanthine oxidoreductase in endothelial, epithelial and connective tissue cells in rat tissues. A relation between localization and function. *Virchows Archiv [B] Cell Pathology* **62**, 143-150.

Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH(2000) : Cell Death Differ., **7** : 1166-1173. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c.

Koti BC, AHM Vishwanathswamy, Wagawade J, Thippeswamy AHM(2009): Cardioprotective effect of lipistat against doxorubicin induced myocardial toxicity in albino rats, *Indian J. Exp. Biol.* **47** 41–46

Kroemer G and Reed J C (2000) : Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* (**5**):p. 513- 159

Kumral A, Giriş M, Soluk-Tekkeşin M, (2015) : Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats, *Pathophysiology* **22** 117–123.

Kyriakopoulo I, Magiatis P, Skaltsounis AL, Aligiannis N, Harvala C(2001) : Samioside, a new phenylethanoid glycoside with free-radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*. *J Nat Prod*;**64**:1095–7.

L

Lacy A & O’Kennedy R (2004) : Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 3797-3811.

Lake BG (1995) : Mechanisms of hepatocarcinogenicity of peroxisome- proliferating drugs and chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**: 483–507,

Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Booth Jr, Mehal CJ, Inayat WZ, Flavell I., RA(2006) : Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events ofapoptosis. *Science*;**311**:p.847-51..

Lamp WJ (1999) : Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr*;**70**:475S–90S.

LarrosaM,Garcia-ConesaMT,EspinJC,Tomas-BarberanFA(2010) : Ellagitannins, ellagic acid and vascular health.*Molecular Aspects of Medicine*, **31**: 513-539.

Références bibliographiques

lauralee sherwood (2006) : physiologie humain. 2e. Boeck Université. p. 245. Lamkanfi M, Kalai M, Vandenabeele P. Cell Death Differ. 2004, 11 : 365-368. Caspase-12 : an overview

Lauryna Rudziuvelyte, Manta sStan kevicius , Andrius Masuska, Velma Petrikaite (2017) : Chemical composition and anticancer activity of Elsholtzia ciliata essential oils and extracts prepared by different methods Industrial Crops and Products Volume 107

Lavanya Reddivari, Jairam Vanamala¹, Sudhakar Chintharlapalli³, Stephen H.Safe^{2,3} and J.Creighton Miller Jr_ (2007): Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways, Carcinogenesis vol.28 no.10 pp.2227–2235

Lawrenc j. Machlin and adrienne bendiche (1987) :free radicals and antioxidant nutrient ,clinicalnutrition,hoffmann-la roche inc.,nutley, new jersey 07110, usa 141-145.0892

Leblanc V, May P (2002) : Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. Med Sci (Paris).Vol. 18, pp.577-584.

Lee YJ, Erdos G, Hou Z, Kim SH, Kim JH, Cho JM, Corry PM (1994) : Mechanism of quercetin-induced suppression and delay of heat shock gene expression and thermotolerance development in HT-29 cells. Molecular and cellular biochemistry. **137**: 141-154.

Lee WR, Shen SC, Lin HY, Hou WC, Yang LL, Chen YC(2002) : Wogonin and fisetin induce apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by a decrease of reactive oxygen species, and activation of caspase 3 and Ca(2+)-dependent endonuclease. Biochem Pharmacol.;63:225–36.

Leena P, Balaraman R (2011). Effect of Green Tea Extract on Doxorubicin Induced Cardiovascular Abnormalities: Antioxidant Action. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 10 (1), 89-96.

Lehucher-Michel MP, Lesgards JF, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M (2001) Stress oxydant et pathologies humaines. La Presse médicale. **30**: 1076-1081.

Le K, Chiu FNGK.(2007) : Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii . Food vvv Chemistry.; 105: 353-363.

Lenihan DJand Esteva FJ (2008) Multidisciplinary strategy for managing cardiovascular risks when treating patients with early breast cancer. Oncologist,. 13(12): p. 1224-34.

Levine RL (2002) : Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free Radic Biol Med 32, 790-796.

Liang Y, Yan C, Schor NF (2001): Apoptosis in the absence of caspase 3.Oncogene;20:p.6570-8

Li K, Sung RYT, Huang WZ, Yang M, Pong NH, Lee SM, Chan WY, Zhao H, To MY, Fok TF(2006) : Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. Circulation 113, 2211–2220.

Références bibliographiques

Li T (2000) : Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res*, 46(3): p. 523-30.

Li X, Tong W, Bornmann W, Schwartz GK (2000) : Huanglian Chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells. *Molecular Pharmacology* 58, 1287–1293.

Li H, Zhu H, Xu C J and Yuan J (1998) : Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501.

Liu H, Zhang L and Lu S(2012) : Evaluation of antioxidant and immunity activities of quercetin in isoproterenol-treated rats. *Molecules*, **17**: 4281–4291

Li L, pan Q, Han W, Lui Z, Hu X(2007): Schisandrin B prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity via enhancing glutathione redox cycling. *Clin cancer Res*, **13**, 6753-6760.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. (1997) : Cell, Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91** : 479-489.

Lieutachi P(1996): *Le livre des bonnes herbes* ,Edition Révisée PP 410-417.

Lin JK, Weng MS (2006) : Flavonoids as Nutraceuticals. In : *The science of flavonoids*. Grotewold, E. Eds, Springer, Pp: 217.

Link G, Tirosh R, Pinson A, Hershko C (1996). Role of iron in the potentiation of anthracycline cardiotoxicity: identification of heart cell mitochondria as a major site of iron-anthracycline interaction. *J Lab Clin Med*, 127(3), 272–8.

Liouos Ch, Laouer H, Boulaacheb N, Gortzi O, Chinou L (2007): Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Algerian *Phlomis bovei* De Noé subsp. *bovei* , *Molecules*, **12**, 772-781

Liochev S I, & Fridovich I (2002). The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep.*, **7**, 55–57.

Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE (2008). Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart Br Card Soc*, **94**, 525–33.

Liu a, Pu ; Ying, Li Li ; Qi Niu, Rui ; Yin a, WP; Zeng Zhao, T (2008): Two novel nortriterpenes from the roots of *Phlomis umbrosa*, *Chinese Chemical Letters* **19** 1228–1230.

Liu J, Jia L, Kan J, Jin C-h (2013) .In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) . *Food and Chemical Toxicology* ,**51** : 310–316

Liu L., R. Shi, Q. Shi, et al., (2008) Protective effect of saponins from *Panax notoginseng* against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, *Planta Med.* **74** 203–209.

Liu P, Takaishi Y, an Duan HQu (2007): Two new phenylethanoid glycosides from the roots of *Phlomis umbrosa*, *Chinese Chemical Letters* **18** 155–157

Références bibliographiques

Liyana-Pathirana CM and Shahidi F(2006) : Antioxidant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **86**(3): 477–485.

Loche J (1966). Contribution à l'étude des polyphénols de la plante de tabac (Seita, ed). *Ann de la direction des études et de l'équipement, France*, 3 : 15.

Lockshin RA, Zakeri Z (2001) Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2 : 545-550.

Locksley RM, Killeen N, Leonardo MJ (2001):The TNF and TNF receptor super families : integrating mammalian biology. *Cell*. Vol. 104, pp. 487-501.

lou l , zhou j, liu y, yi wei, jiuli zhao, jiagang deng, bin dong, lingqun zhu, aiming wu, yingxi yang, and limin chai (2016) : Chlorogenic acid induces apoptosis to inhibit inflammatory proliferation of IL-6-induced fibroblast-like synoviocytes through modulating the activation of JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways . *PMCID: PMC4840502 ; 11*(5): 2054–2060.

Lv X, Yu X, Wang Y (2012) : Berberine Inhibits doxorubicin-triggered cardiomyocyte apoptosis via attenuating mitochondrial dysfunction and increasing Bcl-2 expression, *PLoS One* 7 e47351.

M

Mader SS (2010). *Biologie humaine, 1ere edition*. Bruxelles: De Boeck,. **Martínez-Cayuela, M. (1995)** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*. **77**: 147-161.

MAGED YOUNES (1999) : Free Radicals and Reactive Oxygen Species Toxycology CHAPTER5 International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva, Switzerland 111-125 .78

Maillard MN, Soum MH, Biovia P, Berset C (1996) : Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. *Lebensm Wiss Technol*;29:238–44.

Majno G et Joris 1 (1995) «Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death». *Am J Pathol*. vol. 146, no 1, p. 3-15.

Makita H, Tanaka T, Fujitsuka H, Tatematsu N, Satoh K, Hara A, et al (1996) : Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Res.*;56:4904–9

Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy et L. Jimenez (2004). "Polyphenols: Food sources and bioavailability." *American Journal of Clinical Nutrition* **79**(5): 727-747.

Manthey JA, Guthrie N, Grohmann K. 2001 Biological properties of Citrus flavonoids Pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem.*;8:135–53.

Mansat V, A Bettaieb, T Levade, G Laurent , J P Jaffrezou, FASEB J. 1997,11: 695–702.

Références bibliographiques

Marin PD, Veitch NC, Grayer RJ, Kite JC, Sokovic M, Janackovic P (2007) :Flavonoids from *Phlomis fruticosa* (Lamiaceae) growing in Montenegro. *Biochemical and Systematic Ecology* 35, 462–466.

Marino M, Masella R, Bulzomi P, Campesi I, Malorni W, Franconi F(2011) :Nutrition and human health from a sex-gender perspective. *Molecular Aspects of Medicine* 32, 1-70.

Markham KR (1982) : Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, Chap. 1 and 2: 1-113.

Marnett LJ (1999):Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83-95.

Martone P, Estevez J, Lu F, Ruel K, Denny M, Somerville C, Ralph J(2009). Discovery of Lignin. *Current biology*, 19(2): 169–75.

Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I(1999) : Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, ; 32(8) : 595-603.

Mates JM (2000) : Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, ; 153(1-3) : 83-104.

Matsuo M, Sasaki N, Saga K and Kaneko T(2005) : Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 28(2): 253–262.

McCord JM (1995) : Superoxide radical: Controversies, contradictions and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 202: 112-117.

Meister A, Anderson ME (1983) : Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52 : 711 - 760.

Medina-Navarro R, Duran-Reyes G, Diaz-Flores M, Vilar-Rojas C(2010) : Protein Antioxidant Response to the Stress and the Relationship between Molecular Structure and Antioxidant Function. *PLoS ONE*, ; 5(1) : e8971.

Medema JP, Scaffidi C, Kischkel F C, Shevchenko A, Mann M, Krammer P H and Peter M E (1997) : FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* 16, 2794-804

Meir S, Kanner J, Akiri B, Hadas SP (1995) Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1813–1817.

Menna. P, Salvatorelli. E, Minotti. G. (2007). doxorubicin degradation in cardiomyocytes. *the journal of pharmacology and experemental therapeutics*, 322, 408-419.

Merken HM et Beecher GR (2000) : "Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(3): 577-599.

Références bibliographiques

Merlino GT, Xu YH, Ishii S, Clark AJ, Semba K, Yamamoto T and Pastan I (1994): Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science* 224: 417-419,

Micheau O & Tschopp J (2003) : Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*;114:p.181-90.

Michel Rieutort (1999) : physiologie animale ; 2ème édition de l'abrégé Physiologie animale.tome 2, MASSON S.A ; chapitre (3), p(29).

Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) : The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological reviews*. 52: 673-751.

Migliardi V, Golino P, Scognamiglio A, Galletti P, Chiariello M, Zappia V (2004) :Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 15:461-466.

Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, Saikumar P (2003) : Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem*. 278 : 5367-5376.

Milane H (2004).La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres;études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat.Strasbourg.

Miles EA, Zoubouli P, Calder PC(2005) :Differential anti-inflammatory effects of compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition*, 21: 389-394

Miller DM, Buettner GR, and Aust SD (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic. Biol. & Med*, 8, 95–108.

Mimnaugh EG, Trush MA, Bhatnagar M,Gram TE(1985) : Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin, *Biochem. Pharmacol.* 34 847–856.

Minotti, G, et al(2004) :Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.*, 56(2): p. 185-229.

Minotti G, Mancuso C, Frustaci A, Mordente A, Santini SA, Calafiore AM, Liberi G, Gentiloni N, (1996) : Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin. *Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity*, *J. Clin. Invest.* 98 (3) 650.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G et Gianni L(2004) : «Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity». *Pharmacol Rev.* vol. 56, no 2, p. 185-229.

Références bibliographiques

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

Miranda CJ, Makui H, Soares RJ, Bilodeau M, Mui J, Vali H, et al. (2003): Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in iron metabolism induced by doxorubicin. *Blood*, 102(7), 2574–80.

Mishra K P, Padwad Y S, Dutta A, Ganju L, Sairam M, Banerjee P K, Sawhney R C(2008) : *Immunobiology* , , 213 :125-131.

Mitchell P (1961) : Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

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 Sei.* vol. 76, no 13, p. 1439-1453

Mladinka P, Zatloukalova L, Filipsky T and Hrdina R(2010) :Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49: 963–975.

Mohamad RH, El-Bastawesy AM,. Zekry ZK (2009): The role of *Curcuma longa* against doxorubicin (adriamycin)-induced toxicity in rats, *J. Med. Food* 12 394–402.

Mohamad N A, Gutierrez M,Nunez C, Cocca G, Martin G, Cricco V , Medina E, Rivera , Bergoc R(2005). «Mitochondrial apoptotic pathways». *Biocell!*. Vol. 29, No 2, pp. 149-161.

Mohamed F, Stuart OA, Glehen O,Urano M (2006) : Sugarbaker.Optimizing the factors which modify thermal enhancement of melphalan in a spontaneous murine tumom.*Cancer Chemolher Pharmacol.* vol. 58, no 6, p. 719-724. En ligne.

Mohajer M, Sarkhail P, Hajarolasvadi N, Zamani MJ, Khorasani R, Shafiee A, et al. (2005) : Antiinflammatory and analgesic effects of *Phlomis lanceolata* Boiss. and Hohen. Extracts and examination of their components. *Int J Pharmacol*;2:50–4.

MolyneuxP,SongklanakarJ(2004) :Theuse of the stable free radical diphenyl picrylhydrazyl (DPPH)for estimating antioxidant activity.*SciencesTechnology*, 26 (2) :211-219.

Momin Firoz, Shabina Shaikh, Naziya Khan, T.S. Rutika Joshi, N. Naikwade, (2011) Cardioprotective effect of *Ixora coccinea* Linn. flower extract on doxorubicin induced cardiomyopathy in rats, *Pharmacologyonline* 3 1145–1158.

Mompon B, Lemaire B, Mengal P, Surbled M (1998) : Extraction des polyphénols : dulaboratoire à la production industrielle. Ed. INRA, Paris (les Colloques, N° 87).

Références bibliographiques

Monsuez JJ(2010) : Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *Int J Cardiol*, 144(1): p. 3-15.

Morris CJ, Earl JR, Trenam CW, Blake DR(1995) : Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 27: 109-122.

Moro S, Beretta GL, Dal Ben D, Nitiss J, Palumbo M, Capranico G (2004). Interaction model for anthracycline activity against DNA topoisomerase II. *Biochemistry (Mosc)*, 43(23), 7503–13.

Morrow DA, Cannon CP, Jesse RL (2007). National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. *Circulation*, 115, 356–75.

Mross K, Mayer U, Hamm K, Burk K, Hossfeld DK (1990). Pharmacokinetics and metabolism of iodo-doxorubicin and doxorubicin in humans. *EurJ Clin Pharmaco*, 39, 507-513.

MUANDA FN(2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat : Université PAUL VERLAINE-METZ.

Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L (2009) Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296(5), H1466–83.

Mukherjee S., Banerjee SK, Maulik M (2003): Protection against acute adriamycin-induced cardiotoxicity by garlic: role of endogenous antioxidants and inhibition of TNF- α expression, *BMC Pharmacol*. 3 16.

Mukohata Y, Nakabayashi S, & Higashida M (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218.

Mulvihill EE,Huff MW (2010).Antiatherogenic properties of flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Canadian Journal of Cardiology*, 26 : 17-21.

Murray R, Kaplan A, Mosby Co, Louis St (1984). Aspartate aminotransferase. *Clin Chem The C.V*, 1112-1116.

Mutoh M, Takahashi M, Fukuda K, Komatsu H, Enya T, Matsushima HY(2000) Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: Structure-activity relationship. *Jpn J Cancer Res.*;91:686–91.

Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS, Dixit VM(1998) :An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem.*, 273 : 2926-2930.

Myers C(1998) The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy, *Seminars in Oncology* 25 (Suppl. 10 (4)) 10–14.

N

Nair CK, Indu R, Azhar T, Nair A(2014) :Amelioration of doxorubicin induced cardio- and hepato-toxicity by carotenoids, *J. Cancer Res. Ther.* 10 62.

Nagata S (1997). Apoptosis by death factor.*Cell.* ; 88 :p.355-365.

Références bibliographiques

- Nagi MN, Mansour MA(2000)** : Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res*; **41**: 283–9.
- Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T(1997)**: Dose-dependent incorporation of tea catechins (–)-epigallocatechin-3-gallate and (–)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* ; 61 : 1981-5.
- Narayana, KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishina DR (2001)** : Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. **33**: 2-16
- Nathan C and Shiloh MU (2000)** Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8841–8848
- Naumann U, Kugler S, Wolburg H, Wick W , Rascher G, Schulz JB, Conseiller E, Bahr M,Weller M(2001)** : *Cancer Res*, , 61: 5833–5842.
- Neuzil J, Stocker R (1993)** : Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett*, **331 (3)** : 281 - 284.
- Newman PR, Timmerman BN, Marby TJ (1974)** : Laboratory manual for the systematic identification of flavonoids. *Médecine d’Afrique Noire*.55: 8-9.
- Nijhoff WA, Groen GM, Peters WH 1993.** Induction of rat hepatic and intestinal glutathione S-transferases and glutathione by dietary naturally occurring anticarcinogens. *Int J Oncol.*;3:1131–9.
- NISHIKIM M(1975)** : Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 463-468.
- Nishizuka Y 1986:** Studies and perspective of protein kinase C. *Science (Wash DC)* 233: 305-312.
- Nishizuka Y:** Protein kinase and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9: 484-496, 1995.
- Nitiss JL (2009):** Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 9(5), 338–50.
- Nitsch JP, Nitsch C (1961)** : Synergistes naturels des auxines et des gibberellines. *Bull. Soc. Fr*, 26: 2237-2240.
- Noha Ahmed EL-Boghdady (2013).** Increased cardiac endothelin-1 and nitric oxide in adriamycin induced acute cardiotoxicity: protective effect of Ginkgo biloba extract indian journal of biochemistry & biophysics . 50, 202-209
- Nohl H, Gille L, Staniek K (2004).** The mystery of reactive oxygen species derived from cell respiration. *Biochemical Society Transactions*, 51 : 223 - 229.
- Norbury CJ,Hickson ID (2001).** Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 367-401.

O

Références bibliographiques

OCKNER R, KAIKAUS KRM(1993) : BASS. Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: review transand hypothesis. *Hepatology* 18: 669–676.

OIKAWA,NOVIKOFFPM(1995) : Catalase-negative peroxisomes: transient appearance in rat hepatocytes during liver regeneration after partial hepatectomy. *Am. J. Pathol.* 146: 673–687,

Okado-Matsumoto A and Fridovich I (2001) Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276, 38388-38393.

Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M. Intestinal absorption of luteolin and luteolin-7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett.* ; 438 : 220-4

O’Kennedy, R., and Thornes, R.D. (ed) (1997). Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.

Olivier da silva C,Santos D N,Ruffetto LC,Minetto L,et al (2017) :Antitumor activity of Brazilian red propolis fractions against Hep-2 cancer cell line *biomedicine & pharmacotherapy* ,Volume 91, 951-963.

Oliveira PJ(2004) :Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 200(2): p. 159-68.

Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR (1995). Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol*, 26(4), 1068–1079.

Olson RD, Boerth RC, Gerber JG, Nies,AS(1981) : *Life Sci.* 29, 1393–1401

Omulokoli E, Khan B and Chhabra SC (2000). Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 56, 133-137.

Orlofsky A, Weiss LM, Kawachi N, Prystowsky MB (2002) : Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response ,*J Immunol.* 168 : 1840-1846.

Osman Kozluca, Ekmel Olcayb, Selqok SiirMic, Zeki C&and, Tiilin Kulaksiz, Necdct uskent’ (1996) : Prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity by catechin *ELSEVIER Cancer Letters* 99 1-6

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.

OZAWA, T. 1995 Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1271: 177–189.

P

Pacher P., Nivorozhkin A. and Szabó C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of Allopurinol. *Pharmacol. Rev.*58, 87-114.

Packer L, Tritschler HJ and Wessel K (1997) Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 22, 359-378.

Références bibliographiques

Palani S., M. Jayakumar, S. Karthi, S. Raja (2012) : Protective effects of Flacourtia indica on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats, *Toxicol. Environ. Chem.* 94 1014–1025.

Pal Yu B (1994) Cellular defences against damage from reactive oxygen species . *Physiopathological Reviews.* 74: 139-155

Palozza P, Simone R, Picci N, Buzzoni L, Ciliberti N, Natangelo A, Manfredini S, Vertuani S. Design (2008) :synthesis, and antioxidant potency of novel alpha-tocopherol analogues in isolated membranes and intact cells. *Free Radic Biol Med,* ; 44(7) : 1452-64

Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A and Barja G (2000) Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev* 112, 169-183.

Panda S, Kar,A (2009) :Periplogenin-3-O–D-Glucopyranosyl-(1!6)–D-Glucopyranosyl–(1!4)-d-cymaropyranoside, isolated from *Aegle marmelos* protects doxorubicin induced cardiovascular problems and hepatotoxicity in rats, *Cardiovasc. Ther.* 27 108–116.

Park, ES (2003) Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats. *J Vet Sci.*, 4(2): p. 129-36

Pari L, Latha M (2005). Antidiabetic effect of *Scoparia dulcis*: effect on lipidperoxidation

Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH and Kim SH (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Archives of pharmacal research*, 31(10):1303-11.

Parks DA and Granger DN (1986). Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and pathology. *Acta. Physiol. Scand.* [Suppl]. 548, 87-99.

Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M (2000) A detailed interpretation ofOHradical footprints in a TBPDNAcomplex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencesspecific binding. *J. Mol. Biol.*, 304, 55–68.

Patel.SS, VermaNK,RathoreB,Nayak G, Singhai AK, Singh P (2011). Cardio-protective effect of *Bombax ceiba* flowers against a cute adriamycin induced myocardial infarction in rats. *Revista Brasileirade Farmacognosia*, 21, 704–709.

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.

Pelletier. E, Campbell. P. G. C. & Denizeau. F. (2004). Écotoxicologie moléculaire : Principes fondamentaux et perspectives de développement. 182.

Peng J, Jones GL and Watson K (2000) Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic Biol Med* 28, 1598-1606.

Pénicaud C (2009). Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de montpellier ii**Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. (2010).**Flavonols and cardiovascular disease.*Molecular Aspects of Medicine*, 31: 478–494.

Références bibliographiques

Pesce A, Kaplan A (1984). Lactate dehydrogenase. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, 438, 1124-117

Peter ME, Krammer PH(2003) :The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. Cell Death Differ **10**, 26-35.

Peterson J, Dwyer J, Adlercreutz H, Scalbert A, Jacques P , McCullough ML(2010) : Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. Nutr. Rev. **68**(10), 571–603.

Peters U, Poole C, Arab L(2001). Does tea affect cardiovascular disease? A metaanalysis. American Journal of Epidemiology, **154** : 495–503.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW, Biochim Biophys Acta(2004) : Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. Pottier-Alapetite, G., 1981. Flore de la Tunisie. Ed. Imprimerie officielle de la republique Tunisienne, Tunis1644 : 83-94.

Petti S, Scully C(2009). Polyphenols,oral health and disease:A review.Journal of dentistry, **37** : 413-423.

Peynet J., Beaudoux J.L. and Legrand A (2005). Stress oxydant et athérosclérose. In “Delattre Beaudoux J. and Bonnefont-Rousselot J.L.D. (Eds.), Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques”. Lavoisier, édition TEC & DOC éditions médicales internationales. Paris. pp: 312-351.

Phillips et al (1996). Adriamycin-induced DNA Adducts Inhibit the DNA Interactions of Transcription Factors and RNA polymerase. The Journal of Biological Chemistry, **271**, 5422- 5429.

Picq M, Dubois M, Munari-Silem Y, Prigent A-F and Pacheco H(1989): Flavonoid modulation of protein kinase C activation. Life Sci **44**: 1563-1571,

Pietta PG(2000) :Flavonoids as antioxidants. Journal of natural products. **63**: 1035-1042.

Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD, Remacle J (1990) :Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. Mech Ageing Dev,; **51**(3) : 283-97.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne JO(1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. Vaisseaux, Cœur, Poumons,; **4**(5)

Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne JO (2002) Physiological action of antioxidant defenses. Nutrition Clinique et Métabolisme. **16**: 233-239.

Plana JC (2011) :Chemotherapy and the heart]. Rev Esp Cardiol, **64**(5): p. 409- 15.

Porter KE,Turner NA (2009). Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. Pharmacol Ther, **123**(2), 255–78.

Potapovich A I,Lulli D,Fidanza P,Kostyuk VA,De Luca C,Pastore S, Korkina LG(2011) : Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFκB and AhR and EGFR–ERK pathway.Toxicology and Applied Pharmacology,**255** : 138–149.

Potter A I, Rabinovitch PS (2005) : «The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs». Mutat Res. vol. **572**, no 1-2, p. 27-44.

Powell SR, McCay PB(1988) :Toxicol. Appl. Pharmacol. **96**, 175–184

Références bibliographiques

Powers SK and Lennon SL (1999) Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.

Prabhakar M, Manoharan Sh, Rejitharaji Th, Selvasundaram R ,Villianur (2015) :Ferulic Acid Reduces Cell Viability Through Its Apoptotic Efficacy:And In vitro Approach *British Journal of Medicine & Medical Research*5(5):612-621, 2015 Article no.BJMRR..065 ISSN: 22310614

Price MP and Butler LG(1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 25, 1268-1273.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999) : *Mol Cell.*, 3 : 287-296. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interactionwith the dynein motor complex.

Purring-Koch C, McLendon G (2000) Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength.*Proc Natl Acad Sci U S A.*97 : 11928-11931.

Q

Quezel P, Santa S, 1963 Nouvelle flore de l'Algerie et des regions desertiques etmeridionales. Tome II. Editions CNRS, Paris.

Quiles JL (2002) : Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology.*, 180(1): p. 79-95.

U

Uma Mahesh B, Shrivastava S, Kuncha M (2013): Ethanolic extract of *Boswellia ovalifoliolata* bark and leaf attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36 840–849.

Usuda N, Reddy MK, Hashimoto T, Rao MS, Reddy JK(1988) : Tissue specificity and species differences in the distribution of urate oxidase in peroxisomes. *Laboratory Invest.* 58, 100-111.

R

Raab O(1900).Uber die wirkung fluoroscierender stoffe auf infusoria. *Z Biol*;39:p.524 530.

Raber SR, Rushing DA, Rodfold KA, Piscitelli SC, Plank GS, Tewkbury DA (1994). Effects of cyclosporin (CSA) on the pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PF) of doxorubicin (DOX). *Clin Pharmacol Ther*, 189.

Rafi MM, Rosen RT, Vassila, Ho CT, Zhang H ,Ghai G (2000): Modulation of bcl-2 and cytotoxicity by licochalcone-A,a novel estrogenic flavonoid, *Anticancer Res.* Vol.20,pp. 2653–2658.

Rahman K.(2007) : Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging.*; 2(2) : 219–36.

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla vK (2005) : Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Law Extrem Wounds.*vol. 4, no 3, P. 138-144.

Ramel A, Wagner KH, Elmadfa I (2004) : Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *Eur J Nutr* 43, 2-6.

Ramirez DC, Gomez-Mejiba SE, Corbett JT, Deterding LJ, Tomer KB, Mason RP (2008) : Cu, Zn-Superoxide Dismutase-driven Free Radical Modifications: Copper- and Carbonate Radical Anion-initiated Protein Radical Chemistry. *Biochemical Society*, 10 : 1 - 25.

Références bibliographiques

aschi E (2010) : Anticancer drugs and cardiotoxicity: Insights and perspectives in the era of targeted therapy. *Pharmacol Ther*, 125(2): p. 196-218.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002) : Mitochondria, the killer Organelles and their weapons. *Journal of cellular physiology* 192, p.131-137

Rayman MP, Clark LC(2000): Selenium in cancer prevention. In: Roussel AM, Anderson RA, Favier AE, editors. *Trace Elements in Man and Animals*. New York: Plenum Press. 575–580 Proceedings of the tenth international symposium on trace elements in man and animals.

Rechinger KH(1982): *Flora Iranica*. Graz-Austria: Akademik Druck-u. Verlagsanstalt;; 150: 292-313.

Renaud J, Martinoli MG (2011) : Propriétés neuroprotectrices, antioxydantes et anti-inflammatoires du resvératrol dans les neurones dopaminergiques. *Médecine Sciences Amérique*, 1(1): 1–14.

Rice-Evans C(2001) :Flavonoid as Antioxydants. *Current medicinal chemistry*. **8**: 797-807.

RichT, Allen RL ,Wyllie AH(2000): Defying death after DNA damage. *Nature*.Vol. 407,pp. 777-783.

Rich T, Stephens R, Trowsdale J (1999) : MHC linked genes associated with apoptosis/programmed cell death. *Biochem Soc Transactions*. ; 27 :p.781-785.

Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O’Connell J(1995). Report of the 1995 World Health Organization. International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies *Circulat*.

Richter C, Park JW and Ames BN (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6465-6467.

Roben J (1992). Pharmacologie de la doxorubicine et de ses dérivés. *Cancerologie Aujourd’hui*, 27-35.

Robinson MF, Campbell DR, Stewart RD, Rea HM, Thomson CD, Snow PG(1981) : Effect of daily supplements of selenium on patients with muscular complaints in Otago and Canterbury. *New Zealand Med J*;93:289–291.

Robbins R J (2003) : "Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(10): 2866-2887.

Rodriguez J and Lazebnik Y(1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**, 3179-84.

Romaol Tovar J, Fonseca SG, Moraes RH, Cruz AK, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA, Ferreira SH, Cunha FQ (2006): Glutathione and the redox control system trypanothione/trypanothione reductase are involved in the protection of *Leishmania* spp. Against nitrosothiol-induced cytotoxicity *Braz J Med Biol Res*, ; 39(3) : 355-363.

Rong Y, Yang EB, Zhang K (2000) : Mack P. Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U937 in vitro and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res*.;20:4339–45.

Roux D , Catier O (2007) : *Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie*. Wolters Kluwer France Edition, p 74..

S

Saad. SY, Najjar. TA, Al-Rikabi. AC. (2001). The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res*, 43, 211–218.

Références bibliographiques

Sakagami H, Satoh K(1997) : Modulating factors of radical intensity and cytotoxic action of ascorbate. *Anticancer Res.* 17, 3513.

Sakagami H, Satoh K, Hakeda Y, Kumegawa M (2000) : Apoptosis- inducing activity of vitamin C and vitamin K. *Cell. Mol. Biol.* 46, 129.

Sakagami H, Jiang Y, Kusama K, Atsumi T, Ueha T, Toguchi M, Iwakura I, Satoh K, Ito H, Hatano T, Yochida T (2000) : *Phytomedicine*, 7 : 39-47.

Saleh NK, Saleh HA(2011): Olive Oil effectively mitigates Ovariectomy induced Osteoporosis In Rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, p 11-10.

Samuni A, Aronovitch J, Godinger D, Chevion M, Czapski G (1983). On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. *Eur. J. Biochem.* 137, 119.

Sanger J (1992): ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer;(10), p (117–27).

Santos DL, Moreno AJ, Leino RL, Froberg MK, Wallace KB (2002): Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicol Appl Pharmacol*, 185, 218–227.

Saracoglu I, Inoue M, Calis I, Ogihara Y (1995) : Studies on constituent with cytotoxic and cytostatic and activity of two Turkish medicinal plant *Phlomis armenica* and *Scutellaria salviflora*. *Biol Pharm Bull*;18:1396–400.

Saracoglu I, Kojima K, Harput US, Ogihara Y (1998) : A new phenylethanoid glycoside from *Phlomis pungens* Willd. var. *pungens*. *Chem Pharm Bull*; 46(4): 726-727.

Saracoglu I, Inoue M, Calis I, Ogihara Y(1995) : Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca*

Sarkhail P, Abdollahi M , Shafiee A (2003) : Antinociceptive effect of *Phlomis olivieri* Benth., *Phlomis anisodonta* Boiss and *Phlomis persica* Boiss, Total extracts , *Pharmacological Research* 48 263–266

Sarkhail P, Rahmanipour S, Fadyevatan S, Mohammadirad A, holamreza Dehghan G,G ,holamreza A, Shafiee A, Abdollahi M (2007): Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes, *Pharmacological Research* 56261–266

Sarkhail P, GHolamreza A, SHafieea A (2006): C omposition of the essential oil of *PHlomis olivieri* benth from north of iran . *DARU* Volume 14, No. 2, 71.

Sarkhail P, Abdollahi M, Shafiee A (2003) : Antinociceptive effect of *Phlomis olivieri* Benth., *Phlomis anisodonta* Boiss. and *Phlomis persica* Boiss. total extracts. *Pharmacol Res.*; 48(3): 263-

Sarkhail P, Monsef-Esfehani HR, Amin G, Surmaghi MHS, Shafiee A(2006) Phytochemical study of *Phlomis olivieri* Benth. and *Phlomis persica* Boiss. *Daru* 14:115–21.

Sarkhail P, Abdollahi M, Shafiee A(2003): Antinociceptive effect of *Phlomis olivieri* Benth., *Phlomis anisodonta* Boiss. and *Phlomis persica* Boiss. total extracts, *Pharmacological Research* 48 263–266.

Satish K, Srivastava K, Ramana V, Aruni Bhatnagar (2005). Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic

Sathishsekar D, Sivagnanam K, Subramanian S (2005). *Die Pharmazie. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 60(Number 5), 383-387.

Références bibliographiques

Savoie J-M, Minvielle N, Largeteau ML (2008): Radical scavenging properties of extracts from the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Sci. Food Agric*, 88, 970–975.

Scalbert A (1991): Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.

Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C (2005): Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287–306.

Schagger H and von Jagow G (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223-231.

Schewe, T., Sies, H. (2003) Flavonoids as protectants against prooxidant enzymes. *Biologie médicale*. 34: 243-253.

Sharififar F, Dehghan-Nudeh G, Mirtajaldini M (2008): Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chemistry*, 1-19.

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.

Schlörff EC, Husain K, Somani SM (1999): Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol*, ; 17(2) : 97-105.

Schreck R, Ricber P, Baeuerle PA (1991): *EMBO J.* 10, 2247^2258.

Schutte B, Henfling M, Kolgen W, Bouman M, Meex S, Leers MP, Nap M, Bjorklund, V, Bjorklund, P, Bjorklund, B, Lane, E.B, Omary, M.B, Jornvall, H, Ramaekers, F.C. (2004). Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res*; 297: p.11-26.

Segal, A.W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197–223

Senderowicz AM. Flavopiridol 1999. The first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. *Invest New Drugs.*; 17: 313–20.

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.

Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K. (2006) Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Journal of phytochemistry*. 67: 2058-2070.

Sheng-Teng H, Y Rong-Chi, Jong-Hwei SP (2004): *The American Journal of Chinese Medicine*, , 32 : 175–183.

Shi L et al (2005): Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under in vitro conditions affecting aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15629– 15634

Shin TY, Lee JK (2003): Effect of *Phlomis umbrosa* root on mast cell-dependent immediate-type allergic reactions by anal therapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 25(1): 73-85.

Shu-Qi Wang, Xiu-Zhen Han, Xia Li, Dong-Mei Ren, Xiao-Ning Wang, Hong-Xiang Lou (2010): Flavonoids from *Dracocephalum tanguticum* and their cardioprotective effects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cells *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20 6411–6415

Références bibliographiques

- Siddhuraju P, Becker K (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chem*, 101: 10-19.
- Sies H. 1999** Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*; 27(9-10) : 916-21.
- Singal PK, Iliskovic N (1998) :** Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med* 339:900–905
- Singh G, Singh AT, Abraham A, Bhat B, Mukherjee A, Verma R, Agarwal SK, Jha S, Mukherjee R, Burman AC (2008).** Protective effects of *Terminalia arjuna* against Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Ethnopharmacol*, 17, 117(1):123-9.
- Sitar Sandra M (1999):** effects of oxidative stress and propofol on astrocyte function , of the requirements for the degree of Master of Science ; The University of Western Ontario London.
- Siveski-Iliskovic N (1995) :** Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*,. 91(1): p. 10-5.
- Skibola CF, Smith MT(2000) :** Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and medicine*, 29(3-4): 375–383.
- Skulachev VP (1998)** Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* 423, 275-280.
- Slee EA, Adrain C , Martin SJ (2001).** Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*;276:p.7320-6.
- Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh, JH, Hagen TM (2004) :** Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem*, 11: 1135– 1146.
- Soo Cheon C, Jai-Heon L , Sang UP(2013) :** Recent studies on flavonoids and their antioxidant activities. *Experimental and Clinical Sciences*, 12: 225–230.
- Sohal Rs, Weindruch R(1996) :** Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* , 273 : 59-63
- Sokovic MD, Marin PD, Simic D, Knezevic-Vukcevic J, Vajs V, Petrovic S(2002) :** Antimutagenic activity of essential oil and crude extract of *Phlomis fruticosa*. *Pharm Biol (Lisse, Netherlands)*;40:311–4.
- Sorg, O.(2004)** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus aaabiologies*. 327: 649-662.
- Soudani N,Ben Amara I, Sefi M, Boudawara T, Zeghal N(2011):**Effects of selenium on chromium(VI)-induced hepatotoxicity in adult rats. *Exp Toxicol Pathol*, b ; 63(6) : 541-8.
- Speyer JL ; Green MD ; Zeleniuch-Jacquotte A; Wernz JC ; Rey M ;** vitro antioxidant activities of *Solanum surattense* leaf extract *Asian Pac J Trop Biomed*. 3(1), 28-34.
- Sridevi Muruhan et al. (2013).** In Santini, V., **Amifostine 2001:** chemotherapeutic and radiotherapeutic protective effects. *Expert Opin Pharmacother*., 2(3): p. 479-89.
- Stafford HA(1990):** Flavonoid metabolism. CRC Press, Boca Raton, FL. 298 pages.
- Souza HP, Laurindo FRM, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL (2001).** Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular activity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 (2) : H658-H667.
- Stebens WE(2003) :** Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. *Exp Mol Pathol* , ; 75(3) : 265-76.

Références bibliographiques

Steele VE, Kelloff GJ, Balentine D, Boone CW, Mehta R, Bagheri D(2000) Comparative chemopreventive mechanisms of green tea, black tea and selected polyphenol extracts measured by in vitro bioassays. *Carcinogenesis*;21:67–3.

Stecher G, Huck CW, Popp M, Bonn GK (2001) : "Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC-ESI-MS-MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **371**(1): 73-80.

Steller H, Science (1995) : Mechanisms and genes of cellular suicide. 267: P.1445-1449

Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V (2013) : Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*. Mar 10;18(8):899–929.

Strasser A (2005) : The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*. Mar;5(3):p.189-200.

Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R and Culotta VC (2001) : A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 276, 38084-38089.

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ and Brand MD (2002) : Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277, 44784-44790.

Subhash C ;Joshi A ; Arti R ; Verma B ; Chandra S ; Mathela A(2010) : Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species *Food and Chemical Toxicology*;48 : 37–40

Subramanian kaviarasan, nalini ramamurty, palani gunasekaran, Elango varalakshmi and carani venkatraman anuradha (2006) : Fenugreek (*trigonella foenum graecum*) seed extract prevents Ethanol-induced toxicity and apoptosis in chang liver cells *Alcohol & Alcoholism* Vol. 41, No. 3, pp. 267–273, doi:10.1093/alcalc/agl020

Sugiyama M (1992) : Role of physiological antioxidants in chromium (VI) induced cellular injury. *Free Radic Biol Med*, ; 12 : 397–407.

Sukardiman, Darwanto A, Tanjung M, Darmadi MO (2000) : Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) in cell culture of human mammary carcinoma. *Clin Hemorheol Microcirc*.;23:185–90

Surh YJ (2003) : Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* **3**, 768-780.

Swain SM (1997) : Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol*., 15(4): p. 1318-32.

T

Takemura G, Fujiwara H (2007) : Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Diseases* 49, 330–352. Kyriakopoulou I, Magiatis P, Skaltounis AI, Aligiannis N, Harvala C, Samioside R. A new phenylethanoid glycoside with free-radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*. *J Nat Prod* 2001;64:1095–7.

Tanaka T, Makita H, Kawabata K, Mori H, Kakumoto M, Satoh K (1997) : Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis By the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin. *Carcinogenesis*.;18:957–65.

Références bibliographiques

Tang D , Kidd VJ (1998) : Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem*;273:p.28549-52.

Tannock, Ian, Richard P, Hill. (1998): The basic science of oncology. McGraw-Hill Health Professions Division, 539 p.

Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M (2005) : Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* **90**, 333-340.

Thayer WS (1985) Decreased cardiac lipoprotein lipase activity in rats treated chronically with adriamycin, *Life Sci.* 36 (7) 635–641.

Thompson M, Williams CR, Elliot GEP (1976) : Stability of flavonoid complexes of Cu(II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta.* 85, 375-381.

Thompson CB, Science (1995) : 267: 1456-1462. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) : *Science.*, 281 : 1312-1316. Caspases: enemies within.

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW. *J Biol Chem* (1997) : A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. 272 : 17907-17911

Thornberry NA, Peterson EP, Zhao JJ, Howard AD, Griffin PR, Chapman KT. (1994) : Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. *Biochemistry.*, 33 : 3934-3940.

Thornberry NA, Rosen A, Nicholson DW (1997) .Control of apoptosis by proteases. *Adv Pharmacol.*; 41 :p. 155-177

Tian Z, S Chen ,Y Zhange, M Huang, L Shi, F Huang, C Fong M, Yang, P Xiao (2006) :*Phytomedicine*, , 13 : 181-186.

Tietz. N W et al (1995): Clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd ed AACC

Tortora GJ, Grabowski SR (1994) :Principes d'anatomie et de physiologie .Boeck Université

Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*, 2007 ; 43(1) : 4-15.

Trabut L(1935) : , In Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique, , Collection du centenaire de l'Algérie. Imprimeries "La Typo-Litho" et Jules, Carboneil Réunies, Alger, p. 190.

Troyano A, Fernández C, Sancho P (2001): Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation, *J. Biol. Chem.* 276 47107–47115.

Toshiko Makino, Ryoko Tsubouchi, Keiko Murakami, Miyako Haneda and Masataka Yoshino (2006) : Generation of Reactive Oxygen Species and Induction of Apoptosis of HL60 Cells by Ingredients of Traditional Herbal Medicine, *Sho-saiko-to* Haut du formulaire Bas du formulaire Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 98, 401–405.

Références bibliographiques

Tsimogiannins DI, Oreopoulou V (2006) : The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.

Elliot GEP (1976) : Stability of flavonoid complexes (II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta.* 85, 375-381.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.

V

Vaclavikova R, Kondrova E, Ehrlichova M, Boumendjel A, Kovar A, Stopka P (2008) : The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism. *Bioorg Med Chem*;16:2034-42.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) :Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions.* **160**: 1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin Mark T.D, Mazur M a, Telser J (2007) :Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 44-84.

Van Acker SABE, Van Den Berg DJ., Tromp MN., Griffioen DH, Bennenkom WPV, Van Der Vijgh WJF, Bast A (1996): Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free radical biology & medicine.* **20**: 331-342.

Van Stijn MF, Ligthart-Melis GC, Boelens PG, Scheffer PG, Teerlink T, Twisk JW, Houdijk AP, Van Leeuwen PA (2008): Antioxidant enriched enteral nutrition and oxidative stress after major gastrointestinal tract surgery. *World J Gastroenterol*, ; 14(45) : 6960-9.

Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W, Vandenaabeele P(1999) : Cell Death The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Differ.*, 6 : 1117-1124.

Van Rij AM, Thomson CD, McKenzie JM, Robinson MF. Selenium deficiency in total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 1979;**32**:2076-2085.

Van Gurp, M., Festjens, N., Van Loo, G., Saelens, X. & Vandenaabeele, P. (2003) :Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 34,p. 487-497.

Vander LE, Roelofs HM, Nagengast FM(2003) : Peters WH. Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyl transferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. *Carcinogenesis*.;24:1651-6.

Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA, Kalyanaraman B (1997) : Endothelial nitric oxide synthase dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*;36:11293-7.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Nature (1988) : Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-Myc to immortalize pre-B cells.335 ,p.440-442.

Vejpongsa P, Yeh ETH (2014) : Prevention of anthracycline induced cardiotoxicity :challenges and opportunities . *J Am Coll Cardiol*, 64(9), 938-45.

Verdan AM, Wang HC, García CR, Henry WP, Brumaghim JL(2011) : Iron binding of 3- hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the

Références bibliographiques

antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1314-1322.

Vergely C D S (2007): Preventing the cardiotoxic effects of anthracyclines: from basic concepts to clinical data. *Heart Metab*, 35, 1–7.

Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer S (1993) : deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis , polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *J. Cell* 75 :229-240. Bcl-2-

Vickers A (2002) : Botanical medicines for the treatment of cancer: rationale, overview of current data, and methodological considerations for Phase I and II trials. *Cancer Investigation* 20, 1069– 1079.

Vikas S, Warpe , Vishal R. Mali , Arulmozhi S , Subhash L. Bodhankar , Kakasaheb R. Mahadik (2015) : Cardioprotective effect of ellagic acid on doxorubicin induced cardiotoxicity in wistar rats, *Journal of Acute Medicine* 5 1e8

Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, Adams JM, Strasser A (2003) : p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302 : 1036-1038.

Vincent AM, Russeli JR, Low PH, Feldman EL (2004): Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews* 25(4):612–628.

Vivaces (2007) : Pépinière de l'Armalette - Catalogue 1-27 *Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 : 44–84

Vouldoukis I, Sivan V, Vozenin M C, Kamate C, Calenda A, Mazier D, Dugas B (2000) : apoptosis th. *Mol. Med*, , 6: 1042–1053.

Vundac' VB, Brantner AH, Plazibat M (2007) : Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem*;104:1277–81.

W

Walker R, Milford D, Dersyshire P (1992): Bradycardia after amphotericin, irradiation and anthracycline. *Lancet* , II , 380.

Walker DB (2006): Serum chemical biomarkers of cardiac injury for nonclinical safety testing . *Toxicol. Pathol*, 34(1), 94 – 104.

Wang D, Tang W, Yang GM and Cai BC(2010) : Anti-inflammatory, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Flavonoids from *Oxytropis falcata* Bunge. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 6(8): 461–465.

Wang Q, Wang H and Xie M (2010) : Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. *Archives of Microbiology*, 192: 893–898.

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 leukaemia HL- 60 cells. *Eur J Cancer*.;35:1517–25

Wang X, Martindale JL, Liu Y and Holbrook NJ (1998) : *Biochem. J.* 333, 291^300. *Pharmacol. Toxicol.* 39, 67^101.

Wang X, Chen L, Wang T (2015): Ginsenoside Rg3 antagonizes adriamycin- induced cardiotoxicity by improving endothelial dysfunction from oxidative stress via upregulating the Nrf2-ARE pathway through the activation of akt, *Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharmacol.* 22 , 875–884.

Références bibliographiques

Wang HK (2000) : The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opin Invest Drugs*;9:2103–19.

Wang X, Zhang J, Kim HP, Wang Y, Choi AM, Ryter SW, Bcl-XL, Widlak, P Garrard, W.T. (2005). Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem*;94:p.1078- 87

Wardman P, Candeias LP (1996) : Fenton chemistry : an introduction. *Radiat Res*, 145 (5) : 523 - 531.

Waugh A, Grant A, Cosserat J, Ross et Wilson (2015) : Anatomie et physiologie normales et pathologiques (éd. 12e édition). (E. Masson, Éd.) Issy-les-Moulineaux.

Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA (2000) : Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 294:396–401.

Weiss R (1992): The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? . *Semin Oncol*, 19-26.

Welch WJ (1992) Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev* 72, 1063-1081.

Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H, Daniel H (2000) : Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*.;60:3823–31.

Wheeler MA et al (1997) : Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 99, 110–116

Widlak P, Li P, Wang X & Garrard WT (2000) : Cleavage preferences of the apoptotic endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or nuclease) on naked DNA and chromatin substrates. *The journal of biological chemistry* 275,p. 8226-8232.

Widlak P, Garrard WT(2005) : Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem*;94:p.1078-87.

Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D (2000) : Human metabolic pathways dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions*. **28**: 16-22.

Winterbourn, C.C. (2002) Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 181/182, 223–227

Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K (2000) : Anthracycline induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention review of the literature. *Med Sci Monit*; 6:411–20.

Wolin MS (1996) : reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanism micocirculation 3(1)1-17.

Wollenweber E, Wehde R, Dorr M, Lang G and Stevens JF (2000). C-methyl-flavonoids from the leaf waxes of some Myrtaceae. *Phytochemistry*, **55**: 965–970.

Wollgast J & Anklam E (2000) : Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* **33**, 423 - 447.

Wong J W, Hashimoto K, & Shibamoto T (1995) : Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2707–2712)

Wong A and Cortopassi G (1997) : mtDNA mutations confer cellular sensitivity

Références bibliographiques

Wu T, Zang X, He M, Pan S and Xu X (2013) : Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-Escherichia coli activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of food chemistry*, **61**(34): 8185-8190.

Woolfolk CA and Dawnard JS (1977) : Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity among bacteria. *Journal of Bacteriology* **130**, 1175-1191.

Wouters KA, et al., (2005) : Protecting against anthracycline-induced myocardial: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol.*, **131**(5): p. 561-78..

Wright RM, Vaitailis GM, Wilson CM, Repine TB, Terada L and Repine JE (1993) : cDNA cloning, characterization and tissue-specific expression of human xanthine dehydrogenase/ xanthine oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 10690-10694.

Wu D and Cederbaum A I (1999) : Ethanol-induced apoptosis to stable HepG2 cell lines expressing human cytochrome P-4502E1. *Alcoholism Clinical Experimental Research* **23**, 67-76.

X

Xiuzhen H, Tao S, Hongxiang L (2007) : Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, **8** : 950-988

Xuwan Liu, Zhongyi Chen, Chu Chang Chua, YanShan Ma, George. A, Youngberg, Ronald Hamdy, and Balvin H L Chua (2002). Melatonin as an effective protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **283**, 254-263.

Y

YALCIN FN, ERSÖZ T, AKBAY P, GALIS I (2003) : Iridoid and Phenylpropanoid Glycosides from *Phlomis samia*, *P. monocephala* and *P. carica*, *Turk J Chem* **27** , 295 – 305.

YALCIN FN, ERSÖZ T, AKBAY P, GALIS I (2003): Phenolic, Megastigmane, Nucleotide, Acetophenon and Monoterpene Glycosides from *Phlomis samia* and *P. carica*, *Turk J Chem* **27**, 703 -711.

Yammamoto T, S Hsu, J Lewis , J Wataba , D Dickinson, B Singh, W B Bollag, P Lockwood , E Ueta, T, Osaki (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **307** : 230-236 .

Yamagata K, Izawa Y, Onodera D, Tagami M (2018) : Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells. *Mol Cell Biochem.* Apr; **441**(1-2):9-19.

Yao LH, Jiang YM, SHI J, Tomas-Barberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS (2004) : Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.*, **59** : 113-122.

Yan T, et al., (2009) : Topoisomerase II{alpha}-dependent and -independent apoptotic effects of dexrazoxane and doxorubicin. *Mol Cancer Ther.*, **8**(5): p. 1075-85.

yano H A, Mizogichi K ,Fukuda M, Haramaki S, Ogasawara S, Momoski M, Kojiro (1994) : *Cancer Res.*, **54** : 448-454.

Yang Y, Li WL, Gong T, Wang HQ, Chen RY (2010). Studies on the chemical constituents of *Anabasis aphylla* L. *Yao Xue Xue Bao*, **45**(12): 1523-1526.

Références bibliographiques

Yang CS, Lee MJ, Chen LS (1999) : Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*; 8 : 83-9.

Yano H, Mizoguchi A, Fukuda K, Haramaki M, Ogasawara S, Momosaki S, Kojiro M (1994) The herbal medicine Sho-saiko-to inhibits proliferation of cancer cell lines by inducing apoptosis and arrest at the G0/G1 phase. *Cancer Research* 54, 448–454.

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang, S, Gurbuxani, S, Larochette, N, Dauga s E, Garrido C, Kroemer G & Wu H (2002) : DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis ind

Yen HC, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho YS, St Clair DK (1996) : The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest*; 98:1253–60.

Yeung ST, Yoong C, Spink J, Galbraith A, Smith PJ (1991): Functional myocardial impairment in children treated with anthracyclines for cancer. *Lancet*, 337, 816-818. using factor. *Nature structural biology* 9, p. 680-684.

Yi S Y, K.-J Nan S, J Chen (2008) Effect of extract of Ginkgo biloba on doxorubicin-associated cardiotoxicity in patients with breast cancer, *Chin. J. Integr. Traditional Western Med.* 28 68–70.

Yilmaz. S, Atessahin A, Sahna E, Karahan I, Ozer S (2006): Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 218, 164–171.

Yin F, Giuliano AE, Van Herle AJ (1999) : Signal pathways involved in apigenin inhibition of Growth and induction of apoptosis of human anaplastic thyroid cancer cells (ARO) *Anticancer Res.*; 19:4297–303.

Yizhong C, Qiong L, Mei S, Harold C (2004) : Antioxidant activity and phenolic compounds of traditional 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74:2151–84.

Youle RJ et A Strasser (2008): «The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death». *Nat Rev Mol Cell Biol.* Vol. 9, No 1, pp. 47-59.

Young RC, Ozols RF, Myers CE (1981): The anthracycline antineoplastic drugs. *Journal of Medicine*, 305, 139-153.

Young DS (2001): Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC .

Young RC, Ozols RF, Myers CE (1981): The anthracycline antineoplastic drugs. *Journal of Medicine*, 305, 139-153.

Z

Zamzami N, Kroemer G (2001) : 2 : *Nature Rev* 67-71. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.

Zarei M, Javarappa KK, Zarei M, Baker S, (2013) : Cardioprotective effect of the root extract of *Hemidesmus indicus* against doxorubicin—induced oxidative stress in mice, *Der Pharm. Lett.* 5 334–339.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*, 33(3) : 337-49.

Références bibliographiques

Zhang Y, he-hi Wang ZZ (2008) : Comparative analysis of essential oil components of three *Phlomis* species in Qinling Mountains of China, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47 213–217

Zhang C, Li C, Feng SI, Shi JG (1991) : Iridoid glycosides from *Phlomis rotata*. *Phytochemistry*;30:4156–8

Zhang Y, Wang Zhe-zhi (2009) : Phenolic composition and antioxidant activities of two *Phlomis* species: A correlation study, *Pharmacology, toxicology, C. R. Biologies* 332 816–826.

Zhang H, Shen W, Gao C, et al (2012) : Protective effects of salidroside on epirubicin-induced early left ventricular regional systolic dysfunction in patients with breast cancer, *Drugs R&D* 12

Zhang C, Li C, Feng SI, Shi JG (1991) : Iridoid glucosides from *Phlomis rotata*. *Phytochemistry* ;30(12):4156–8.

Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Momoi T, Srinivasan A, Nicholson DW, Lazebnik Y, Flavell RA (2000) : Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med*;6:p.1241-7. 101–106.

Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S (1999) : Cell Death Differ, 6 : 644-651. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis.

Zhivotovsky B, Orrenius S, Brustugun OT, Doskeland SO (1998) : *Nature*.391 : 449-450. Injected cytochrome c induces apoptosis.

Zhou QCB (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.

Zhou H-Y, Hong J-L, Shu P, Juan Ni, Y, Qin MJ (2009) : A new dicoumarin and anticoagulant activity from *Viola yedoensis* Makino. *Fitoterapia*, **80** : 283–285.

Zhou P, Chou J, Olea RS, Yuan J, Wagner G. Proc Natl Acad Sci U S A (1999) : 96 : 11265- 11270. Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction.

Zi X, Feyes DK, Agarwal R (1998) : Anticarcinogenic effect of a flavonoid antioxidant, silymarin, in human breast cancer cells MDA-MB 468: Induction of G1 arrest through an increase in Cip1/p21 concomitant with a decrease in kinase activity of cyclin-dependent kinases and associated cyclins. *Clin Cancer Res.*;4:1055–64.

Ziegler U, Groscurth P (2004) : Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 19 :P. 124-128.

Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, Thompson CB (2003) : Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol.* 162 : 59-69.

Zornig MA, Hueber W, Baum et Evan G (2001): «Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis». *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1551, No 2, pp. 1-37.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) : Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase *Cell*.-3. 90 : 405-413.

Résumé

Abstract:

The aim of this work was to investigate the effect of the aerial parts Méthanolic extract of *Phlomis samia*, which is known in traditional medicine.

The present study, which to our knowledge has never been studied of its cardioprotective effect against doxorubicin-induced cardiotoxicity and apoptotic activity before.

The analytical chemical study (identification tests, estimation of flavonoids content and total phenolic compound, The HPLC of the methanolic solution for this plant showed that :

Quantitative determination of total phenolics and total flavonoids was carried out using colorimetric methods. The total phenolic content was found to be 73,14 mg of gallic acid equivalent per gram of extract, while the content of flavonoid show a value of 21,61 ; 46,97 mg of quercetin, rutin equivalent per gram of extract. The antioxidant activity was evaluated in vitro with the use of free radical scavenging activity method by DPPH assay, Linoleic acid peroxidation inhibition, Estimation of total reducing power, Estimation of $\cdot\text{OH}$ scavenging, Lipid peroxidation inhibition assay, results indicated that dose depend % reduction against the previous experiments mentioned

the anticancer activity was evaluated by anti proliferation activity with MTT assay on two kind of cells line HepG2 and MDA. The proliferation of HepG2, MDA was significantly decreased after 48h, 72h incubation with PHSME at 450 $\mu\text{g/ml}$. also apoptosis and cell cycle activity were evaluated by flow cytometry methods. Apoptosis observed in Annexin V-FTTC and propidium iodide (PI) staining of cells treated with PHSME for 48h in HepG2 MDA cells. Moreover PHSME arrest cell cycle progression in G1 phase, The anticancer activity of PHSME has very potent anticancer activities, which might be useful in liver and breast cancer.

The results indicate that PHSME extract exhibited significant protection against DOXO induced cardiac toxicity, where the pretreatment with the extract at a dose of 250 mg/kg for a 15 days resulted in a decrease in the plasma enzymatic cardiac injury (CPK, LDH and AST), reduction in cardiac cytosolic MDA and maintenance of cardiac cytosolic GSH level and catalase, GST enzymes as compared to DOXO treated animals at a dose of 15 mg/kg intraperitoneally. The biochemical study were confirmed with histological study; The results showed that doxorubicin alone produced evident histological alterations (edema, areas of necrosis, prominent inflammatory cells, Condensed Nuclei and other alterations)

It is concluded that Methanolic extract of *Phlomis samia* treatment can protect against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. PHSME may be a useful candidate in the combination therapy with doxorubicin to limit free-radical-mediated cardiac injury and can activate apoptosis in two kind of cell line (HepG2, MDA).

Résumé :

Le but de ce travail est d'étudier l'effet des parties aériennes d'extrait méthanolique de *Phlomis samia*, connu dans la médecine traditionnelle.

La présente étude, qui à notre connaissance n'a jamais été étudiée sur l'effet cardioprotecteur auparavant induite par la doxorubicine et l'activité apoptotique .

L'étude analytique chimique (tests d'identification, estimation de la teneur en flavonoïdes et composé phénolique total, HPLC) d'extrait PHSME a indiqué que: La détermination quantitative des phénoliques totaux et des flavonoïdes totaux réalisée à l'aide de méthodes colorimétriques, La teneur phénolique totale a été de 73,14 mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait, tandis que la teneur en flavonoïdes présente une valeur de 21,61; 46,97 mg de quercétine, équivalent de ritine par gramme d'extrait.

L'activité antioxydante a été évaluée in vitro avec l'utilisation de la méthode d'activité de balayage des radicaux libres par dosage DPPH, inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, estimation de la puissance réductrice totale, estimation de $\cdot\text{OH}$. Balayage, dosage d'inhibition de la peroxydation des lipides, les résultats indiquent que le taux d'inhibition est dose dépend lors des expériences précédentes mentionnées.

L'activité anticancéreuse a été évaluée par un test anti-prolifération MTT sur deux types de ligne cellulaires HepG2 et MDA. La prolifération de HepG2, MDA a été significativement diminuée après 48h, 72h d'incubation avec PHSME à 450 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

L'apoptose et l'activité sur le cycle cellulaire ont également été évaluées par des méthodes de cytométrie en flux. L'apoptose observée dans les cellules HepG2 et MDA traitées avec PHSME pendant 48h avec une coloration par l'Annexine V-FTTC et l'iodure de propidium (PI). l'extrait PHSME limite la progression du cycle cellulaire dans la phase SG1, L'activité anticancéreuse de PHSME est très puissante, et pourrait être utile dans le traitement de cancer du foie et du sein.

Les résultats expliquent que l'extrait PHSME présente une protection significative contre la toxicité cardiaque induite par DOXO, le prétraitement avec l'extrait à une dose de 250 mg / kg pendant 15 jours a causé une diminution des lésions cardiaques enzymatiques plasmatiques (CPK, LDH et AST) , La réduction de la MDA cytosolique cardiaque et le maintien du niveau GSH cytosolique cardiaque , des enzymes cardiaque de la catalase, GST par rapport aux animaux traités avec DOXO à une dose de 15 mg / kg par voie intrapéritonéale.

L'étude biochimique a été confirmée lors des études histologiques; Les résultats indiquent que le traitement par la doxorubicine seule , a créé des altérations histologiques évidentes (œdème, zones de nécrose, cellules inflammatoires proéminentes, Noyaux condensés et autres altérations) .On conclut que un traitement par l'extrait méthanolique du *Phlomis samia* peut se protéger contre la cardiotoxicité aiguë induite par la doxorubicine. L'PHSME peut être un candidat utile dans la thérapie combinée avec doxorubicine pour limiter les lésions cardiaques médies par les radicaux libres et peut activer l'apoptose dans deux types de lignes cellulaires (HepG2, MDA).

المخلص:

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير المستخلص الميثانولي للأجزاء الهوائية، من نبتة *Phlomis samia* المعروفة في الطب التقليدي. و التي وفق معلوماتنا ، لم يتم دراسة التأثيرات الواقئية للقلب ضد السمية الناجمة عن المعالجة بمضاد السرطان Doxorébucline والنشاطها على الموت المبرمج للخلايا من قبل. اجريت اختبارات للمستخلص الميثانولي لهذا النبات كـ HPLC و الدراسة التحليلية الكيميائية (اختبارات تقدير محتوى الفلافونويد ومجموعة المركبات الفينولية) :

وقد تم التحديد الكمي لعديدات الفينول الكلي والفلافونويدات الكلية باستخدام أساليب اللونية. وكان محتوى الفينول الكلي ما يعادل 73.14 ملغ من حمض الغاليك لكل غرام من المستخلص، في حين أن محتوى الفلافونويدات كان ما يعادل 21.61؛ 46.97 ملغ من كرسيتين، و الريتين لكل غرام من المستخلص على التوالي . كما تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر باستخدام أسلوب النشاط الماسح للجذور الحرة عن طريق فحص DPPH، وتثبيت فوق أكسدة حمض اللينوليك، تقدير قوة الإرجاع الكلي ، تقدير قوة تثبيت جذر OH° ، وفحص تثبيت فوق أكسدة الليبيدات ، تشير النتائج إلى أن معدل التثبيت يعتمد على الجرعة في التجارب المذكورة أعلاه . كما تم تقييم النشاط المضاد لنمو الخلايا السرطانية عن طريق اختبار الـ MTT على نشاط نوعين من السلالات الخلوية HepG2 و MDA . وقد انخفض تضاعف كلتا السلالات للخلايا الورمية ، بشكل ملحوظ بعد 48 ساعة و 72 ساعة بعد حضانة هذه الخلايا مع مستخلص النبتة بتركيز 450 ميكروغرام / مل . كما تم تقييم تأثير المستخلص النباتي على الموت الخلوي المبرمج ونشاط الدورة الخلوية عن طريق طرق التدفق الخلوي. حيث اظهرت نتائج وسم الخلايا بـ Annexine V-FTTC و propidium (PI) ارتفاع نسبة موت الخلايا المبرمج بعد المعالجة لمدة 48 ساعة بـ PHSME في خلايا HepG2 و MDA . كما قام المستخلص PHSME بالحد من تطور الدورة الخلوية و وقف تقدمها في المرحلة SG1 و بذلك يكون للـ PHSME نشاط مضاد للسرطان قوي جدا، والذي يمكن أن يكون مفيد في علاج سرطان الكبد وسرطان الثدي.

وتشير النتائج إلى أن مستخلص PHSME أظهر حماية كبيرة ضد سمية القلب الناجمة عن DOXO حيث ان المعالجة بالمستخلص بجرعة 250 ملغ / كغ لمدة 15 ايام أدت إلى انخفاض مستوى المؤشرات الانزيمية الضارة للقلب في البلازما (CPK، LDH و AST)، وحفظ تركيز MDA في خلايا القلب والحفاظ على مستويات الخلوية في نسيج القلب لكل من GSH و مستوى انزيمات القلب كالكاتالاز، و GST بالمقارنة مع الحيوانات التي عوملت بـ DOXO بجرعة 15 ملغ / كغ عبر الغشاء البريتوني. وأكدت نتائج الدراسة البيوكيميائية عن طريق الدراسة النسيجية. إذ أظهرت النتائج أن معاملة حيوانات التجارب بـ DOXO تنتج وحدها تعديلات نسيجية واضحة (وذمة، ومناطق النخر النكرزة ، خلايا النهائية بارزة، نوى مكثفة وتعديلات أخرى) وان المعاملة بالمستخلص تحافظ على النسيج القلبي في حالته الطبيعية يعزز هذا البحث كون المستخلص الميثانولي لنبتة *Phlomis samia* يمكن أن يحمي ضد السمية القلبية الحادة cardiotoxicity الناجمة عن المعالجة بدوكسوروبيسين. وكما يمكن أن يكون مرشحا مفيد لعلاج بالاشتراك مع دوكسوروبيسين للحد من اضرار القلب التي تسببها الجذور الحرة و كذلك تثبيط نمو الخلايا في كلا السلالتين الخلوية (HepG2، MDA).

Présenté par : -IHOUAL SAFIA

La date de soutenance :

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

Thème : Effet d'extrait méthanolique de la plante médicinale *Phlomis samia* (الخيطة) sur l'apoptose des cellules cancéreuses HepG2 et MDA MB 468 et sur la cardiotoxicité induite par la Doxorubicine.

Résumé :

Le but de ce travail est d'étudier l'effet des parties aériennes d'extrait méthanolique de *Phlomis samia*, connu dans la médecine traditionnelle.

La présente étude, qui à notre connaissance n'a jamais été étudiée sur l'effet cardioprotecteur auparavant induite par la doxorubicine et l'activité apoptotique .

L'étude analytique chimique (tests d'identification, estimation de la teneur en flavonoïdes et composé phénolique total, HPLC) d'extrait PHSME a indiqué que: La détermination quantitative des phénoliques totaux et des flavonoïdes totaux réalisée à l'aide de méthodes colorimétriques, La teneur phénolique totale a été de 73,14 mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait, tandis que la teneur en flavonoïdes présente une valeur de 21,61; 46,97 mg de quercétine, équivalent de rutine par gramme d'extrait.

L'activité antioxydante a été évaluée in vitro avec l'utilisation de la méthode d'activité de balayage des radicaux libres par dosage DPPH, inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, estimation de la puissance réductrice totale, estimation de $\cdot\text{OH}$. Balayage, dosage d'inhibition de la peroxydation des lipides, les résultats indiquent que le taux d'inhibition est dose dépend lors les des expériences précédentes mentionnées.

L'activité anticancéreuse a été évaluée par une test anti-prolifération MTT sur deux types de ligne cellulaires HepG2 et MDA. La prolifération de HepG2, MDA a été significativement diminuée après 48h, 72h d'incubation avec PHSME à 450 ug / ml.

L'apoptose et l'activité sur le cycle cellulaire ont également été évaluées par des méthodes de cytométrie en flux. L'apoptose observée dans les cellules HepG2 et MDA traitées avec PHSME pendant 48h avec une coloration par l'Annexine V-FTTC et l'iodure de propidium (PI). l'extrait PHSME limite la progression du cycle cellulaire dans la phase SG1, L'activité anticancéreuse de PHSME est très puissantes, et pourrait être utile dans le traitement de cancer du foie et du sein.

Les résultats expliquent que l'extrait PHSME présente une protection significative contre la toxicité cardiaque induite par DOXO, le prétraitement avec l'extrait à une dose de 250 mg / kg pendant 10 jours a causé une diminution des lésions cardiaques enzymatiques plasmatiques (CPK, LDH et AST) , La réduction de la MDA cytosolique cardiaque et le maintien du niveau GSH cytosolique cardiaque , des enzymes cardiaque de la catalase, GST par rapport aux animaux traités avec DOXO à une dose de 15 mg / kg par voie intrapéritonéale. L'étude biochimique a été confirmée lors des études histologiques; Les résultats indiquent que le traitement par la doxorubicine seule , a créés des altérations histologiques évidentes (œdème, zones de nécrose, cellules inflammatoires proéminentes, Noyaux condensés et autres altérations). On conclut que un traitement par l'extrait méthanolique du *Phlomis samia* peut se protéger contre la cardiotoxicité aiguë induite par la doxorubicine. L'PHSME peut être un candidat utile dans la thérapie combinée avec doxorubicine pour limiter les lésions cardiaques médies par les radicaux libres et peut activer l'apoptose dans deux types de lignes cellulaires (HepG2, MDA).

Les mots clé : le cancer, Apoptose , *Phlomis samia*, la doxorubicine, les radicaux libres, cardiotoxicité, l'anti oxydant .

Encadrer par : Abidli Nacira