

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement supérieur  
et de la Recherche Scientifique



Faculté des sciences et science de la nature et de vie  
Département de biologie



## Mémoire

Pour l'obtention du diplôme de

## Master

En biochimie appliqué

*Effet préventif de l'extrait de la plante  
médicinale *Rutamontana* (Clus.)L. (الفيجل)  
sur le stress oxydant induit par la  
doxorubicine*

Présenté par :

Boughdiri Abd elmalek

Bouhlala Ali

Soutenu le : 14 06/2015

Devant le jury :

Préside	M. ZERRIAB AZDINE	MAA. Univ. Khenchela
Rapporteur	Melle KARA ALI.Wahiba	MAA. Univ. Khenchela
Examinatrice	Melle KHADOMA Asma	MAA. Univ. Khenchela

Promotion : juin -2015

Laboratoire où le travail a été réalisé : laboratoire de l'université Abbes  
Laghrou-Khenchela-  
Laboratoire central de biochimie, Centre hospitalo-universitaire  
Dr Benbadis -Constantine.

# REMERCIEMENT

*Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux,  
qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.  
En second lieu, remercie le membre de jury le président M. zerriab l'examinatrice*

**khadoma**

*nous tenons à remercier vivement notre encadreur et enseignant **Dr. KARAALI WAHIBA** pour ses précieux conseils, son aide et son suivi tout au long de ce travail.*

*Tout d'abord Nous remercions précisément **notre très chers parents** qui ont le droit de recevoir notre chaleureux remerciements pour le courage et le sacrifice qu'ils ont consentis pendant la durée de notre études en leurs souhaitant une longue vie pleine de joie et de santé.*

*Nous adressons notre profond remerciement aussi à **l'équipe du laboratoire pédagogique de biochimie** de l'institut de biologie à l'université de khenchela surtout l'ingénieur **ABD ENNDURE** pour l'aide qu'ils nous ont donné et les efforts déployés pour faciliter notre travail*

*Enfin, nos plus sincères remerciements vont aussi à tous nos proches et amis, qui nous ont toujours soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Merci à toute personne qui nous a aidés de loin ou de près.*

## *Dédicace*

*À l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu  
réaliser ce travail que je dédie :*

*À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ;  
ma mère, qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude,  
pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et  
sécurité.*

*À mon cher père qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long  
de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements.*

*Je le dédie également à notre encadreur ;*

***Dr. KARAALI WAHIBA***

*À mon frère **Dr.**Houssemeddine,*

*À mes sœurs surtout ma petite Chaimaa.*

*Merci de l'irremplaçable et inconditionnel soutien.*

*À toute ma famille, surtout Ridha et Lotfi et Mouhemed et Kamel et  
Aymen et Zoubir et ma grande mère Rbiha.*

*À mes amis Amine Abez et Nihede et Fatima et **Dr.**Salim et son frère  
Amine et Riadh et Sami et Abd allah et Khawla et Tadj eddine et  
Mouhamed et Zahra et khalida et sara.*

***Boughdiri Abd elmalek***

# **DÉDICACE**

***Avec gratitude et reconnaissance***

***Je dédie ce travail à mon enseignante***

***DR.Karaali qui a été là pour m'aider, me soutenir, me supporter, m'encourager m'aimer...***

***A mes parents qui ont fait de moi ce que je suis  
aujourd'hui***

***A mes frangins hmza, farouk ;bessam,  
abdrazke ,ma petite sœur sara***

***Bouhlala Ali***

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

- $^1\text{O}^2$**  : L'oxygène singlet
- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- ALAT** : Alanine-Aminotransférase
- AO** : Antioxydants
- ASAT** : Aspartate-Aminotransférase
- CCM** : Chromatographie sur couche mince
- CPK** : Créatine Phosphokinase totale
- DPPH** : diphénylpicryl-hydrazyl
- DOX** : doxorubicine
- EAERM** : Extrait d'acétate d'éthyle de *Rutamontana*
- EBRM** : Extrait butanolique de *Rutamontana*
- EEPRM** : Extrait éther de pétrole de *Rutamontana*
- EFTRM** : Extrait des flavonoïdes totaux de *Rutamontana*
- EMRM** : Extrait méthanolique de *Rutamontana*
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- FDA** : Food and Drug Administration
- GPx** : Glutathion Peroxydase
- GR** : Glutathion Réductase
- GSSG** : Glutathion Disulfure
- $\text{H}_2\text{O}_2$**  : Peroxyde d'Hydrogène
- IC** : Insuffisance Cardiaque
- IDM** : Infarctus du myocarde
- $\text{L}^\circ$**  : Radical alkyle
- LDH** : Lactate deshydrogénase
- $\text{LOO}^\circ$**  : Radical peroxyde.
- LOOH** : Peroxyde lipidique.
- NO** : Monoxyde d'azote
- NO** : Monoxyde d'azote
- $\text{O}_2^{\cdot-}$**  : Radical superoxyde
- $\text{OH}^\cdot$**  : Radical hydroxyl
- OMS** : l'Organisation Mondiale de la Santé

**ONOO<sup>-</sup>** : Peroxynitrite

**PMN** : Polymorphonucléaire

**Q** : Quercétine

**Rf** : Rapport frontal

**RL** : radical libre, radicaux libres

**RLO** : radicaux libres de l'oxygène

**ROO<sup>•</sup>** : radical peroxy

**SH** : groupement sulfhydryle

**SOD** : superoxyde dismutase

**UV** : rayonnements Ultra Violet

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie.....	<b>04</b>
<b>Figure2.</b> L'isoprène (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ).....	<b>06</b>
<b>Figure3.</b> Effets biologiques des polyphénols.....	<b>07</b>
<b>Figure4.</b> (A) : Structure de base des flavonoïdes ; (B) : Schéma simplifié des flavonoïdes.....	<b>09</b>
<b>Figure5.</b> Quelques photos de <i>Ruta montana</i> .....	<b>16</b>
<b>Figure 6.</b> Radicaux libres : métabolites dérivés de l'oxygène.....	<b>19</b>
<b>Figure 7.</b> Les principales sources des ERO.....	<b>21</b>
<b>Figure 8.</b> Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde.....	<b>22</b>
<b>Figure 9.</b> Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés.....	<b>24</b>
<b>Figure 10.</b> Troubles liés au stress oxydatif.....	<b>25</b>
<b>Figure 11.</b> Antioxydants neutralisant les ERO.....	<b>26</b>
<b>Figure12.</b> Les structures moléculaires de la doxorubicine et daunorubicine.....	<b>31</b>
<b>Figure13.</b> Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline par flip-flop (changement de position des molécules d'un feuillet de la bicouche à l'autre).....	<b>33</b>
<b>Figure14.</b> Diffusion passive de la doxorubicine à travers la membrane plasmique et son efflux actif par la P-glycoprotéine.....	<b>34</b>
<b>Figure 15.</b> Production de radicaux superoxydes (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines et formation de peroxynitrites (ONOO <sup>-</sup> ).....	<b>36</b>
<b>Figure 16.</b> Mécanisme de la toxicodynamique et de la pharmacodynamique de la doxorubicine dans les cardiomyocytes.....	<b>37</b>
<b>Figure 17.</b> Les trois différentes étapes d'extractions successives liquide-liquide par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le butanol.....	<b>43</b>
<b>Figure 18.</b> La procédure d'extraction des flavonoïdes totaux.....	<b>45</b>
<b>Figure 19.</b> Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	<b>47</b>
<b>Figure20.</b> Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	<b>48</b>
<b>Figure20.</b> La réduction du DPPH <sup>o</sup> par un antioxydant.....	<b>50</b>
<b>Figure22.</b> Dosage de l'activité de la CPK.....	<b>52</b>
<b>Figure23.</b> Dosage de l'activité de l'ASAT(A), Dosage de l'activité de l'ALAT(B).....	<b>53</b>
<b>Figure24.</b> Dosage de l'activité de la LDH.....	<b>53</b>
<b>Figure 25</b> Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE).....	<b>58</b>

<b>Figure 26.</b> Teneur en polyphénols totaux (mgAG/gE).....	<b>59</b>
<b>Figure27.</b> Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait ether de pétrole de R.montana par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80 (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$ .....	<b>61</b>
<b>Figure28.</b> Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait acétate d'éthyle de R.montana par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80 (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$ .....	<b>63</b>
<b>Figure29.</b> Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait butanolique de R.montana par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Chloroforme/méthanol/ $\text{H}_2\text{O}_d$ (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$ .....	<b>65</b>
<b>Figure30.</b> Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait flavonoïde totaux de R.montana par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Chloroforme /méthanol/ $\text{H}_2\text{O}_d$ (révélation à l'UV), $\lambda=365\text{nm}$ .....	<b>67</b>
<b>Figure31.</b> Les concentrations des extraits méthanolique de <i>R.Montana</i> inhibent 50 % du radical DPPH° .....	<b>69</b>
<b>Figure32.</b> Variations des activités enzymatiques de la LDH chez les animaux traités par la doxorubicine seule (15mg/kg i.p.) ou précédée par l'administration de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Ruta montana</i> (100mg/kg p.o endant 15 jours).....	<b>70</b>
<b>Figure33.</b> Variations des activités enzymatiques de la CPK chez les animaux traités par la doxorubicine seule (15mg/kg i.p.) ou précédée par l'administration de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Ruta montana</i> (100mg/kg p.o endant 15 jours).....	<b>71</b>
<b>Figure 34.</b> Variations des activités enzymatiques de la l'ASAT chez les animaux traités par la doxorubicine seule (15mg/kg i.p.) ou précédée par l'administration de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Ruta montana</i> (100mg/kg p.o endant 15 jours).....	<b>72</b>
<b>Figure 35.</b> Variations des activités enzymatiques de la l'ALAT chez les animaux traités par la doxorubicine seule (15mg/kg i.p.) ou précédée par l'administration de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Ruta montana</i> (100mg/kg p.o endant 15 jours).....	<b>73</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau1.</b> Les différentes classes des composés phénoliques.....	<b>07</b>
<b>Tableau2.</b> Les flavonoïdes <i>stricto sensu</i> .....	<b>09</b>
<b>Tableau3.</b> Flavanols, anthocyanidols.....	<b>11</b>
<b>Tableau4.</b> Le rendement d'extrait méthanolique de <i>R.Montana</i> .....	<b>55</b>
<b>Tableau5.</b> Le rendement des extraits flavonoïdes de <i>R. Montana</i> .....	<b>55</b>
<b>Tableau6.</b> Le rendement d'extrait méthanolique et des flavonoïdes totaux de <i>R.Montana</i> .....	<b>56</b>
<b>Tableau7.</b> Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique de <i>R. Montana</i> .....	<b>57</b>
<b>Tableau8.</b> Résultat de la CCM de la fraction éther de pétrole. Système solvant : Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80. Adsorbant : gel de silice.....	<b>60</b>
<b>Tableau9.</b> Résultat de la CCM de la fraction acétate d'éthyle. Système solvant : Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80. Adsorbant : gel de silice.....	<b>62</b>
<b>Tableau10.</b> Résultat de la CCM de la fraction extrait butanolique. Système solvant : Chloroforme/méthanol /H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> . Adsorbant : gel de silice.....	<b>64</b>
<b>Tableau11.</b> Résultat de la CCM de la fraction extrait flavonoïde totaux. Système solvant : Chloroforme/méthanol /H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> . Adsorbant : gel de silice.....	<b>66</b>
<b>Tableau12.</b> Les pourcentages de réduction du radical DPPH° .....	<b>68</b>

# TABLE DE MATIÈRE

Remerciement

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux



Introduction.....	01
<b>Chapitre I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>03</b>
<b>I .La phytothérapie et les substances naturelles.....</b>	<b>03</b>
I.1 Les substances naturelles des plantes et leurs activités biologiques.....	03
I.1.1 Les alcaloïdes.....	05
I.1.2 Les terpènes .....	06
I.1.3 Les polyphénols.....	06
<b>II. Les flavonoïdes.....</b>	<b>08</b>
II.1 Définition et généralités.....	08
II.2 Structure et classification.....	08
II.3. Distribution et localisation.....	12
II.4. Pharmacocinétique des flavonoïdes.....	12
II.5. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes.....	13
II.5.1 Propriétés antioxydants et piègeurs de radicaux libres.....	13
II.5.2. Activité des flavonoïdes contre le cancer.....	13
II.5.3. Autres propriétés biologiques.....	14
II.5.4. Prévention contre la cardiotoxicité induite par la doxorubicine.....	14
<b>III. La plante médicinale <i>Ruta SP</i>.....</b>	<b>15</b>
III.1.La plante médicinale <i>Ruta montana</i> .....	15
III.2.Description de la plante.....	15
III.3.Place dans la systématique.....	17
III.4.Répartition géographique.....	17
III.5.Utilisation en médecine traditionnelle.....	18
III.6.Composition biochimique et propriétés biologiques.....	18
<b>IV. Stress oxydant, radicaux libres et antioxydant.....</b>	<b>18</b>
IV.1.Les radicaux libres et les espèces réactives oxygénées.....	19

IV.1.1. La formation des ERO.....	19
IV.1.2. Les sources des ERO.....	21
IV.1.2.1. Les sources endogènes.....	21
IV.1.2.2. Les sources exogènes.....	22
IV.1.3. Le rôle physiologique des ERO.....	23
IV.1.4. Principales cibles des ERO.....	23
IV.1.4.1. Stress oxydant et lipides.....	24
IV.1.4.2. Stress oxydant, les acides aminées et protéines.....	24
IV.1.4.3. Stress oxydant et ADN.....	25
IV.2. Les maladies liées au stress oxydant.....	25
IV.3. Les systèmes de protection antioxydant.....	26
IV.3.1. Définition.....	26
IV.3.2. Les antioxydants enzymatiques.....	26
IV.3.2.1. Superoxyde dismutase.....	27
IV.3.2.2 La glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR).....	27
IV.3.2.3. Catalases.....	27
IV.3.3. Les antioxydants non enzymatiques endogènes.....	27
IV.3.4. Les antioxydants non enzymatiques d'origine nutritionnelle.....	28
IV.3.4.1. La vitamine E.....	28
IV.3.4.2. La vitamine C.....	28
IV.3.4.3. Les caroténoïdes.....	28
IV.3.4.4. Les polyphénols.....	29
<b>VI. La doxorubicine.....</b>	<b>29</b>
VI.1. Définition et origine.....	29
VI.2. Structure moléculaire.....	29
VI.3. Principaux mécanismes d'action antitumorale.....	31
VI.4. Administration et pharmacocinétique.....	32
VI.5. Toxicité cardiaque des anthracyclines.....	34
VI. 5.1 Principaux mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines.....	34
VI.5.1.1. Hypothèse radicalaire.....	35
VI.5.1.2. Hypothèse liée au niveau de l'apoptose cellulaire induite par la doxorubicine.....	38
VI.5.2. Aspects histologiques des lésions cardiaques induites par la doxorubicine.....	38
<b>VI.6. Biomarqueurs de la cardiotoxicité.....</b>	<b>38</b>
VI.6.1. La CPK.....	39

VI.6.2.La LDH.....	39
VI6.3.Les transaminase.....	39
<b>Chapitre II. MATÉRIEL ET METHODES.....</b>	<b>41</b>
<b>I. Matériel.....</b>	<b>41</b>
I.1. Matériel biologique (Echantillonnage).....	41
I.1.1. Matériel végétal.....	41
I.1.2. Matériel animale.....	41
I.1.3. Le médicament anticancéreux.....	41
I.2. Réactifs chimiques et instrumentations.....	41
<b>II. Méthodes.....</b>	<b>42</b>
II.1. Méthodes concernant le matériel végétal.....	42
II.1.1. Préparation des extraits végétaux.....	42
II.1.1.1. Extraction avec différents solvants organiques à polarité croissante.....	42
II.1.1.2. Procédé de l'extraction des flavonoïdes totaux.....	44
II.1.2. Rendement de l'extraction.....	44
II.1.3. Screening chimique des plantes.....	45
II. 1.3.1. Recherche des tanins.....	45
II. 1.3. 2. Recherche des saponosides.....	45
II. 1.3.3. Recherche des flavonoïdes.....	46
II. 1.3. 4. Recherche des composés réducteurs.....	46
II. 1. 3. 5. Recherche des coumarines.....	46
II. 1. 3. 6. Recherche des alcaloïdes.....	46
II.1.4. Etude quantitative.....	47
II. 1.4. 1. Dosage des flavonoïdes.....	47
II.1. 4.2. Dosage des polyphénols totaux.....	47
II.1.5. Etude qualitative.....	48
II.1. 5.1. Chromatographie sur couche mince.....	48
II.1.5.2. Protocole de CCM sur gel de silice.....	49
II.1.5.3. Calcul du Rapport frontal.....	49
II.1.6. Estimation in vitro de l'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical libre DPPH° .....	49
II.1.6.1. Réalisation de l'essai.....	50
II.1.6.2. Expression des résultats.....	50
II.2. Méthodes concernant le matériel animal.....	51
II.2.1. Traitement des animaux.....	51

II.2.2. sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques.....	51
II.2.2.1. Dosages biochimique in vivo (activité de CPK, ASAT, ALAT et LDH).....	51
II.3. Analyse statistique.....	53
<b>Chapitre III. RÉSULTAT ET DISCUSSION.....</b>	<b>55</b>
I. Le rendement des extraits.....	55
II. Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques.....	56
III. Etude quantitative.....	58
III.1. Dosages des flavonoïdes.....	58
III.2. Dosage des polyphénols totaux.....	59
IV. Etude qualitative.....	60
IV.1. Résultat de la Chromatographie sur Couche Mince.....	60
IV.1.1. Composés identifiés dans l'extrait éther de pétrole.....	60
IV.1.2. Composés identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle.....	62
IV.1.3. Composés identifiés dans l'extrait butanolique.....	64
IV.1.4. Composés identifiés dans l'extrait flavonoïde totaux.....	66
V. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits R. Montana par la méthode de DPPH° (effet scavenger).....	68
VI. Résultat des dosages biochimique in vivo (activité de CPK, ASAT, ALAT et LDH).....	70
VI.1.Evaluation de l'activité enzymatique de la LDH.....	70
VI.2.Evaluation de l'activité enzymatique de la CPK.....	71
VI.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la l'ASAT.....	72
VI.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la l'ALAT.....	73
<b>Conclusion et perspective.....</b>	<b>75</b>



**Résumés**

**Références bibliographiques**

### Introduction

La doxorubicine (DOX), appartenant à la famille des anthracyclines, est l'un des agents chimiothérapeutiques le plus efficace utilisé dans le traitement d'une variété des tumeurs solides et hématologiques malignes [133]. Son efficacité antitumorale est dose-dépendante, mais son utilisation clinique est limitée par le développement de cardiomyopathies et d'insuffisances cardiaques congestives [134,135].

Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les mécanismes de la toxicité cardiaque induite par les anthracyclines. Il a été reporté que les radicaux libres de l'oxygène (ERO) et la peroxydation lipidique jouent un rôle essentiel dans la cardiomyopathie provoquée par la DOX (Singal & Iliskovic, 1998). En effet, la plupart des études mettent en jeu le rôle du stress oxydatif dans ce processus qui est induit par la formation des ERO découlant de la structure chimique de la DOX ayant tendance à générer des espèces réactives de l'oxygène durant la métabolisation du médicament [136,137].

Au cours des dernières décennies, et malgré la découverte de nouveaux composés en chimie de synthèse, les sources naturelles restent le principal fournisseur de nouveaux médicaments et de nouvelles structures chimiques. Nous assistons donc à un regain de la phytothérapie surtout pour les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïdes qui ont montré des propriétés biologiques antioxydants intéressantes [138,139].

L'Algérie est un pays doté d'une biodiversité très riche des plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées; dans ce contexte, des efforts croissants sont consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier *Rutamontana*, plante connue dans la médecine traditionnelle [140].

Dans ce cadre, de nombreuses molécules antioxydantes ont été proposées comme protectrices de la cardiotoxicité [141,142], mais des controverses existent encore sur les études cliniques. Il n'y a donc aujourd'hui aucune substance mise sur le marché qui protège réellement le cœur des effets toxiques des anthracyclines.

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet préventif de l'extrait de la plante médicinale *Rutamontana* sur le stress oxydant induit par la doxorubicine.

Pour cela notre étude englobe trois parties :

- La première partie est d'ordre phytochimique basée principalement sur la préparation des différents extraits (EMRM, EFTRM, EAERM, EBRM, EEPRM) de la plante médicinale *Rutamontana* ; elle porte également sur les tests de mise en évidence des polyphénols dans les extraits, et une étude quantitative afin d'estimer la quantité des flavonoïdes et celle des polyphénols dans ces extraits, ainsi qu'une étude qualitative inclure la séparation des principaux flavonoïdes par l'utilisation de la chromatographie sur couche mince (CCM).
- La seconde partie est consacrée à une évaluation de l'activité antioxydante par le pouvoir scavenger des extraits sur le radical DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl).
- Dans la troisième partie, nous abordons l'utilisation de matériel animal, qui est un groupe de souris de type Wistar albinos mâles pour doser les paramètres biochimiques cardiaques *in vivo* (activité de CPK, ASAT, ALAT et LDH).

**PARTIE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

**Chapitre I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE****I .La phytothérapie et les substances naturelles**

La phytothérapie est le traitement ou la prévention des maladies par l'usage des plantes, ce terme vient du grec : (*phytos*) : la plante et (*therapiae*) : la thérapie [1].

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est originaire des millénaires jusqu'à la récente civilisation chinoise, Indienne et du proche-orient. Elle est devenue certainement un art [2].

Les plantes médicinales sont essentiellement utilisées sous deux formes :

- Comme un mélange complexe contenant un large spectre de constituants (infusion, des huiles essentielles et des extraits des teintures)
- Pure, chimiquement définie comme des principes actifs

Les composés purs sont généralement utilisés quand les principes actifs des plantes produisent une forte et spécifique activité ou bien avaient un faible indice thérapeutique.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé [3].

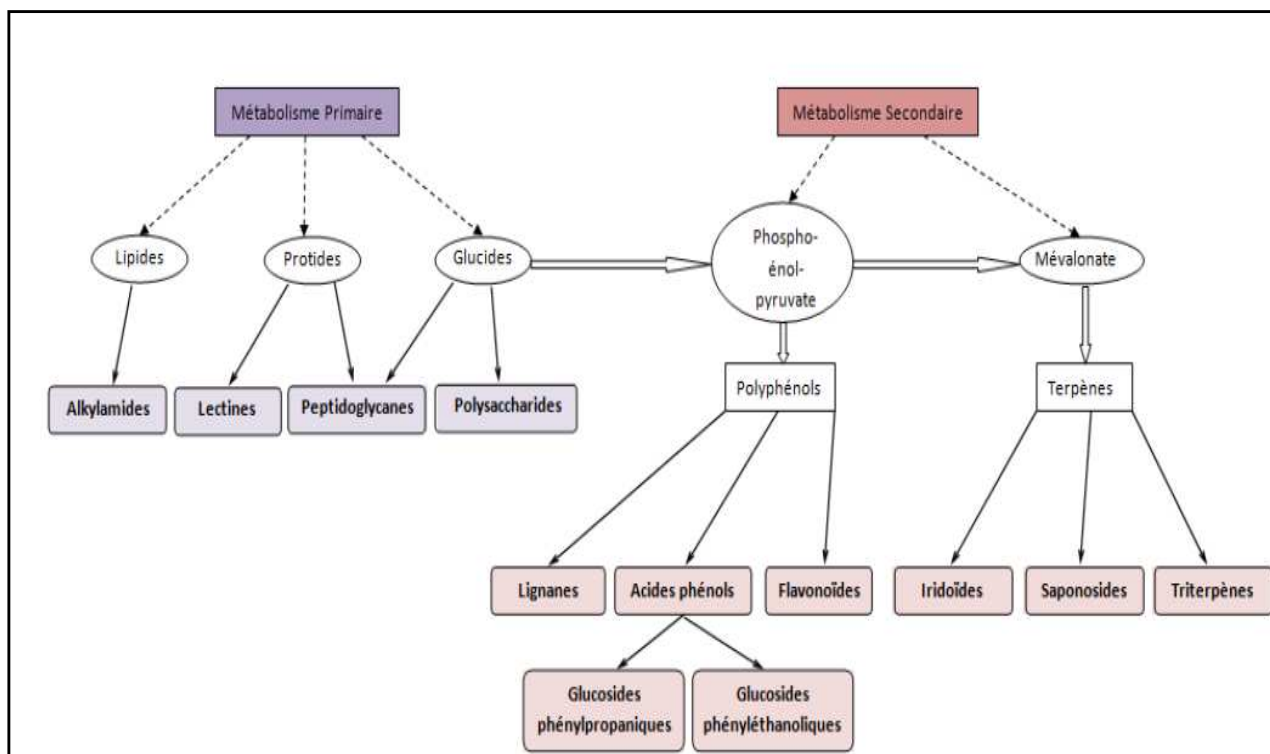
**I.1 Les substances naturelles des plantes et leurs activités biologiques**

L'usage des plantes à des fins thérapeutiques était connu par nos ancêtres et par nos parents de façon empirique, Plusieurs investigations chimiques ont été réalisées pour apporter une approche scientifique à l'usage qui est fait d'elles dans la médecine traditionnelle, Cela a donc abouti à la découverte de plusieurs classes de métabolites secondaires dont les plus étudiées actuellement sont les composés phénoliques reconnus comme de bons antioxydants par excellence [4].

Les produits naturels des plantes peuvent être classés en deux catégories, les métabolites primaires et les métabolites secondaires(**Figure1**). [5]

- **Les métabolites primaires :** Les plantes utilisent l'énergie du rayonnement solaire, le dioxyde de carbone présent dans l'atmosphère, l'eau et les éléments inorganiques du sol qu'elles absorbent par les racines (eau, éléments inorganiques) et par les feuilles (dioxyde de carbone).

Le processus de base est la photosynthèse qui fixe le carbone contenu dans le dioxyde de carbone atmosphérique, en le combinant aux atomes d'hydrogène contenus dans les molécules d'eau. Les premiers produits formés par la photosynthèse sont des hydrates de carbones, de faible masse moléculaire (oses). C'est à partir de ces oses (ou sucres) que sont ensuite formés tous les métabolites primaires nécessaires à la survie de la plante : glucides complexes (polymères comme la cellulose, l'amidon ou les pectines), acides aminés (constitutifs des protéines), acides gras (constitutifs des lipides), etc. [6].



**Figure 1.** Les principales familles de principes actifs utilisées en phytothérapie : certains principes actifs sont des métabolites primaires, d'autres sont des métabolites secondaires [18]

- **Les métabolites secondaires** : Les plantes produisent un grand nombre de substances appelées métabolites secondaires. Ces métabolites secondaires végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes. Ils participent de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédatons d'insectes, sécheresse, lumière UV, etc.) d'après. Ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement [7].

Les caractères biochimiques des plantes sont utilisés en taxonomie depuis plus de 100 ans. Certains de ces métabolites peuvent être considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques de plusieurs classes de végétaux [8].

D'un point de vue appliqué, beaucoup de métabolites secondaires constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales.

Les métabolites secondaires sont dotés d'une grande diversité structurale et dépassent actuellement 5000 identifiées. Ils peuvent être classés dans trois groupes majeurs : **les alcaloïdes, les terpènes, et les composés phénoliques [9].**

### I.1.1 Les alcaloïdes

Les alcaloïdes représentent le groupe de substance d'intérêt thérapeutique le plus important en termes de nombre, de diversité structurale et de l'éventail de leurs activités pharmacologiques. Le terme d'alcaloïdes a été introduit par W. Meisner au début du XIXe siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des alcalis (de l'arabe al kaly, la soude et du grec eidos, l'aspect). Il est admis qu'un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées.

On distingue:

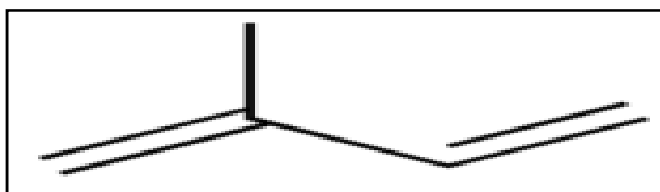
- Les alcaloïdes vrais qui sont des substances d'origine naturelle et de distribution restreinte, de structure souvent complexe, azotée (atome d'azote inclus dans un hétérocycle) et de caractère basique
- Les pseudo-alcaloïdes qui sont des métabolites présentant les caractéristiques des alcaloïdes vrais, excepté leur origine biosynthétique

- Les proto-alcaloïdes qui sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ont une réaction basique et sont élaboré in vivo à partir d'acides aminés [10].

### I.1.2 Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures résultant de la combinaison de plusieurs unités d'isoprène ( $C_5H_8$ ) (**Figure2**), et ont formule de base des multiples de celle-ci, c'est-à-dire  $(C_5H_8)_n$ .

- Avec :
- n = 1  $C_5H_8$  l'isoprène.
  - n = 2  $C_{10}H_{16}$  monoterpènes.
  - n = 3  $C_{15}H_{24}$  sesquiterpènes.
  - n = 4  $C_{20}H_{32}$  diterpènes.
  - n = 5  $C_{25}H_{40}$  sesterpènes.
  - n = 6  $C_{30}H_{48}$  triterpènes.
  - n = 8  $C_{40}H_{64}$  tétraterpènes. [11]



**Figure2.** L'isoprène ( $C_5H_8$ )

### I.1.3 Les polyphénols

Les composés phénoliques sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérive du phénol  $C_6H_5OH$  qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arome, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Ces composés représentent 2 à 3% de la matière organique des plantes et dans certains cas jusqu'à 10% et même d'avantage. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins) [13].

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé (Figure3) [14].

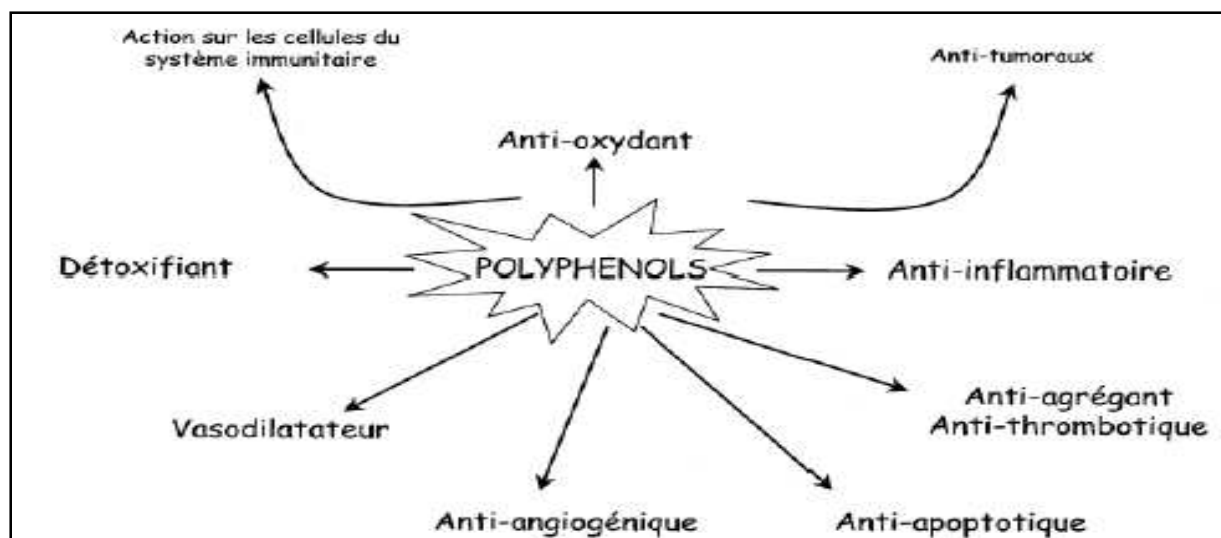


Figure3. Effets biologiques des polyphénols [19]

En effet, leur rôle d’antioxydants naturels suscite de plus en plus d’intérêt pour la prévention et le traitement du cancer [15].

Plusieurs classes de composés polyphénoliques sont définies selon le squelette de base (Tableau1).

Tableau 1: les différentes classes des composés phénoliques [16]

Squelette carbonée	Classes de composés phénoliques
C <sub>6</sub>	Phénols simples et benzoquinones
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides phénoliques
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acétophénone et les acides phénylacétiques
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, chromons
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphthoquinones
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanthones
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes et anthraquinones
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
(C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> ) <sub>2</sub>	Tannins hydrolysables
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes et néolignanes
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoïdes
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines
(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Catéchols
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tannins condensés

Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes [17].

## II. Les flavonoïdes

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de Szent Gyorgyi en 1938. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavonoïque.

Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine P n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines. Les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses [20].

### II.1. Définition et généralités

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes [21].

Le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= *flavus* en latin) qu'ils engendrent. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration ; au delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes [22].

Les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs selon le type de l'espèce : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois...etc. Aussi, ils varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal [21].

### II.2. Structure et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone, à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques, que désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C, portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. On signale que le noyau flavone est lui même un dérivé du noyau flavane de base (**Figure4**) [20].

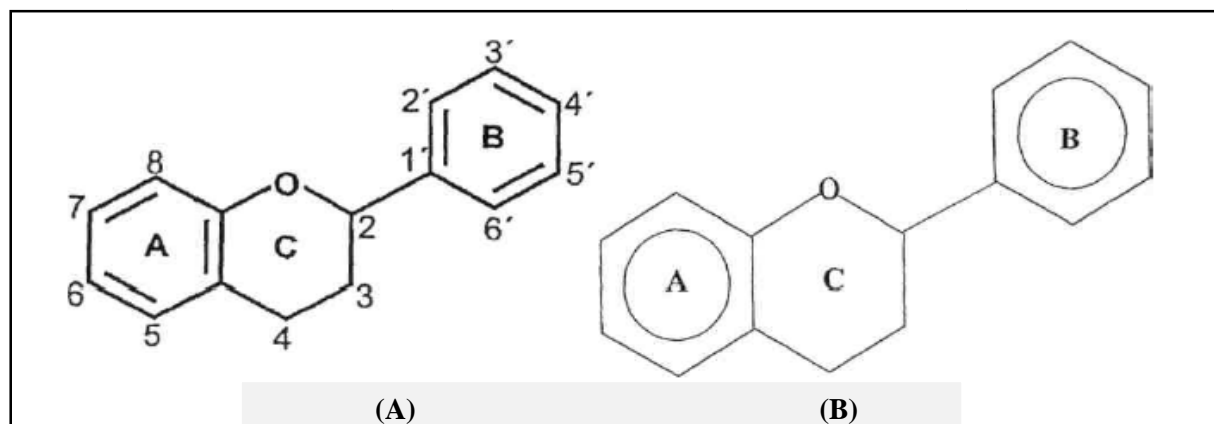
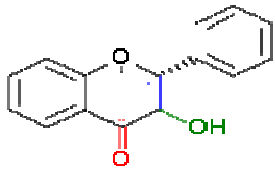
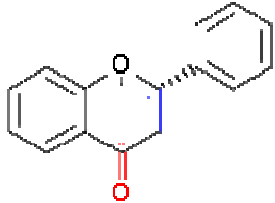
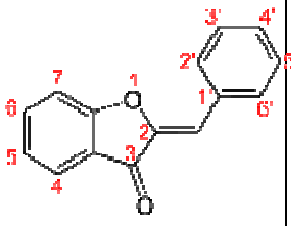
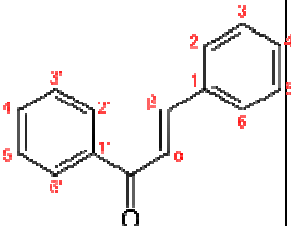


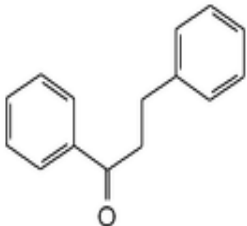
Figure4. (A) : Structure de base des flavonoïdes ; (B) : Schéma simplifié des flavonoïdes

La distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale C. On peut distinguer notamment dans les flavonoïdes (Tableau2) [24] :

Tableau2 : Les flavonoïdes *stricto sensu*.

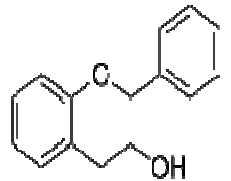
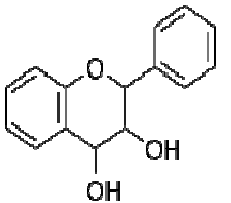
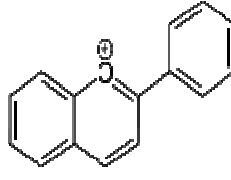
CLASSE	SQUELETTE	Aglycones	Hétérosides	Dérivés méthoxylés
FLAVONE	<p>2-phénylchromen-4-one</p>	Lutéolol (OH:5, 7,3',4'), Apigénol (OH:5, 7,4').	7-O--glucoside de lutéol, 6-C-glucoside d'apigénol, <u>Apiine</u> .	Tangéritine (CH <sub>3</sub> :5,6,7,8, 4'), Nobiletine (CH <sub>3</sub> :5,6,7,8,3', 4'), Géraldone (7,4'-dihydroxy-3'-méthoxyflavone).
FLAVONOL		Quercétol, Kaempférol, Myricétol, Fisétol.	Rutine, 3, 7,4' -O- triglucoside de kaempférol, 3-O-galactoside	Pachypodol, Rhamnazine, 3,7-diméthylquercétol, Isorhamnétol.

	<p>3-hydroxy-2-phénylchromen-4-one</p>		d'isorhamnétol.	
FLAVANONOL	 <p>3-hydroxy-2,3-dihydro-2-phénylchromen-4-one</p>	<p>dihydro-kaempférol, dihydroquercétol</p>	<p>3-O-rhamnoside de dihydroquercétol, 3-O-rhamnoside de dihydromyricétol.</p>	
FLAVANONE	 <p>2,3-dihydro-2-phenylchromen-4-one</p>	<p>Naringétol, Eriodictyol, Butine.</p>	<p>Hespéridine Naringine, Néohespéridine, Didymine.</p>	<p><u>Hespéridine</u>, <u>Homoeriodictyol</u>.</p>
AURONE		<p>Hispidol, Aureusidine, Sulfurétine, Maritimétine.</p>		
CHALCONE		<p>Iso-liquiritigénine, Butéine.</p>		Xanthohumol.

<p>DIHYDRO CHALCONE</p>		<p>Phlorétine.</p>	<p>Aspalathine, Naringine dihydrochalcone, Néohespéridine dihydrochalcone, Nothofagine, Phloridzine.</p>	
-----------------------------	---	--------------------	--	--

Ces 7 classes constituent les flavonoïdes *stricto sensu*. Au sens large, il faut inclure aussi les flavanols et les anthocyanidols (**Tableau3**) [24] :

**Tableau3: FLAVANOLS, ANTHOCYANIDOLS**

CLASSE	SQUELETTE	Aglycones	Polymères	Hétérosides
<p>FLAVAN-3-OL</p>		<p>Afzéléchol, Catéchine, épicatéchine, Gallocatéchine</p>	<p>procyanidine, prodelphinidine Théaflavine,</p>	<p>épicatéchine (3-O-b)- D-glucopyranoside</p>
<p>FLAVAN-3,4-DIOL</p>		<p>Leucopélargonidol, Leucocyanidol, Leucodelphinidol</p>	<p>procyanidine, prodelphinidines oligomères</p>	
<p>ANTHOCYANIDOL ou ANTHOCYANIDINE</p>	 <p>Cation flavylum</p>	<p>Pélargonidol, Cyanidol, Delphinidol, Malvidol, Paéonidol, Pétunidol</p>		<p>ANTHOCYANOSIDES (=anthocyanes) : cyanidol 3,5- diglucoside, cyanidol 3-O- arabinoside,.</p>

**II.3. Distribution et localisation**

Les flavonoïdes se répartissent dans les organes aériens jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux) où ils sont localisés dans les tissus superficiels (assise palissadique), et parfois dans les racines. Au niveau cellulaire, les flavonoïdes de type hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux [25].

**II.4. Pharmacocinétique des flavonoïdes**

Les études de Vanessa et al [27] montrent que la biodisponibilité des flavonoïdes dépend de trois facteurs essentiels : La capacité de transport à travers la bordure en brosse des anthérocytes, l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang et de la capacité de la sécrétion biliaire. Les flavonoïdes présentent une faible biodisponibilité avec une élimination lente qui diffère d'un flavonoïde à l'autre. En prenant comme exemple, la quercétine, le principal flavonoïde consommé par l'homme dans ses aliments (persil, oignon, myrtilles, cerises), après 174 min, un temps de demi-vie d'absorption de 52 min, de distribution de 228 min et d'élimination de 1008 min [27].

Les flavonoïdes sont présents dans notre alimentation sous plusieurs formes. Cette particularité va leur conférer des métabolismes différents. Les formes libres (aglycones) peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle tandis que les formes glycosylés doivent être hydrolysées, sous l'influence des glycosidases, par la flore intestinale au niveau du côlon avant d'être absorbées [28]. Cependant les formes libres issues de cette hydrolyse peuvent également être dégradées par la microflore en acide phénolique, lui même absorbé ou éliminé [29].

Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie. Les métabolites, glucuro- et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination totale. En effet, les flavonoïdes sont transformés, dans l'entérocyte, en flavonoïdes conjugués par méthylation, sulfatation, glucuronidation. Une partie de ces flavonoïdes est déversée dans le sang tandis qu'une autre est destinée vers la lumière intestinale ce qui constitue l'un des mécanismes de contrôle de l'absorption intestinale de ces substances phénoliques[27].

Dans le sang, les flavonoïdes ne sont pas présents sous leur forme native car ils ont été transformés, à cause de leur transformation au niveau du foie et de la cellule intestinale. La

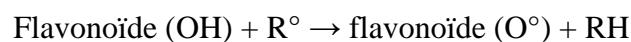
fraction des flavonoïdes conjugués destinée finalement vers les tissus pourrait avoir un effet biologique potentiel ou serait éliminée dans les urines. Cependant, d'autres flavonoïdes conjugués pourraient être déversés dans l'intestin via la bile et y être hydrolysés par les enzymes de la flore intestinale libérant ainsi de nouveaux aglycones en constituant probablement un recyclage entérohépatique des flavonoïdes qui permet le maintien d'une concentration non négligeable dans le sang [30].

## II.5. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être "veino-actifs", c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance [31].

### II.5.1. Propriétés antioxydants et piègeurs de radicaux libres

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydant et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\circ$ ), anions superoxydes ( $\text{O}_2^{\circ -}$ ) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante:



### II.5.2. Activité des flavonoïdes contre le cancer

L'effet bénéfique des flavonoïdes dans la thérapie contre les cancers serait lié à leur capacité à agir comme antioxydant grâce à leur capacité de réduction des ERO endogènes. Mais, en tant que pro-oxydant, ils interviendraient également dans la fragmentation apoptotique des cellules. Ces effets peuvent être expliqués par différents mécanismes.

- Ils pourraient agir comme agents bloquant les étapes d'initiation. Ils influencent le métabolisme des procarcinogènes en modulant l'activité du Cytochrome P450 impliqué dans leur activation en tant que carcinogènes. Ils peuvent limiter la formation des cellules initiatrices en stimulant la réparation de l'ADN.

- Ils pourraient supprimer les agents carcinogènes et inhiber la formation et la croissance des tumeurs en inhibant la prolifération cellulaire.
- Ils pourraient induire l'apoptose des cellules tumorales, la protection contre les dommages oxydatifs sur l'ADN, l'inhibition de l'activation des carcinogènes, et l'activation des systèmes de détoxification [37].

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments.

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

La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHDG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN [38,39].

### II.5.3. Autres propriétés biologiques

Activité anti-inflammatoire, Activité anti-ulcérogène, Activités antimicrobienne et antivirale, Activité de prévention de la cataracte diabétique, Activité anti-ostéoporose, Activité antiallergique,.....

### II.5.4. Prévention contre la cardiotoxicité induite par la doxorubicine

Des études ont été menées à la recherche des agents protecteurs contre la cardiotoxicité de la doxorubicine qui combinent à la fois un pouvoir chélateurs d'ions métalliques et une propriété piègeuse de radicaux libres sans influencer pour autant l'activité antitumorale de la doxorubicine [124]. Ces critères s'appliquent exactement sur certains flavonoïdes qui se sont avérés des antioxydants puissants et des inhibiteurs de la carbonyl réductase, enzyme responsable du métabolisme de la doxorubicine en doxorubicinol plus toxique [125]. Par ailleurs, une étude décrite par Brchm M. et coll. A montré qu'*in vitro* les deux extraits de plantes riches en flavonoïdes (*Ginkgo biloba*, *Crataegus oxyacantha*) n'affectent pas l'activité cytostatique de la doxorubicine [126].

Ce qui nous a incité à tester, dans le cadre de ce travail, l'effet préventif des flavonoïdes contenus dans l'extrait de *Ruta montana* sur la toxicité cardiaque causée par la doxorubicine *in vivo*.

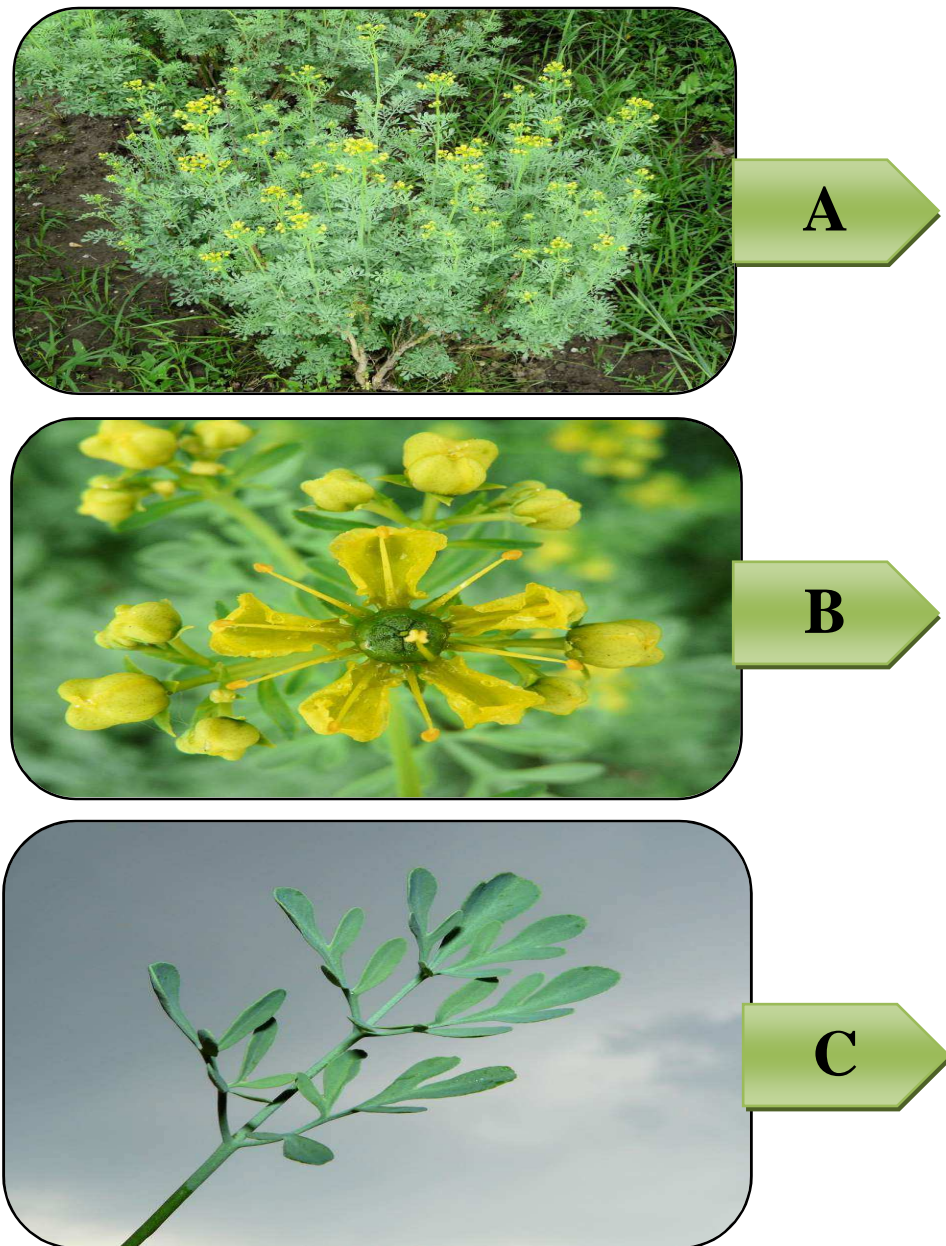
### III. Les plantes médicinales

#### III.1. La plante médicinale *Ruta montana*

La famille des *Rutaceae* a été décrite initialement en 1782 par Durande, puis par A.L Jussieu en 1789 [114]. La famille des *Rutaceae* comprend près de 1500 espèces regroupées en environ 150 genres [114,13]. Cette famille caractérisée par des poches sécrétrices [115]. Le genre *Ruta* est représenté en Algérie par 5 espèces : *Ruta montana*, *Ruta chalepensis*, *Ruta tuberculata* [114,116], *Ruta angustifolia* et *Ruta latifolia*. Les espèces diffèrent entre elles par l'allure des feuilles, de la grappe fructifère, des bractées et des sépales [117,118].

#### III.2. Description de la plante

Plante glauque, glabre, glanduleuse dans le haut de 20-40 cm de l'hauteur à tige rameuse dans sa partie supérieure, semi-ligneux. Les feuilles oblongues dans leur pourtour, finement découpées en segments linéaires-obtus, le terminal un peu plus large et a fleurs jaunes, petites, bradées, à 0.6 cm de longueur [117,119]. Les sépales lancéolés en alêne, longuement acuminés, à pétales concaves, denticulés sur les marges [117,118]. Calice persistant ; Elles comportent 4 à 5 carpelles libres, multiovulés, à style soudé. A maturité, le fruit est une capsule globuleuse, s'ouvrant en deux valves et laissant apparaître une graine globuleuse noire et brillante [114]. La floraison dans la période située entre Mai et Juillet [114]. (Figure5)



**Figure5.** Quelques photos de *Ruta montana*. (A) la plante entière, (B) la fleur, (C) les feuilles.

### III.3.Place dans la systématique

- Règne : *Plantae*
- Sous règne : *Tracheobinota* (plantes vasculaires)
- Division : *Magnoliophyta* (plante a fleures)
- Sous division : *Angiospermae*
- Classe : *Magnolipsida* (dicotylédones)
- Sous classe : *Rosidae*
- Super ordre : *Rutanae*
- Ordre : *Sapindales*
- Famille : *Rutaceae*
- Genre : *Ruta L.*
- Espèce : *Ruta montana (Clus.)L. (الفيجل) [120]*

### III.4.Répartition géographique

*Ruta montana* pousse spontanément dans les roches, les lieux arides, vieux murs, collines sèches et elle est abondante dans les terrains calcaires des régions méditerranéennes. En Algérie, elle est rencontrée dans les zones montagneuses de l'intérieur sur l'Atlas Saharien et les pelouses arides [114].

### III.5.Utilisation en médecine traditionnelle

*Ruta montana* très utilisée dans la pharmacopée traditionnelle [121]. En Algérie elle est utilisée comme un remède pour emménagogue, rubéfiant antispasmodique. Elle a également été utilisée en Espagne comme un remède pour la fièvre, emménagogue, abortive, antispasmodique [122]. Les différentes parties de la plante sont utilisées ;

- La décoction de racines ou de feuilles est absorbée pour déclencher l'avortement [119].

- L'infusion de feuilles sèches est utilisée pour ses vertus diurétiques, emménagogues et aphrodisiaques, elle calme aussi les douleurs d'estomac [119,123].
- Le suc obtenu par l'écrasement des feuilles est instillé dans les yeux lors de la maladie oculaire [119].
- La plante fraîche est appliquée contre les maux de tête [119].

### III.6.Composition biochimique et propriétés biologiques

*Ruta montana* est une source de diverses classes de produits naturels tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les huiles essentielles, les coumarines, les phénols, les saponines, les lignines et les terpènes, avec des activités biologiques, y compris antifongique, phytotoxiques, avortée, dépresseur, antidote, anti-inflammatoire et antioxydant [122,123].

## IV. Stress oxydant, radicaux libres et antioxydant

L'oxygène (O<sub>2</sub>) est indispensable à la plupart des espèces vivantes, fournit un énorme pouvoir métabolique pour la production d'énergie. Cependant, en raison de sa conformation chimique, la molécule d'O<sub>2</sub> peut, dans certaines circonstances, s'avérer toxique. Cette toxicité est induite par des éléments réactifs, instables et pro-oxydants : les radicaux libres de l'oxygène (RLO) ou espèces réactives de l'oxygène (ERO). Dérivés pour la plupart de l'O<sub>2</sub> et produits par divers mécanismes physiologiques; ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Inopportunistement, ils peuvent induire des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques. Afin que les ERO n'exercent pas de façon incontrôlée leurs effets délétères, l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense constitué par les Antioxydants (AO). Dans les circonstances quotidiennes normales, des ERO sont produits en permanence en faible quantité, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par les AO qui sont produits d'ailleurs en fonction des radicaux générés. La balance oxydants/antioxydants est alors en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en AO ou par suite d'une surproduction d'ERO, le déséquilibre observé correspond au "stress oxydatif " [41].

### IV.1. Les radicaux libres et les espèces réactives oxygénées

Les radicaux libres sont des entités chimiques (atome, molécule, fragment de molécule) hautement réactives (demi-vie courte) possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche orbitale la plus externe qui cherchent à se stabiliser par appariement avec des électrons arrachés sur d'autres molécules situées dans un environnement proche [42,43,44,45,46]. Parmi les espèces radicalaires qui se forment dans les cellules, on distingue des composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et dénommés radicaux primaires. Les autres RLO, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de radicaux primaires sur les composés de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l' $O_2$  tels le radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et le radical hydroxyl ( $OH^{\bullet}$ ), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces réactives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ), ne sont pas des RLO, mais des espèces réactives précurseurs de radicaux (Figure 6) [47].

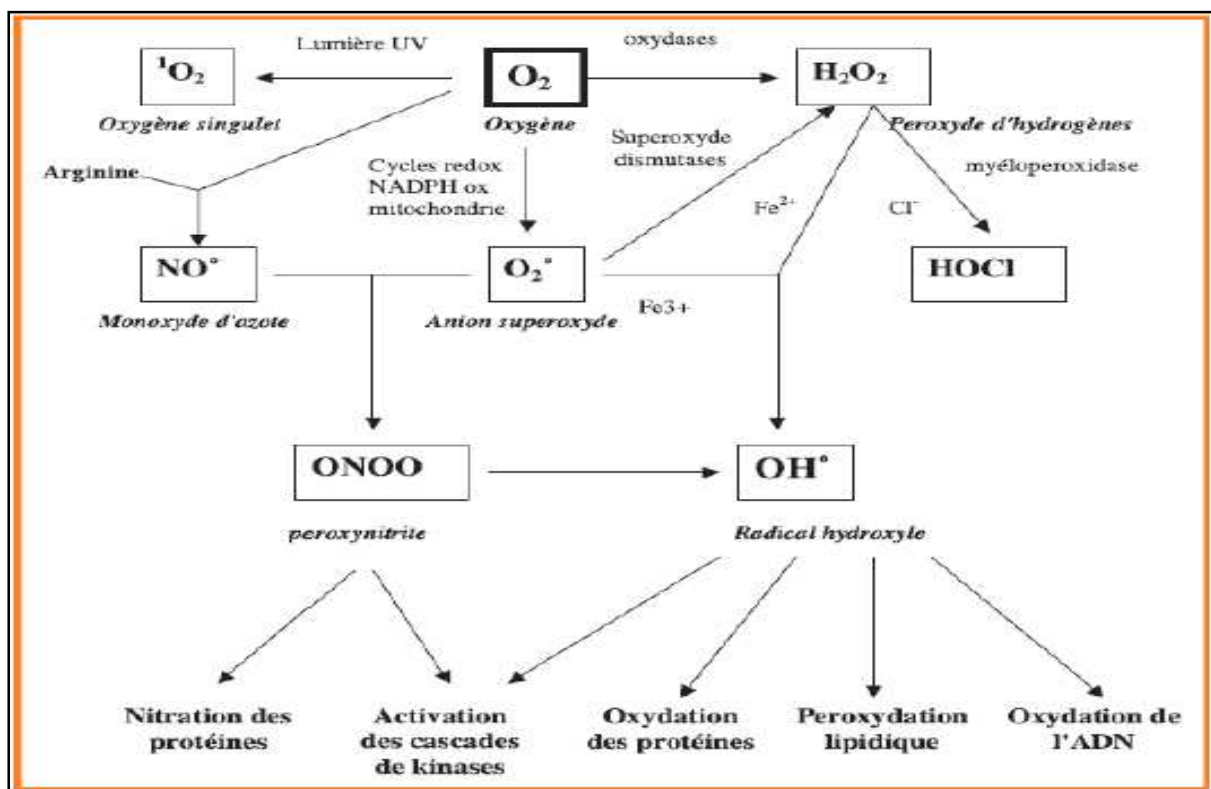


Figure 6. Radicaux libres : métabolites dérivés de l'oxygène [47]

#### IV.1.1. La formation des ERO

- A. Le radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  est formé chimiquement par l'addition d'un électron supplémentaire à la molécule d' $O_2$ . Cette réaction peut se dérouler accidentellement dans la chaîne respiratoire mitochondrie suite à la fuite d'un électron de ses

transporteurs qui se lie à l' $O_2$ . Les Polymorphonucléaires (PMN) et les macrophages forment la source essentielle d' $O_2^{\bullet-}$  dans les tissus. Ce radical est considéré comme un agent antibactérien. La production se fait par l'enzyme membranaire NADPH oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène générant ainsi l' $O_2^{\bullet-}$ . Il est un radical de faible réactivité pourtant il peut attaquer les tissus et se dismuter spontanément en milieux aqueux pour donner  $H_2O_2$  et  $^1O_2$ . Ces derniers peuvent à leur tour causer des dommages cellulaires [48].

- B. Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  peut être produit par certaines bactéries pathogènes, par les phagocytes, par la voie de la NADPH oxydase ainsi que par dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ . Malgré que ce soit un faible oxydant, sa capacité à produire des dommages est élevée en raison de son habileté de diffuser librement à travers les membranes. Il a été proposé que le  $H_2O_2$  puisse agir comme un signal métabolique déclenchant des événements intracellulaires pré-inflammatoires [49].
- C. Le radical hydroxyl  $OH^{\bullet}$  est produit par une réaction entre le  $O_2^{\bullet-}$  et le  $H_2O_2$ . C'est une procédure complexe catalysée par les ions métaux  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$  et résumée par l'équation appelée réaction de Haber-Weiss. Le radical hydroxyl est le plus réactif chez l'homme. Il peut attaquer la membrane cellulaire et préférentiellement l'acide arachidonique [50].
- D. L'oxygène singlet  $^1O_2$  n'est pas un vrai radical. Molécule instable capable d'oxyder d'autres molécules, elle est très réactive avec les lipides membranaires produisant les peroxydes.
- E. L'acide hypochlorique est formé par l'action des myéloperoxydases des phagocytes et il est libéré dans le milieu extracellulaire. C'est un fort agent antibactérien, mais il est capable aussi d'interrompre certaines fonctions des protéines même à de très faibles concentrations. La lyse cellulaire s'opère à des concentrations élevées d'acide hypochlorique [51].

L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote peut être produit par les macrophages et par l'endothélium vasculaire. C'est l' $O_2^{\bullet-}$  qui interagit avec le  $NO^{\bullet}$  et abouti au  $ONOO^{\bullet-}$  qui peut endommager les molécules biologiques [51].

### IV.1.2. Les sources des ERO

Les principales sources des radicaux libres sont soit endogènes ou exogènes, elles sont résumées dans la (Figure7).

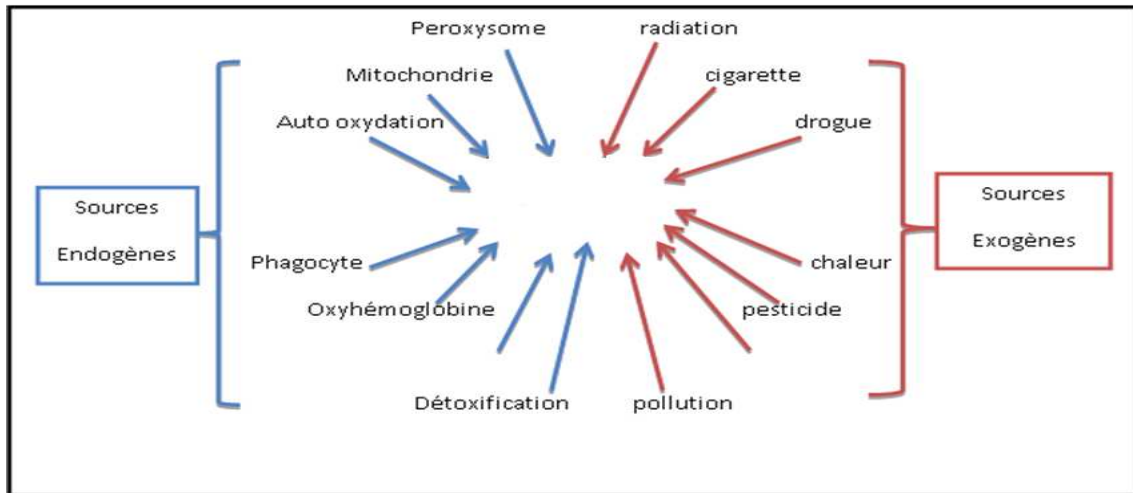


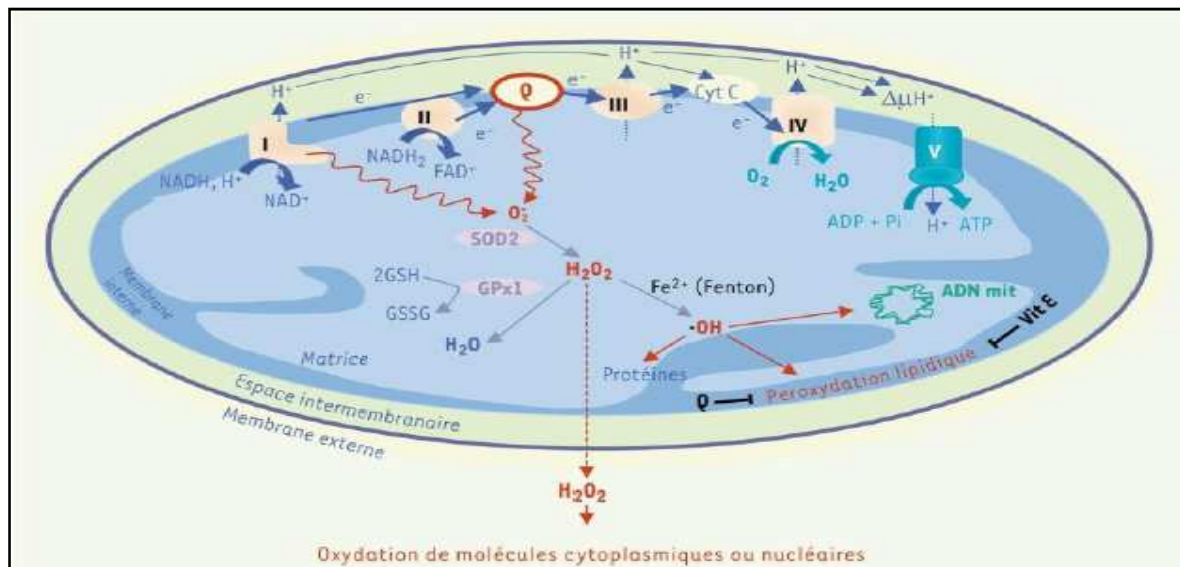
Figure 7. Les principales sources des ERO [52].

#### IV.1.2.1. Les sources endogènes

De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir la molécule d'oxygène est susceptible d'être à l'origine d'une production d'ERO [53].

- A. Au niveau des mitochondries (Figure8), au cours du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, l' $O_2^{\bullet -}$  est produit par réaction de l' $O_2$  avec un radical semi-ubiquinone. Son caractère continu et ubiquitaire pourrait être à l'origine d'un stress oxydatif responsable de dommages dont l'accumulation favoriserait le processus du vieillissement cellulaire.
- B. Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires in vitro : ils transforment le  $H_2O_2$  en radical  $OH^{\bullet}$ , encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique. En situation physiologique, la concentration libre de fer ou de cuivre est particulièrement basse. En revanche, les destructions cellulaires entraînent une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydatif.
- C. Aussi, des ERO sont produits au cours de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes de même que durant le catabolisme de certaines molécules exogènes ou endogènes comme les catécholamines.

- D. cytochrome P450 ; l'oxydation des médicaments, des drogues ou des composés chimiques par cet enzyme.
- E. Les cellules phagocytaires (PMN et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase spécialisée dans la fabrication du  $O_2^{\bullet-}$ . Cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée. La forte consommation d' $O_2$  qui en résulte est appelée "respiratory burst". Cette production de  $O_2^{\bullet-}$  est à l'origine de la synthèse de molécules comme le  $H_2O_2$  ou l' $HOCl$ , indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Cette voie est particulièrement stimulée au cours des processus inflammatoires.



**Figure 8.** Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde [54]

#### IV.1.2.2. Les sources exogènes

- A. Les radiations ionisantes de la lumière: les rayons X et  $\alpha$  ionisants sont capable de générer des ERO en scindant la molécule d'eau. Lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets, ils forment des ERO en activant des molécules photo-sensibilisantes.
- B. Le stress: les facteurs personnels et émotionnels, les traumatismes physiques...
- C. L'âge: avec l'âge les cellules sont moins actives et produisent ainsi beaucoup plus d'ERO.
- D. Les substances chimiques: les herbicides, insecticides...
- E. L'alcool, le tabac: ils s'oxydent au niveau du cytochrome P<sub>450</sub>. La fumée de la cigarette contient du fer et du cuivre qui stimule la production des radicaux  $OH^{\bullet}$ .

- F. Les médicaments: ceux contenant du fer administrés en grande quantité peuvent conduire à la formation de  $\text{OH}^\bullet$  très toxique pour l'organisme. Les antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité [56].
- G. Les particules inhalées: l'amiante, la silice... sont susceptibles d'exacerber la phagocytose [55].

#### IV.1.3. Le rôle physiologique des ERO

Les ERO remplissent de très nombreuses fonctions utiles. Ils participent à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes (phagocytose des bactéries par les macrophages), à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au dysfonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes..., les cytokines inflammatoires ou les carcinogènes chimiques. Ayant besoin d'une certaine quantité d'espèces réactives de  $\text{O}_2$ , l'organisme ne cherche pas à les détruire mais à contrôler leur niveau pour éviter le stress oxydatif [49].

#### IV.1.4. Principales cibles des ERO

Les causes essentielles du stress oxydatif sont d'origine [57] :

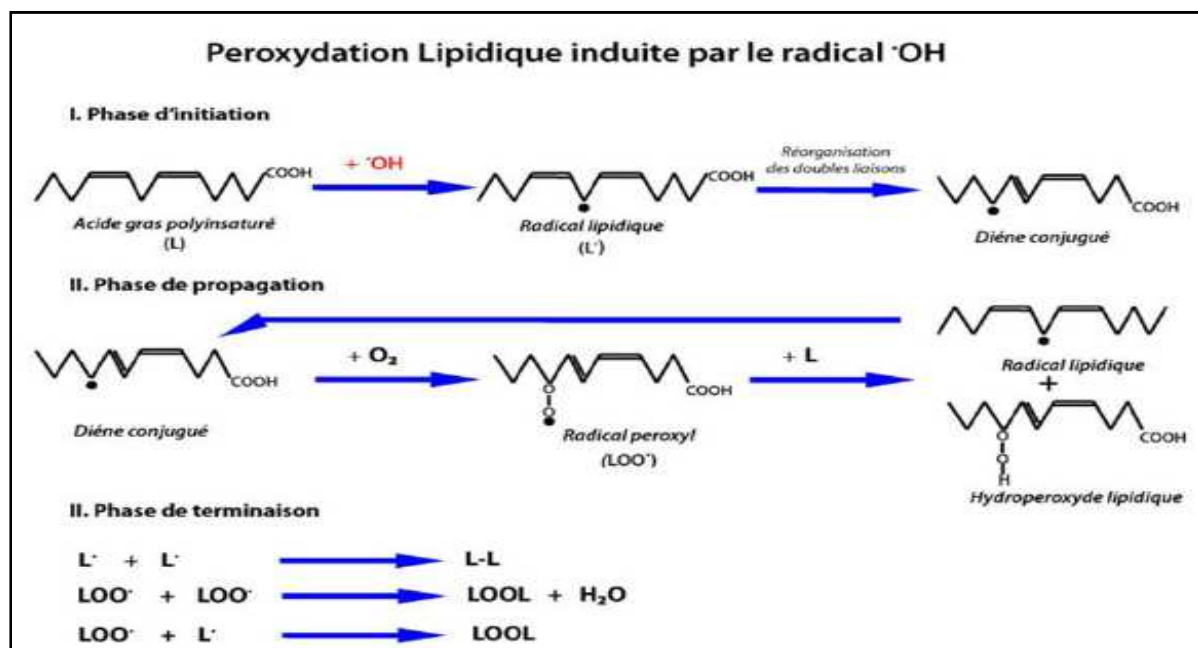
- A. **Nutritionnelle:** la rupture d'équilibre peut provenir d'une défaillance nutritionnelle ou de la carence en un ou plusieurs des antioxydants apportés par la nutrition comme les vitamines ou les oligo-éléments, présents en quantité limitée dans l'alimentation.
- B. **Accidentelle:** la surcharge en facteurs pro-oxydants (fer, acides gras) par exemple dans le cas d'inflammation ou l'exposition à des xénobiotiques pro-oxydants...
- C. **Génétique:** des anomalies génétiques peuvent être responsables d'un mauvais codage d'une protéine enzymatique antioxydant, synthétisant un antioxydant ou régénérant un antioxydant...

La production excessive de ERO provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions

secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Figure9**). L'organisme peut réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique [58, 55,57].

#### IV.1.4.1. Stress oxydant et lipides

Principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par  $\text{OH}^\bullet$  capable d'arracher un H sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne (**Figure9**). L'attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes aboutissant à la formation de LDL oxydées qui formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardio-vasculaires alors que l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction du signal [47].



**Figure 9.** Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés [47].

#### IV.1.4.2. Stress oxydant, les acides aminés et protéines

A cause de leur abondance dans l'organisme, les protéines sont une cible importante des EROs. Il a été estimé que les protéines pouvaient piéger la majorité des EROs générés (50–75%). Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui

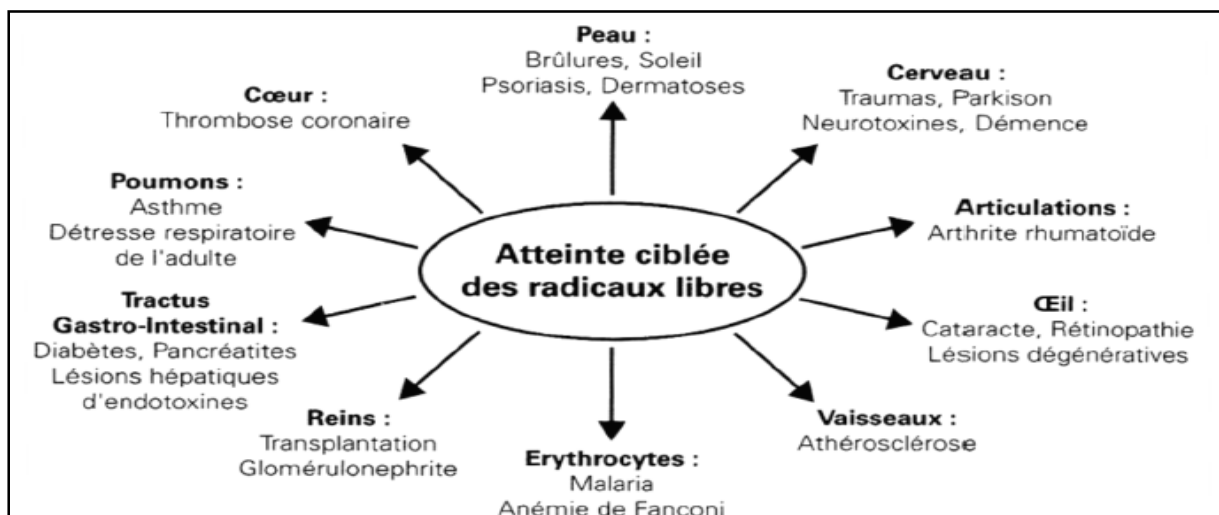
comportent un SH. Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques et deviennent plus sensibles aux protéases [1].

#### IV.1.4.3. Stress oxydant et ADN

Il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les ERO. Les bases qui composent l'ADN sont sensibles à l'oxydation. La modification de l'ADN induit des mutations souvent observées spontanément dans les cellules cancéreuses. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant des bases modifiées. Le stress oxydatif peut aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque des lipides dont la peroxydation génère des aldéhydes mutagènes, formant des adduits sur les bases de l'ADN [59].

#### IV.2. Les maladies liées au stress oxydant

Le stress oxydatif est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies; parmi ces maladies on cite les maladies cardiovasculaires, le diabète, la carcinogenèse, les maladies auto-immunes (sclérose en plaque), les maladies du système nerveux et les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson...), les problèmes de vision (cataracte), les troubles rénaux, les maladies respiratoires, les maladies inflammatoires... (**Figure10**) [60].



**Figure 10.** Troubles liés au stress oxydatif [60].

IV.3. Les systèmes de protection antioxydants

IV.3.1. Définition

Les antioxydants sont définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat. Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles [59]. Il existe deux sources de défenses antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamine C, vitamine E, caroténoïdes, flavonoïdes... Tandis que l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des co-facteurs importants pour l'activité de certains enzymes AO (Figure11) [60].

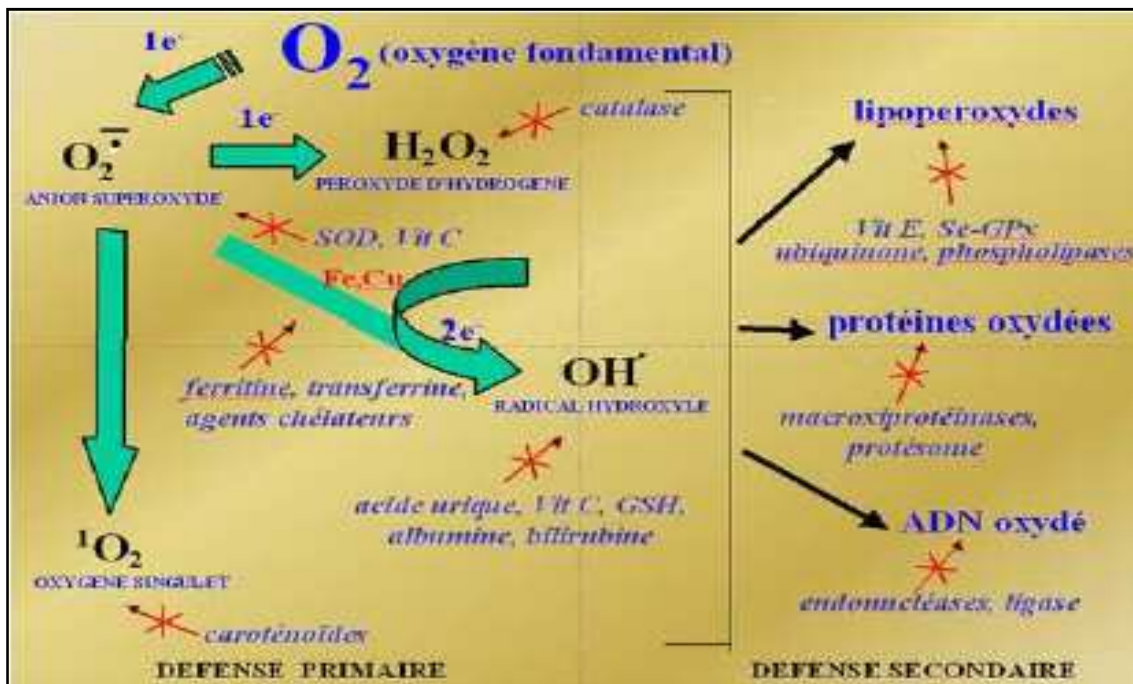


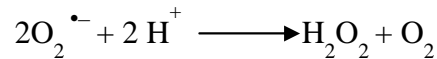
Figure 11. Antioxydants neutralisant les EROs [61].

IV.3.2. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les EROs [61].

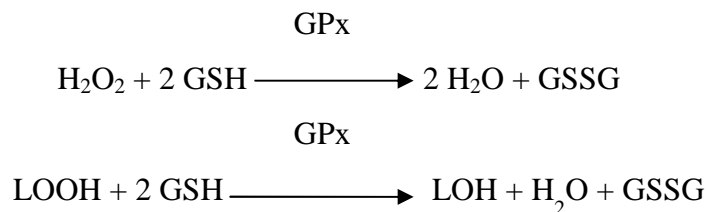
### IV.3.2.1. Superoxyde dismutase

Catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$  en  $H_2O_2$  selon la réaction suivante [62] :

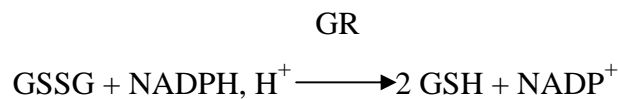


### IV.3.2.2. La glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR)

La GPx catalyse la transformation du  $H_2O_2$  et des hydroperoxydes de type lipidique (LOOH) [62].

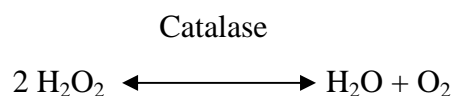


Le (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la GR utilisant le NADPH comme donneur d'électron [1].



### IV.3.2.3. Catalases

La catalase (EC : 1.11.1.6) est une enzyme hémique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène (généralement produit par les SOD) en eau et oxygène moléculaire. Elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, mais aussi dans les mitochondries et SOD [62]. La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène [61] :



### IV.3.3. Les antioxydants non enzymatiques endogènes

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, les hormones sexuelles, la

mélanine, la mélatonine, l'acide lipoiique et le coenzyme Q. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire) qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le  $\cdot\text{NO}$  [47].

#### IV.3.4. Les antioxydants non enzymatiques d'origine nutritionnelle

Plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés antioxydants remarquables. Les fruits et les légumes contiennent une grande variété d'antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et surtout les polyphénols [63].

##### IV.3.4.1. 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' $\alpha$ -tocophérol. Cette vitamine est décrite comme étant le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes chez l'homme. Situé dans les lipoprotéines et dans les membranes, l' $\alpha$ -tocophérol est capable, d'une part, de piéger chimiquement l'oxygène singlet ( $^1\text{O}_2$ ) en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ). Mais son principal rôle biologique est de réagir avec les radicaux peroxydes ( $\text{ROO}\cdot$ ) pour former un radical tocophéryle. L' $\alpha$ -tocophérol est régénéré essentiellement selon deux voies ; d'une part, la vitamine C, ou l'acide ascorbique [64].

##### IV.3.4.2. La vitamine C

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires. La vit C peut directement réagir avec des EROs comme  $\text{HO}\cdot$  ou  $\text{O}_2\cdot$ . Elle peut recycler l' $\alpha$ - tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides [1].

##### IV.3.4.3. Les caroténoïdes

Ce sont des pigments orange, rouge et jaune, liposolubles, synthétisés par les plantes. Ils regroupent les carotènes (dont les lycopènes) et les xanthophylles. Certains caroténoïdes jouent un rôle important dans la synthèse de la vitamine A. Ils présentent des propriétés antioxydants agissant surtout sur l'oxygène singlet  $^1\text{O}_2$  [65].

**IV.3.4.4. Les polyphénols**

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydants. En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxyles. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrice [66].

**VI. La doxorubicine**

Les RL sont impliqués dans plusieurs processus relatifs au cancer et plus particulièrement, à la chimiothérapie anticancéreuse. Dans cette partie, nous allons développer le rôle des RL dans la cardiotoxicité de la doxorubicine.

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, à l'origine de 8,2 millions de décès en 2012. Les cancers du poumon, de l'estomac, du foie, du côlon et du sein sont ceux qui entraînent le plus grand nombre de décès chaque année. Par ailleurs, les types de cancer les plus fréquents ne sont pas identiques chez les hommes et chez les femmes. D'après les projections, la mortalité due au cancer devrait augmenter de 50 % d'ici 2030[67]. Le terme médical utilisé pour décrire le cancer est néoplasie qui provient du grec et signifie nouvelle formation. Le cancer est donc le résultat de la multiplication anarchique de cellules anormales mutées d'un tissu, qui échappent aux mécanismes habituels de différenciation et de régulation lors de leur multiplication. Ces cellules sont capables d'envahir un tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis de migrer dans d'autres compartiments de l'organisme pour former des métastases [68,69].

Plusieurs voies thérapeutiques ont été décrites:

La chirurgie [70] ; La radiothérapie [71,72] ; L'hormonothérapie [73,74] ; La chimiothérapie [75,76].

**VI.1. Définition et origine**

La doxorubicine (ou adriamycine) est un médicament antibiotique anticancéreux de la famille des anthracyclines. L'histoire de la doxorubicine peut être rapportée aux années 1950,

lorsqu'un laboratoire italien "Farmitalia Research Laboratories" était à la recherche d'un composé anticancéreux. Dans ce cadre, une nouvelle souche de bactérie *Streptomyces peucetius* a été découverte, produisant un pigment rouge brillant qui a été isolé. L'antibiotique fabriqué par cette bactérie a présenté une activité anticancéreuse importante contre certains modèles de tumeurs murines. Ainsi, la première anthracycline découverte et utilisée fut la daunorubicine. Le suffixe -rubicine rappelle la couleur rouge intense. Les essais cliniques ont débuté en 1960 et le médicament reconnu un succès dans le traitement des leucémies aiguës et des lymphomes. Mais, en 1967 il a été démontré que la daunorubicine produit une toxicité cardiaque fatale. Des modifications ont été réalisées sur la machinerie génétique des *Streptomyces* pour produire un antibiotique différent. Ils nommèrent le nouveau composé adriamycine, puis a été changé en doxorubicine pour devenir conforme avec la convention pharmaceutique et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974. En 1976, il est apparu une troisième génération de ces molécules avec l'idarubicine, d'origine synthétique, obtenue en supprimant le radical méthoxyl de la daunorubicine [77,78].

À ce jour, la doxorubicine est la molécule de référence la plus utilisée en chimiothérapie malgré sa cardiotoxicité élevée. Elle possède un large spectre anticancéreux y compris les leucémies, les lymphomes (maladie de Hodgkin) et les tumeurs solides (cancer du sein et de l'ovaire, sarcomes osseux et tissulaires, neuroblastomes) [79].

## VI.2. Structure moléculaire

La structure des anthracyclines comprend deux parties:

- Une aglycone composée d'un noyau polyaromatique tétracyclique hydrophobe quasi plan portant des fonctions quinones et hydroquinones, qui leur permet de fonctionner comme accepteur et donneur d'électrons.
- Un aminosucre, la daunosamine, lié au carbone C7 de l'aglycone par une liaison glycosidique.

La doxorubicine (ou adriamycine) a une masse moléculaire de 578.98 Da, elle est composée d'un noyau tétracyclique chromophore relié par une liaison glycosidique à un substitut glucosamine; c'est l'anthracycline de référence (**Figure12**). La structure particulière des anthracyclines, en l'occurrence la DOX, leur permet d'interagir avec l'ADN et de s'intercaler

entre deux paires de bases du double hélice, ainsi qu'avec les lipides pour lesquels elles ont une forte affinité. Ces molécules réactives sont sensibles aux oxydoréductions cellulaires [80].

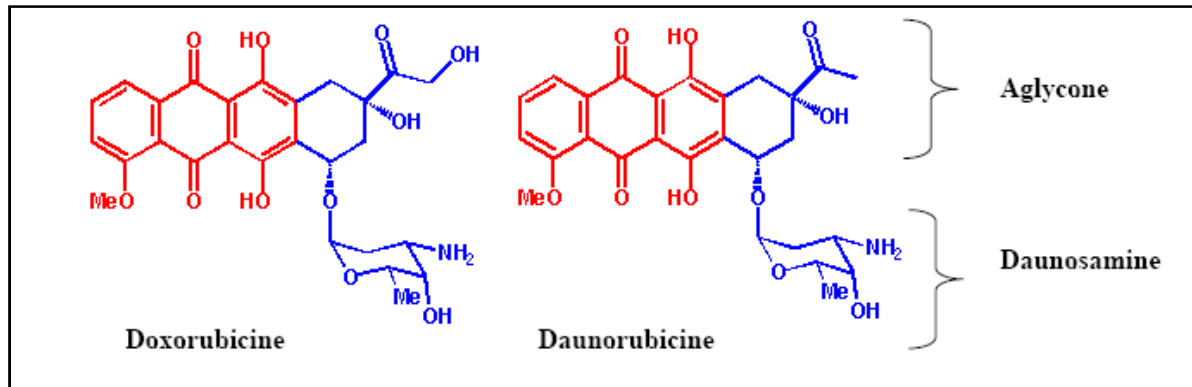


Figure12. Les structures moléculaires de la doxorubicine et daunorubicine.

### VI.3. Principaux mécanismes d'action antitumorale

La compréhension de l'action anticancéreuse des anthracyclines a considérablement progressé avec le développement de la biologie et de la pharmacologie cellulaire. Les anthracyclines s'intercalent entre les paires de bases azotées de l'ADN et inhibent l'activité de la topoisomérase II, d'où le nom d'intercalant donné à ce groupe de substances. Le noyau, les mitochondries et les membranes cellulaires des cellules tumorales sont les cibles potentielles des anthracyclines. La plupart d'entre elles forment des EROs responsables de leur toxicité, mais pas de leur activité antitumorale. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans leur activité anticancéreuse [59]:

- **Intercalation dans la molécule d'ADN:** les anthracyclines se lient de façon covalente aux doubles-brins de l'ADN pour former un complexe [ADN-anthracycline]. Ces liaisons se font principalement sur les résidus guanine de l'ADN et sont réversibles. Leur structure multicyclique plane leur permet de former des adduits ou ponts (crosslink) en s'interposant entre deux paires de bases adjacentes dans la double hélice et d'y contracter des liaisons hydrophobes et électrostatiques. En s'intercalant dans l'ADN, les anthracyclines inhibent la réplication, la transcription et donc la synthèse protéique [81].
- **Inhibition de l'enzyme topoisomérase II :** les topoisomérases sont des enzymes chargées de réguler les conversions topologiques de l'ADN. Leur fonction est essentielle durant de nombreuses étapes du métabolisme de l'ADN et permettent le bon fonctionnement nucléaire. Les topoisomérases II induisent des cassures doubles

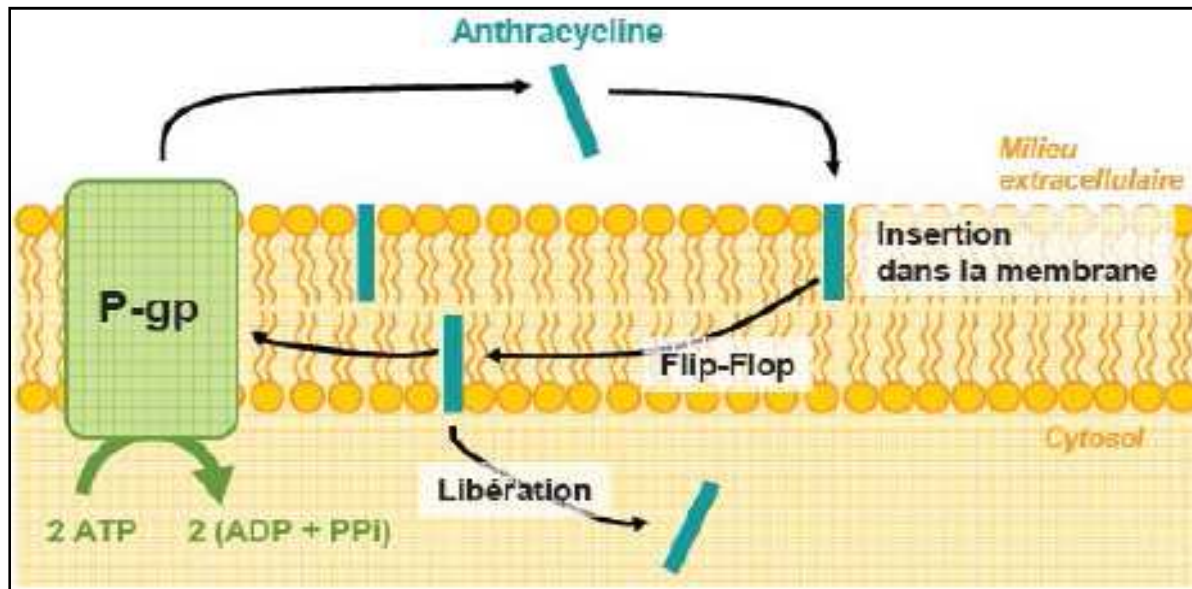
brins transitoires de l'ADN afin de permettre à un segment de l'ADN de passer à travers un autre et ensuite ressouder les segments coupés. Les anthracyclines en s'intercalant à l'ADN stabilisent le complexe transitoire de clivage [ADN-enzyme] et empêchent la relégation des brins par les topoisomérases II. Ainsi, la formation du complexe ternaire stable [anthracycline-ADN-topoisomérase II] stabilise les coupures double brins et prévient la topoisomérase II de relier les extrémités libres des segments coupés pour la restitution de la structure tridimensionnelle de l'ADN. L'inhibition de cette enzyme provoque un arrêt du cycle cellulaire en G2/M et la mort cellulaire. Les cellules en phase G0 ne possédant que peu de topoisomérases II sont peu sensibles à ces agents [82].

- **Inhibition de la synthèse d'ADN:** l'action pro-apoptotique des anthracyclines est en partie initiée par une voie de signalisation impliquant la protéine P53. En effet, la doxorubicine peut induire l'expression de cette protéine de manière dose dépendante. La p53 se fixe sur l'ADN, y active la transcription du gène Bax (médiateur pro-apoptotique), qui induit la libération du cytochrome c par ouverture des pores mitochondrial, et inhibe celle du gène Bcl-xL (médiateur anti-apoptotique). La synthèse d'ADN est donc inhibée [78].
- **Interaction avec les membranes plasmiques:** la doxorubicine et les anthracyclines en général ont une très forte affinité pour les membranes lipidiques à travers lesquelles elles diffusent passivement. Elles s'associent directement avec les phospholipides par interactions ionique. La présence d'anthracyclines au sein de la bicouche lipidique peut altérer la structure et la fonction membranaire en modifiant les interactions lipides-lipides et lipides-protéines, notamment les protéines membranaires impliquées dans les voies de signalisation cellulaires. La doxorubicine peut ainsi exercer son action cytotoxique directement en modifiant les propriétés de fluidité membranaire [83].

#### VI.4. Administration et pharmacocinétique

L'hydrophobicité de la doxorubicine associée à sa nature de base faible non chargée lui permet de diffuser passivement à travers la membrane plasmique par un mouvement de flip-flop du feuillet externe au feuillet interne (**Figure13**) [84]. Elle atteint le noyau toujours par diffusion pour enfin se lier à l'ADN. Au pH physiologique intracellulaire (7,2-7,4), le groupement sucre se charge positivement, ce qui permet de stabiliser la drogue intercalée via

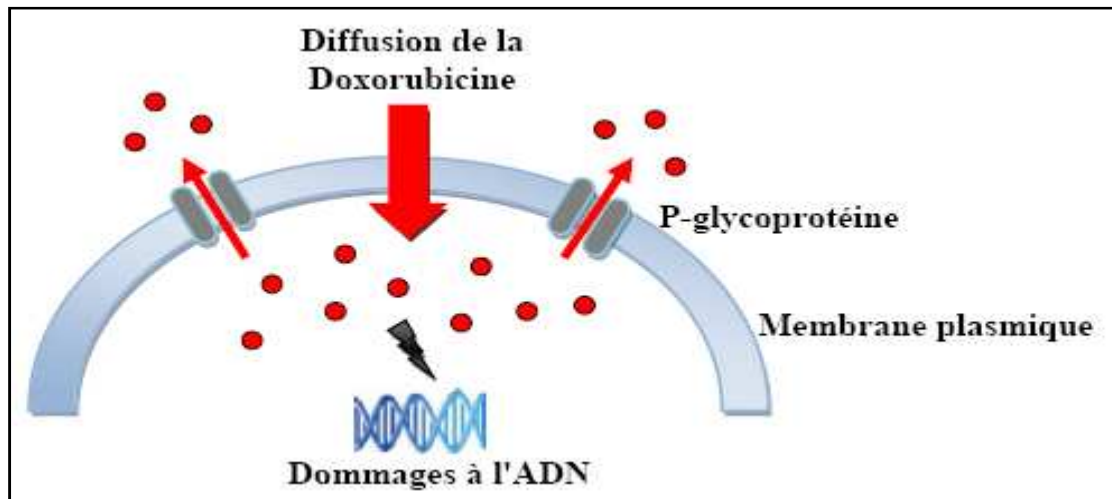
des liaisons électrostatiques. Le transport transmembranaire de la doxorubicine associe ainsi une diffusion passive et un efflux actif par la P-glycoprotéine (P-gP) dont le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé. Son accumulation intracellulaire est fonction de la cinétique d'incorporation qui dépend des mécanismes d'influx et d'efflux (**Figure14**) [85].



**Figure13.** Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline par flip-flop (changement de position des molécules d'un feuillet de la bicouche à l'autre).

Les anthracyclines sont administrées par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée, et en injection rapide, pour éviter une extravasation à côté de la veine qui endommagerait les tissus. Ces substances possèdent une importante diffusion tissulaire et sont rapidement captées par différents organes : cœur, reins, poumons, foie et rate, mais ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique [86].

Les études pharmacocinétiques montrent que la doxorubicine a un profil multiphasique, la phase initiale de distribution est rapide avec un temps de demi-vie entre 5 et 30 min et la phase finale d'élimination est lente avec un temps de demi-vie de 30 à 40 h. Elle est liée à 75 % aux protéines plasmatiques, surtout l'albumine [87]. La DOX est métabolisée, au niveau du foie, en doxorubicinol, son métabolite actif principal [88]. Elle est éliminée principalement par voie biliaire, mais également par voie rénale. En effet, 10 à 15 % de la dose administrée sont retrouvées dans les urines, ce qui explique la coloration rouge de l'urine, quelques jours après le traitement [89,90].



**Figure14.** Diffusion passive de la doxorubicine à travers la membrane plasmique et son efflux actif par la P-glycoprotéine.

## VI.5. Toxicité cardiaque des anthracyclines

Les anthracyclines représentent un pilier de la chimiothérapie; mais, leur cardiotoxicité est le facteur limitant dans la prescription de cette classe thérapeutique. En effet, l'utilisation des ces drogues s'accompagne d'un risque de 10 à 50 % de cardiotoxicité cumulative se traduisant par une cardiomyopathie. Celle-ci pouvant évoluer à plus ou moins long terme vers une insuffisance cardiaque (IC) congestive sévère et irréversible, engageant parfois le pronostic vital alors même que la tumeur est guérie ou contrôlée [103,104].

### VI. 5.1 Principaux mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines

Les études ont montré que les anthracyclines ont deux mécanismes d'actions distincts. En effet, l'activité antitumorale et la cardiotoxicité correspondent à des cibles intracellulaires différentes. L'action anticancéreuse est rapportée à un effet intercalant du médicament au niveau de l'ADN et à l'inhibition de l'enzyme nucléaire, la topoisomérase II, inhibant ainsi la transcription et la synthèse protéique. Cependant, cette enzyme est très peu exprimée dans les cellules cardiaques. Ce constat a conduit à la recherche d'autres mécanismes susceptibles de rendre compte de la toxicité cardiaque des anthracyclines [105]. Le mécanisme de cardiotoxicité n'est pas totalement connu.

Plusieurs hypothèses ont été avancées:

### VI.5.1.1.Hypothèse radicalaire

La pathogénie de la toxicité cardiaque des anthracyclines n'est pas clairement définie; elle est probablement multifactorielle, avec principalement production de RL de l'oxygène et de l'azote, perturbation de l'homéostasie calcique, apoptose cellulaire et modulation de l'expression de certains gènes de la signalisation cellulaire. L'hypothèse du développement d'un stress oxydatif induit par les anthracyclines est le plus communément admise. L'augmentation de la production de RL associée à une diminution des systèmes de défenses AO serait à l'origine des atteintes irréversibles observées au niveau des cardiomyocytes [94,95].

Les oxydants appartiennent à deux familles principales: les espèces réactives d'oxygène, dont le parent est  $O_2^{\bullet-}$ , et les espèces réactives d'azote, dont le parent est le  $NO^{\bullet}$  (Figure15).

#### 1) Formation d'espèces activées de l'oxygène

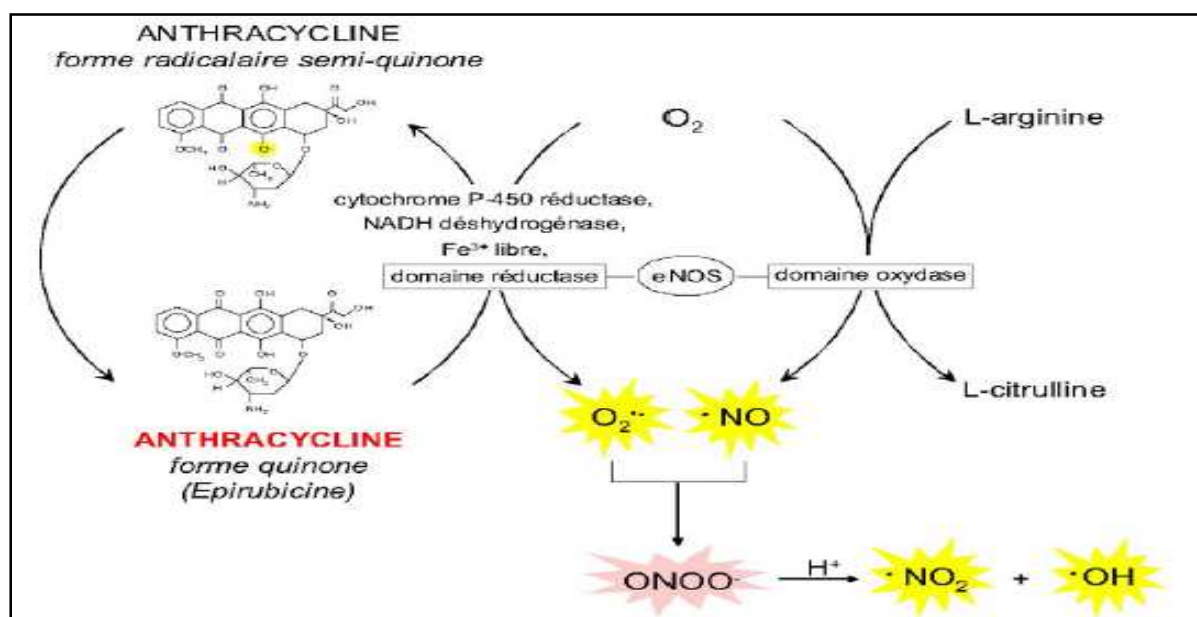
Le métabolisme de la doxorubicine entraîne l'apparition de RL, principalement l'anion superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  et le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$ . Ces molécules chargées négativement sont très instables et responsables de l'oxydation des lipides polyinsaturés, avec désorganisation membranaire et dysfonctionnement de la respiration mitochondriale. Les cellules myocardiques sont particulièrement sensibles aux RL car elles sont pauvres en agents AO comme la catalase et la SOD [96]. Ces RL sont créés par deux voies différentes :

- La voie de la réduction par les flavines réductases placées au niveau de la membrane mitochondriale avec transformation de l'anthracycline en dérivé semi-quinone puis hydroquinone en cédant des électrons. Les anthracyclines ont une structure de type quinone pouvant subir une réduction par les flavines réductases (cytochrome  $P_{450}$  réductase, NADH déshydrogénase), pour aboutir à la formation d'un dérivé semi-quinone radicalaire et induire une production accrue de ERO [97]. Ce dérivé peut subir une réduction en hydroquinone, ou retourner à sa forme initiale en cédant son électron célibataire à l'oxygène, produisant ainsi des radicaux superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Figure15).
- La voie non enzymatique par la réaction d'Haber-Weiss avec liaison du cation  $Fe^{3+}$  avec trois molécules de doxorubicine puis réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  avec transfert d'électrons [98]. Cette voie fait intervenir la formation d'un complexe entre les anthracyclines et le fer. Dans la cellule, l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  est libéré de ses sites de

stockage, transferrine et ferritine, par l'attaque des anthracyclines. Le  $\text{Fe}^{3+}$  se lie alors à trois molécules d'anthracyclines pour former un complexe très stable :  $\text{Fe}^{3+}$ -(anthracycline)<sup>3</sup>. Ce complexe subit un cycle d'oxydoréduction, donnant naissance à un complexe radicalaire  $\text{Fe}^{2+}$ -(anthracycline)<sup>3</sup>. Ce dernier peut céder son électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire et aboutir ainsi à la formation de radicaux  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Figure 15 et 16) [99].

## 2) Formation d'espèces activées de l'azote

Le  $\text{NO}^{\cdot}$  est produit à partir de L-arginine et d'oxygène par le domaine oxydase de l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS). De plus, sous l'effet de stimuli inflammatoires induit par les anthracyclines, le  $\text{NO}^{\cdot}$  est également produit à partir de L-arginine par l'enzyme NO synthase sous sa forme inducible (iNOS) présente au niveau des macrophages et des cellules vasculaires. Les anthracyclines peuvent aussi être réduites par le domaine réductase des eNOS en dérivé radicalaire semi-quinone qui, en présence d'oxygène, peut conduire à la formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  [100]. Les deux radicaux  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et  $\text{NO}^{\cdot}$  sont modérément toxiques individuellement, mais lorsqu'ils sont produits de façon concomitante et en grandes quantités, ils se combinent immédiatement pour former un oxydant puissant, le peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Celui-ci peut générer le radical  $\text{OH}^{\cdot}$  indépendamment des processus faisant intervenir le fer (Figure 15 et 16) [101].



**Figure 15.** Production de radicaux superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines et formation de peroxy-nitrites ( $\text{ONOO}^-$ ) [101].

Dans les cellules myocardiques, en présence de la doxorubicine, les RL sont formés à des concentrations très élevées ne pouvant pas être prises en charge par les systèmes de détoxification. Les RL sous formes d'anthracyclines radicalaires,  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ,  $ONOO^-$  ou autres jouent un rôle très important dans la cardiotoxicité induite par les anthracyclines. Ils induisent l'oxydation des constituants cellulaires (lipides, protéines, ADN) altérant leurs structures et leurs fonctions [59].

La peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés est responsable de l'altération et dégradation des fonctions membranaires: elle altère la physiologie des membranes cellulaires en induisant une diminution de leur fluidité membranaire, modifie leur perméabilité aux ions, entraîne l'inactivation d'enzymes et de récepteurs... L'oxydation des acides aminés modifie les structures secondaires et tertiaires des protéines, et entraîne des dénaturations, des fragmentations et la formation d'agrégats [78].

De plus, les lésions de la paroi des organites engendrées par les radicaux libres entraînent aussi une surcharge calcique mitochondriale. En effet, le stress oxydatif associé au traitement par les anthracyclines peut induire des lésions mitochondriales ayant pour conséquence une évolution de la cellule vers l'apoptose (Figure16) [102].

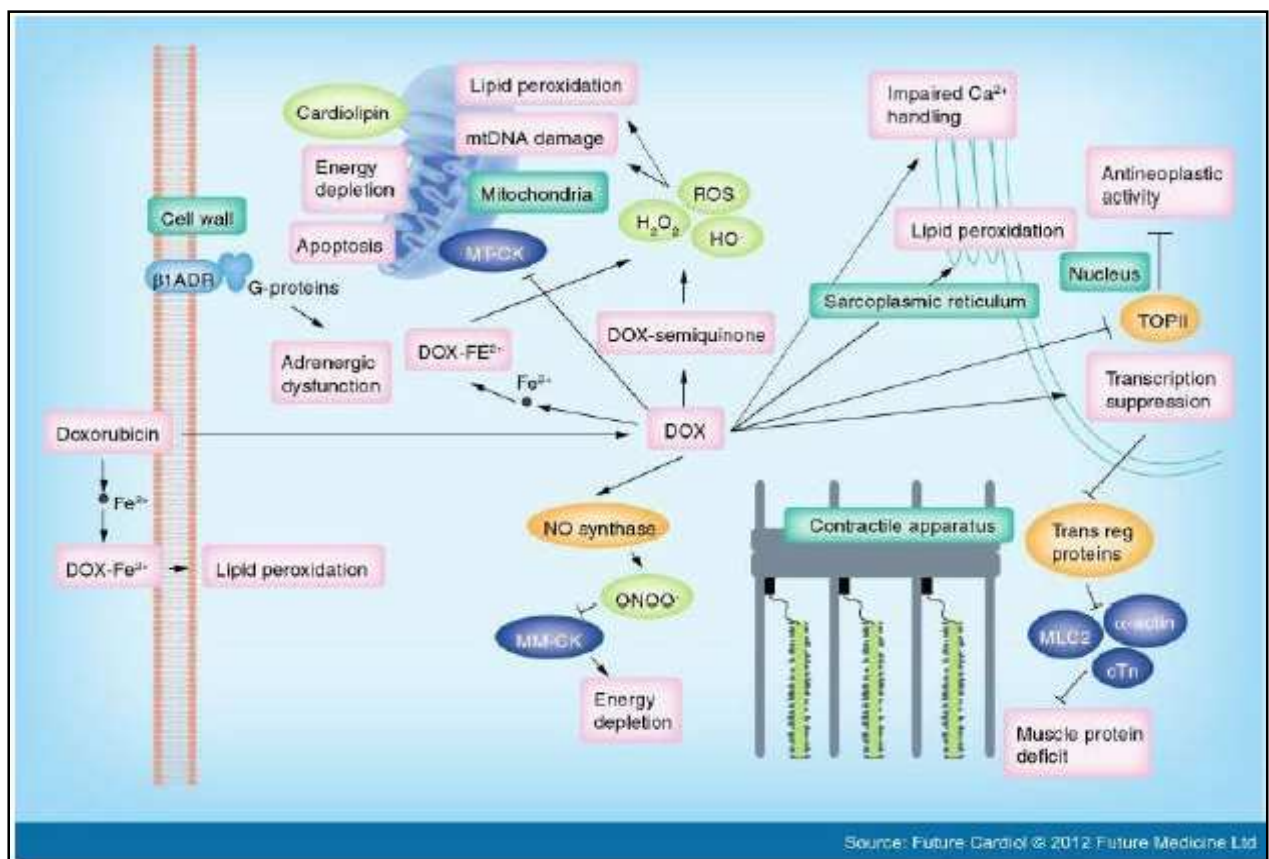


Figure 16. Mécanisme de la toxicodynamique et de la pharmacodynamique de la doxorubicine dans les cardiomyocytes[102].

### **VI.5.1.2. Hypothèse liée au niveau de l'apoptose cellulaire induite par la doxorubicine**

Une hypothèse physiopathologique est née du fait que les anthracyclines sont de puissants inducteurs d'apoptose impliquées dans le développement de l'insuffisance cardiaque. La maîtrise des mécanismes réactionnels cytotoxiques des anthracyclines s'intègre dans la compréhension des processus d'induction de la mort cellulaire [106]. Cette voie a été mise en évidence au cours de nombreuses expérimentations in vitro et in vivo qui ont montré que les anthracyclines pouvaient conduire à une perte de cellules cardiaques par apoptose. [107].

La cardiotoxicité provient de l'action pro-apoptotique initiée par les ERO qui activent la protéine p53. En effet, l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  entraîne l'activation de p53 qui à son tour permet l'induction de la cascade pro-apoptotique [109].

### **VI.5.2. Aspects histologiques des lésions cardiaques induites par la doxorubicine**

L'administration d'anthracyclines entraîne des lésions au niveau des cardiomyocytes et du tissu interstitiel cardiaque. L'évaluation histologique de la toxicité des anthracyclines a été rendue possible grâce au développement des techniques de biopsie endomyocardique. Macroscopiquement, le cœur endommagé par les anthracyclines est flasque et ses ventricules sont souvent dilatés. L'examen montre un épaissement endocardique et une fibrose interstitielle. L'administration de DOX entraîne des remaniements importants de la matrice extracellulaire : raréfaction, voir disparition du réseau fibreux périmyocyttaire, remplacé par des plaques de tissu fibreux cicatriciel dense. Microscopiquement, des anomalies quantitatives et qualitatives des cardiomyocytes ont été observées [110].

Les myocytes apparaissent petits, rétractés avec un cytoplasme présentant une accumulation lipidique, des lysosomes nombreux, une perte myofibrillaire et un aspect vacuolaire par distension du réticulum sarcoplasmique, puis un œdème interstitiel et une dégénérescence nucléaire surviennent, conduisant à la mort cellulaire [111].

## **VI.6. Biomarqueurs de la cardiotoxicité**

L'histoire des marqueurs cardiaques débute dès 1954 avec la détermination de l'activité de l'aspartate aminotransférase dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde (IDM), suivie rapidement par celle du lactate déshydrogénase. Ces marqueurs ont été beaucoup utilisés

jusqu'à l'introduction de la créatine phosphokinase dans les années 60 qui a permis d'augmenter la spécificité d'organe. Cette spécificité s'améliora encore avec la détermination de l'isoenzyme « cardiaque » de la créatine phosphokinase, la CK-MB. Puis vint l'utilisation de la myoglobine, précoce mais peu cardiospécifique, à la fin des années 80. Enfin, des marqueurs de sensibilité analytique très élevée, les troponines, furent développés au début des années 90. Très récemment, de nouveaux marqueurs sont apparus dans le cadre de la prise en charge de l'insuffisance cardiaque, les peptides natriurétiques [112].

### **VI.6.1. La CPK**

La créatine phosphokinase totale (CPK ou CK) est une enzyme intra cellulaire qui catalyse la phosphorylation réversible de la créatine en créatine phosphate par le complexe  $Mg^{2+}$ -ATP. Elle se trouve en majorité dans les muscles squelettiques et cardiaques, d'où son dosage lors des atteintes musculaires ou en cardiologie (IDM) [112].

### **VI.6.2. La LDH**

Le lactate deshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la transformation du pyruvate en lactate ou la réaction inverse, en présence de  $NAD^+$ / $NADH$ . Elle est retrouvée dans différents organes (reins, cœur, muscles, pancréas, rate, foie...). Le dosage de ce marqueur est ainsi retrouvé en hématologie, en oncologie, en cardiologie (IDM et suspicion d'hémolyse sur prothèse ou plastie dans les cardiopathies valvulaires et congénitales graves de l'adulte) et lors de pathologies diverses [112].

### **VI.6.3. Les transaminases**

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique à l'intérieur des cellules. Ces enzymes sont présentes dans plusieurs tissus (foie, cœur, reins, muscles ...) reflétant ainsi l'activité du foie et du cœur. Il existe deux types de transaminases : les SGPT, signifiant Sérum Glutamopyruvate Transférase (appelées aussi ALAT, Alanine-Aminotransférase) et les SGOT, pour Sérum Glutamooxaloacétate Transférase (dénommées également ASAT, pour Aspartate-Aminotransférase). Leur augmentation témoigne d'une lésion cellulaire dans le foie, le cœur, les muscles ou les reins.

Les ALAT (SGPT) se retrouvent essentiellement dans le foie, les reins mais également en faible quantité dans les muscles striés et dans les globules rouges.

Les ASAT (SGOT) se retrouvent plus spécifiquement dans les muscles striés, les globules rouges et dans le foie [113].

# **MATÉRIEL ET METHODES**

## **Chapitre II. Matériel et Méthodes**

Le travail expérimental, ayant pour objet l'étude de l'effet préventif de la plante médicinale: *Ruta montana* sur la cardiotoxicité induit par la doxorubicine. La partie expérimentale est réalisée au laboratoire de biologie, **Université Abbés Laghrour - Khenchela** et laboratoire central de biochimie, **Centre hospitalo-universitaire Dr Benbadis -Constantine**.

### **I. Matériel**

#### **I.1. Matériel biologique (Echantillonnage)**

##### **I.1.1. Matériel végétal**

L'espèce sélectionnée «*R. montana*» a été récoltée dans la région de Mila en Mai 2012 et identifiée par Mme Kabouche Z professeur au Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutique (LOST) de photochimie, à l'université Mentouri Constantine. La partie aérienne (feuilles, fleurs et tiges) de la plante récoltée a ensuite été séchée à l'abri de l'humidité et de la lumière du soleil pendant 1 mois. Enfin, la plante sèche a été pulvérisée au broyeur pour obtenir une poudre fine pour qu'elle soit prête à l'utilisation.

##### **I.1.2. Matériel animale**

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

##### **I.1.3. Le médicament anticancéreux : la doxorubicine**

Le médicament anticancéreux que nous avons utilisé pour provoquer la toxicité au niveau du cœur du rat est la doxorubicine (50mg/25ml) ; il nous a été fourni par le centre anticancéreux de Constantine (CHUC)

### **I.2. Réactifs chimiques et instrumentations**

Plusieurs réactifs chimiques et solvants ont été utilisés dans nos expériences, parmi ces produits: FeCl<sub>3</sub>, acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), HCl, acide acétique, NaOH, NH<sub>4</sub>OH, KI, I<sub>2</sub>, NaCl, AlCl<sub>3</sub>, quercétine, K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>, Gomme Arabique, acide orthophosphorique, méthanol, n-

butanol, Éther de pétrole, acétate d'éthyle, chloroforme, formol, proviennent tous de Sigma-Aldrich.

Parmi l'appareillage utilisé: Rotavapeur (**HAHNVAPOR**), spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (**JENWAY 6305 UV/VIS**), Chambre d'observation UV « 264/365 nm » (**VILBER COURMAT**), Bain Marie (**MEMMERT**), Etuve universelle de 5 à 220°C avec ventilation (**MEMMERT**), Agitateur magnétique (**SCIOLOGEX**), vortex (**VELP**) et Balance (**OHAUS**), Automate Architect (**ADVIA 1800**).

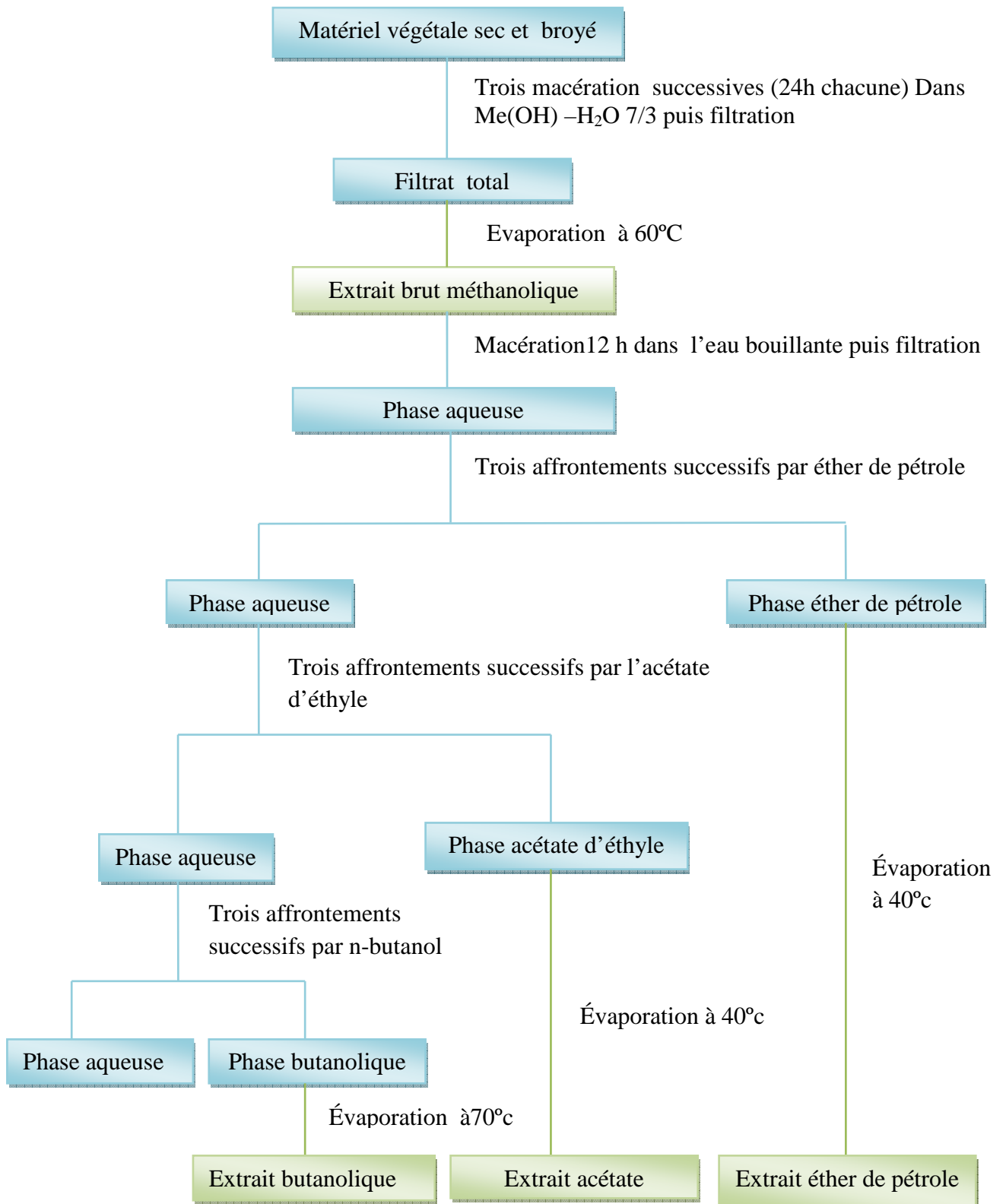
## II. Méthodes

### II.1. Méthodes concernant le matériel végétal

#### II.1.1. Préparation des extraits végétaux

##### II.1.1.1. Extraction avec différents solvants organiques à polarité croissante

La partie aérienne (tiges, fleurs et feuilles) de la plante *R. montana* a été bien nettoyée et séchée à température ambiante, ensuite broyée à l'aide d'un broyeur. La méthode de Markham [40] était suivie pour l'extraction des flavonoïdes en utilisant des solvants organiques à polarité croissante. Suivant cette méthode; 640 g de la poudre de *R. montana* est introduit dans un bécher qui contient le mélange hydroalcooliques; méthanol /H<sub>2</sub>O (7:3) pendant une nuit (macération alcoolique). Cette technique est effectuée 3 fois, suivie chaque fois d'une filtration et soumis à une évaporation rotative à 50 °C utilisant un rotavapeur (**HAHNVAPOR**) pour obtenir l'extrait brut méthanolique. L'extrait brut méthanolique a été initialement mélangé avec l'eau distillé pendant une nuit, Après filtration la phase aqueuse a été soumise à trois extractions successives liquide-liquide par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le butanol. La **Figure 17** résume les différentes étapes de cette extraction.



**Figure 17.** Les 3 différentes étapes d'extractions successives liquide-liquide par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le butanol

**II.1.1.2. Procédé de l'extraction des flavonoïdes totaux**

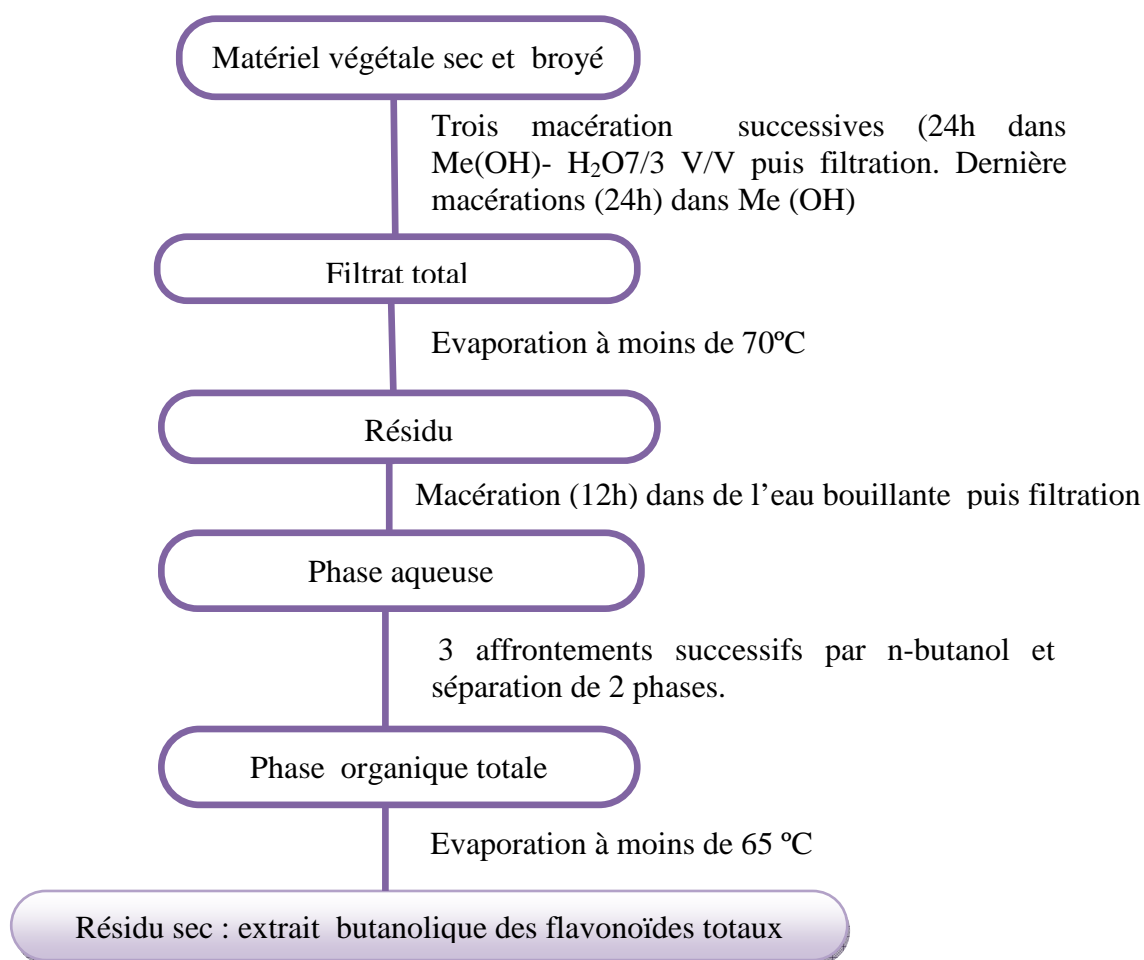
Afin d'extraire l'ensemble des flavonoïdes (aglycones et glycosylés), nous avons adopté la méthode de Harborne (1975) selon laquelle, un poids de 200 g de la poudre végétale (tiges, fleurs et feuilles) est mis en macération dans 1000ml du mélange méthanol/ eau (7 / 3) (V/V) pendant 24 heures puis filtré. Cette étape est répétée quatre fois avec le même mélange de solvants, la quatrième macération est chauffée. Le filtrat total obtenu est évaporé à moins de 60°C à sec et le résidu d'évaporation est macéré dans l'eau bouillante pendant une nuit, puis filtré par un papier filtre.

La deuxième étape consiste en l'affrontement de la phase aqueuse obtenue au n-butanol. Dans une ampoule à décanter, la phase aqueuse obtenue de la filtration est mélangée avec du n-butanol, après agitation puis décantation, deux phases sont obtenues; une phase organique (butanolique) en haut et une autre aqueuse plus dense en bas. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse subit un deuxième affrontement par le même solvant qu'est le n-butanol pour extraire le maximum de substances flavonoidiques. Enfin, la phase organique totale obtenue est évaporée à sec à 65°C par un évaporateur rotatif. Le résidu d'évaporation représente donc l'extrait des flavonoïdes totaux qui sera utilisé dans cette étude.

Le déroulement de la procédure d'extraction des flavonoïdes totaux est représenté dans la **Figure 18.**

**II.1.2. Rendement de l'extraction**

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale.



**Figure 18.** La procédure d'extraction des flavonoïdes totaux

### II.1.3. Screening chimique des plantes

Le screening chimique est un ensemble de réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des principales catégories des substances chimiques naturelles contenues dans une plante et responsables de propriétés pharmacologiques.

Les tests phytochimiques sont réalisés sur l'extrait brut méthanolique.

#### II. 1.3.1. Recherche des tanins

2 à 3 gouttes de la solution de  $\text{FeCl}_3$  à 2%, sont ajoutées à 2 mL de l'extrait brut méthanolique. La solution obtenue est reposée pendant quelques minutes. Le test est considéré positif s'il ya l'apparition d'une coloration bleu-noire et un précipité [91].

#### II. 1.3. 2. Recherche des saponosides

- **Test 1** : 5 ml de l'extrait brut méthanolique sont mélangés avec 10 ml d'eau distillée pendant 2 min. La formation d'une mousse persistante après 15 min confirme la présence des saponosides [91].
- **Test 2** : 5 ml de l'extrait sont mélangés avec 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. Une couleur rouge-marronne de la couche d'interface indique la présence des triterpènes hétérosidiques [92].

### **II. 1.3.3 Recherche des flavonoïdes**

5 ml de l'extrait méthanolique sont traités avec quelques gouttes d' $\text{AlCl}_3$  (1%). La présence des flavonoïdes est confirmée par l'apparition d'une couleur jaune [92].

### **II. 1.3. 4. Recherche des composés réducteurs :**

Ce test est basé sur la réaction de Keller-Kiliani, 5 ml d'acide acétique contenant des traces de  $\text{FeCl}_3$  et 5 ml d'acide sulfurique contenant des traces de  $\text{FeCl}_3$  sont ajoutés à 1 ml de l'extrait. La présence des composés réducteurs est confirmé par la formation de deux phases, une colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique) [91].

### **II. 1. 3. 5. Recherche des coumarines**

Parmi les composés réducteurs on note les coumarines, la mise en évidence de ces dernières se fait selon la méthode décrite par [92]. 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  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière ultraviolette. La fluorescence des taches confirme la présence des coumarines.

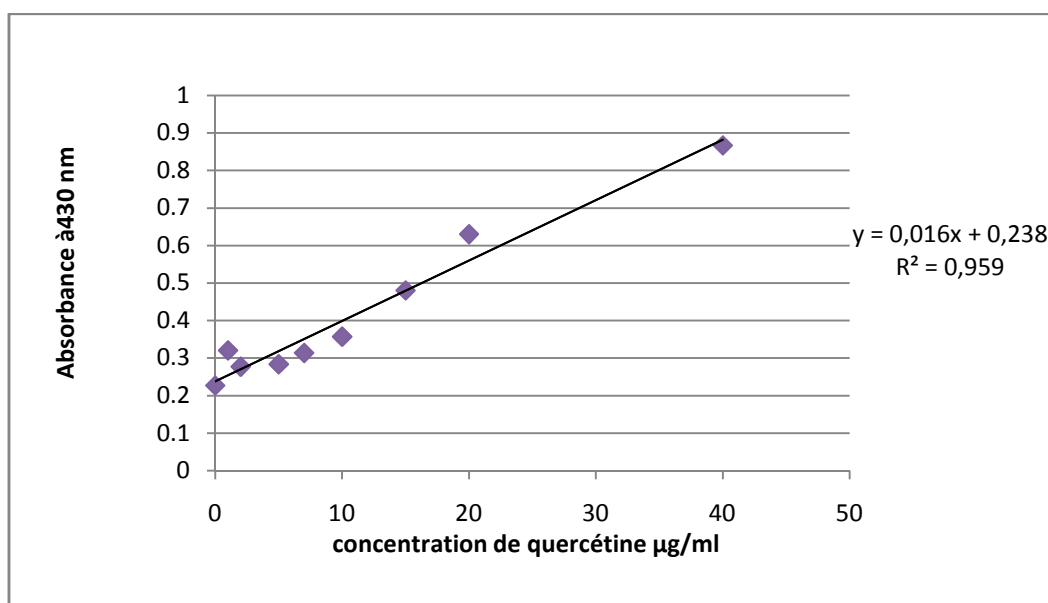
### **II. 1. 3. 6. Recherche des alcaloïdes :**

Ce test est fait pour révéler la présence ou l'absence des alcaloïdes sels. 5 ml d' $\text{HCl}$  (2N) sont ajoutés à l'extrait et chauffer dans un bain marie. Après la Filtration, le filtrat est traité avec le réactif de Wagner (2g de KI et 1,27g d' $\text{I}_2$  solubilisé dans 100 ml d'eau distillée). La présence de turbidité ou de précipitation indique la présence des alcaloïdes sels [92].

## II.1.4. Etude quantitative

### II. 1.4. 1. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes d'extraits, méthanolique, éther de pétrole, acétate d'éthyle, butanolique et des flavonoïdes totaux de *Ruta montana* ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium [93]; 1 ml de chaque extrait (préparés dans le méthanol pour avoir des concentrations convenables) a été ajouté à 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage  $y = ax + b$  établie avec la quercétine à différentes concentrations (0-40  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , chacune a été préparée dans le méthanol) pratiquée dans les mêmes conditions opératoires que les extraits servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes a été exprimé en milligrammes équivalents de quercétine par grammes du poids d'extrait (mg EQ / g E) (**Figure 19**).

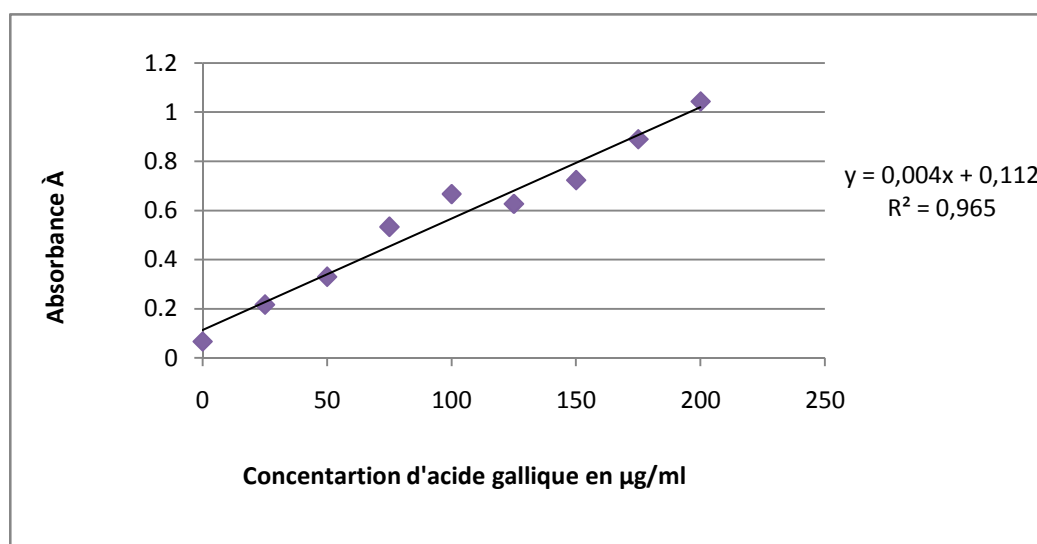


**Figure 19.** Courbe d'étalonnage de la quercétine

### II.1. 4.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de *Ruta montana* ont été effectué selon la méthode de bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifiée par Graham (1992). Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe} [\text{CN}]_6$ ) par les polyphénols pour donner les ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), ces derniers réagissent avec le

chlorure de fer( $\text{FeCl}_3$ ) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de chaque extrait (dilués dans l'eau distillée ou dans le méthanol) a été ajouté à 3 ml de l'eau distillée. Après agitation, 1 ml du  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (0.016 M) puis 1 ml du  $\text{FeCl}_3$  (0.02 M, dans le HCl 0.1 N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle de temps d'une minute. Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml Gomme Arabique 1 %, 30 ml acide phosphorique 85 % et 90 ml de l'eau distillée) ont été ajoutés et l'absorbance a été lue à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0-2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (**Figure20**) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids d'extrait



**Figure20.** Courbe d'étalonnage d'acide gallique(mg EAG / g E).

## II.1.5. Etude qualitative

### II.1. 5.1. Chromatographie sur couche mince

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

### II.1.5.2. Protocole de CCM sur gel de silice

Les analyses par CCM ont été effectuées avec des plaques de silica gel, sur support rigide en aluminium.

L'extrait est déposé à l'aide d'une micropipette (2  $\mu$ l) à des points repères à 1.5 cm du bord inférieur de la plaque. Ensuite, les plaques sont placées dans les cuves de développement dans lesquelles se trouve un système de solvants approprié appelé phase mobile, à environ 0,5 cm de hauteur. La migration est effectuée par l'utilisation d'éluant suivants:

- L'extrait éther de pétrole
- L'extrait acétate d'éthyle
- L'extrait butanolique
- L'extrait des flavonoïdes totaux

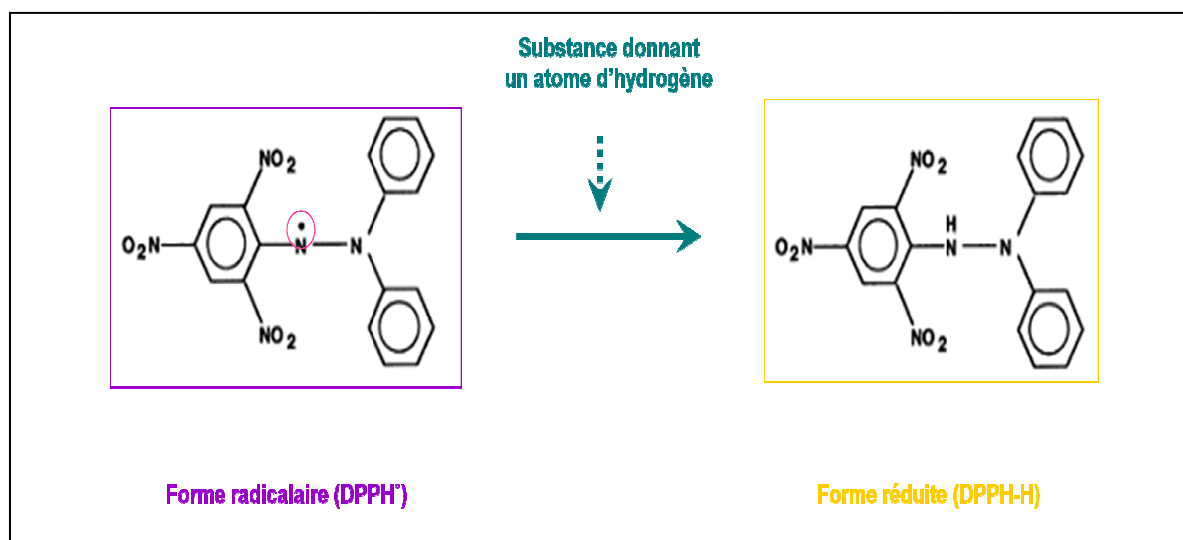
Après développement dans une cuve en verre et séchage, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 365 nm. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les Rf.

### II.1.5.3. Calcul du Rapport frontal

Pour chaque spot on a calculé le facteur de rétention qui est égal à la distance parcourue par le constituant/ la distance parcourue par le solvant. Ce facteur permet de mentionner une information préliminaire sur la structure des substances flavoniques.

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

La capacité de l'extrait à piéger les radicaux libres est déterminée par une méthode colorimétrique, simple et rapide. La méthode de *Koleva et coll, 2002* utilise le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) qui, à l'état stable, possède une coloration violette foncée, cette dernière devient jaune pâle, à l'état réduit du radical (**Figure21**). Ce changement de couleur est traduit par une décroissance du radical DPPH° à 517 nm.



**Figure21.** La réduction du DPPH<sup>•</sup> par un antioxydant [108].

### II.1.6.1. Réalisation de l'essai

Le DPPH<sup>•</sup> 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>) est solubilisé dans du méthanol absolu pour avoir une solution de 100μM.

A partir d'une solution méthanolique mère de C<sub>1</sub>= 10 mg/ml de l'extrait, les dilutions suivantes ont été préparées : C<sub>2</sub>: 5mg/ml, C<sub>3</sub>: 3mg/ml, C<sub>4</sub>: 2mg/ml, C<sub>5</sub>:1mg/ml, C<sub>6</sub> : 0,5 mg/ml, C<sub>7</sub> : 0,25 mg/ml, C<sub>8</sub> : 0,12mg/ml.

A chaque volume de 1,5 ml de la solution méthanolique du DPPH<sup>•</sup>, un volume de 15 μl de chaque concentration préparée de l'extrait est ajouté. Après agitation et incubation à la température ambiante pendant 15 min, les densités optiques des mélanges réactionnels sont mesurées par le spectrophotomètre à 517nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions par le méthanol.

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

### II.1.6.2. Expression des résultats

Pour obtenir la concentration efficace qui réduit la concentration initiale de DPPH<sup>•</sup> de 50%, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du DPPH<sup>•</sup> et donnés selon la formule suivante :

$$\text{Activité anti-radicalaire \%} = [(A_B - A_E) / A_B] \times 100$$

A<sub>B</sub> et A<sub>E</sub> sont les valeurs de l'absorbance du blanc et de l'échantillon respectivement à 517 nm. Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures ± écart type.

### II.2. Méthodes concernant le matériel animal

#### II.2.1. Traitement des animaux

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

- **Lot 1 (Témoin: 7 rats)** : animaux recevant l'eau saliné (5ml/Kg) par gavage pendant 15jours.
- **Lot 2 (extrait 7 rats)** : animaux recevant par voie orale l'extrait acétate d'éthyle de *Ruta montana* à la dose quotidienne de 100 mg/kg/5ml dilué dans d'eau distillée, pendant 15 jours.
- **Lot 3 (Doxo : 8rats)**: animaux recevant l'eau saliné (5ml/Kg) par gavage pendant 15jours puis traités le 12 jour par la doxorubicine seule à la dose unique de 15 mg/kg par voie intrapéritonéale.
- **Lot 4 (Extrait + Doxo: effet préventif: 8rats)** : animaux prétraités par l'extrait acétate d'éthyle à la dose quotidienne de 100 mg/kg par gavage pendant 15 jours, la doxorubicine est administrée à la dose unique de 15 mg/kg par voie intrapéritonéale, le 12<sup>ème</sup> jour du traitement.

La prise alimentaire est contrôlée quotidiennement dans chaque lot. L'état de santé général des animaux traités est observé et le poids corporel de chaque rat est mesuré chaque jour durant toute la période du traitement.

#### II.2.2. sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques:

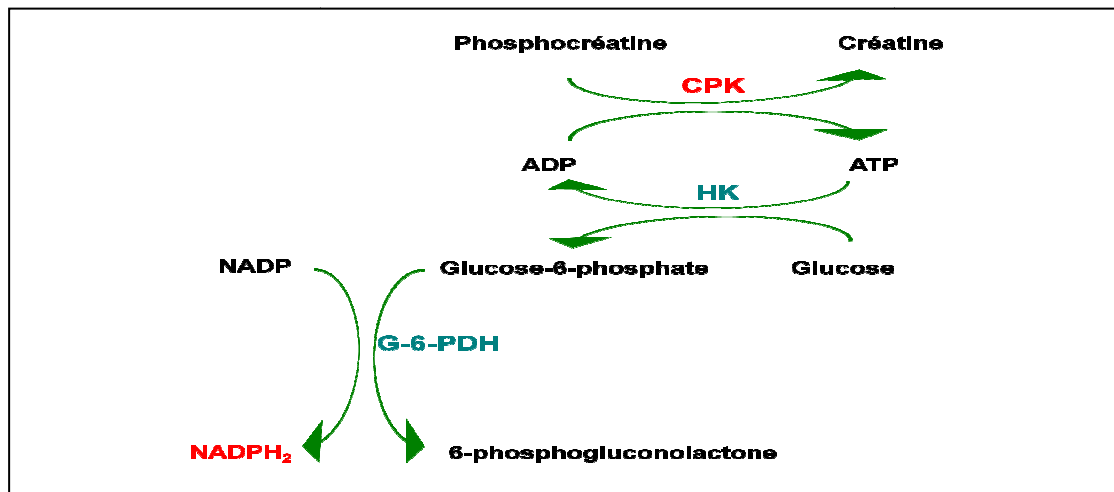
Le sacrifice des animaux sont fait après 48H de l'injection de la doxorubicine. Les animaux sont sacrifiés par décapitation, leur sang est récupéré sur tubes héparinés pour les études biochimiques et enzymatiques (dosage de la CPK, ASAT, ALAT et LDH).

##### II.2.2.1. Dosages biochimique in vivo (activité de CPK, ASAT, ALAT et LDH)

###### a- Evaluation de l'activité enzymatique de la CPK

La créatine phosphokinase (CPK) catalyse la phosphorylation de l'ADP en ATP via la conversion de la phosphocréatine en créatine. L'ATP produit de cette réaction est utilisé pour la phosphorylation de glucose en glucose 6-p (G-6-P) en présence de l'Hexokinase. Le G-6-P est ensuite oxydé par l'enzyme glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) via la réduction du NADP en NADPH. La vitesse de formation de ce dernier est mesurée à 340 nm

qui est proportionnelle à l'activité de la CPK se l'échantillon. Les réactions résumant le principe de la procédure est représenté dans la **Figure22**.



**Figure22.** Dosage de l'activité de la CPK.

#### **b-Evaluation de l'activité enzymatique de l'ASAT et l'ALAT**

L'aspartate aminotransférase (ASAT ou GOT) catalyse le transfert du groupement amine de l'aspartate sur l'alpha-cétoglutarate pour former une molécule d'oxaloacétate et de glutamate.

En présence de NADH<sub>2</sub> et de malate déshydrogénase (MDH), l'oxaloacétate est réduit en L-malate. Au cours de cette réaction, NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm (**Figure23**).

L'alanine aminotransférase (ALAT ou GPT) catalyse le transfert du groupement amine de l'alanine sur l'alpha-cétoglutarate pour former une molécule d'oxaloacétate et de glutamate.

En présence de NADH<sub>2</sub> et de lactate déshydrogénase (LDH), l'oxaloacétate est réduit en L-lactate. Au cours de cette réaction, NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm (**Figure23**).

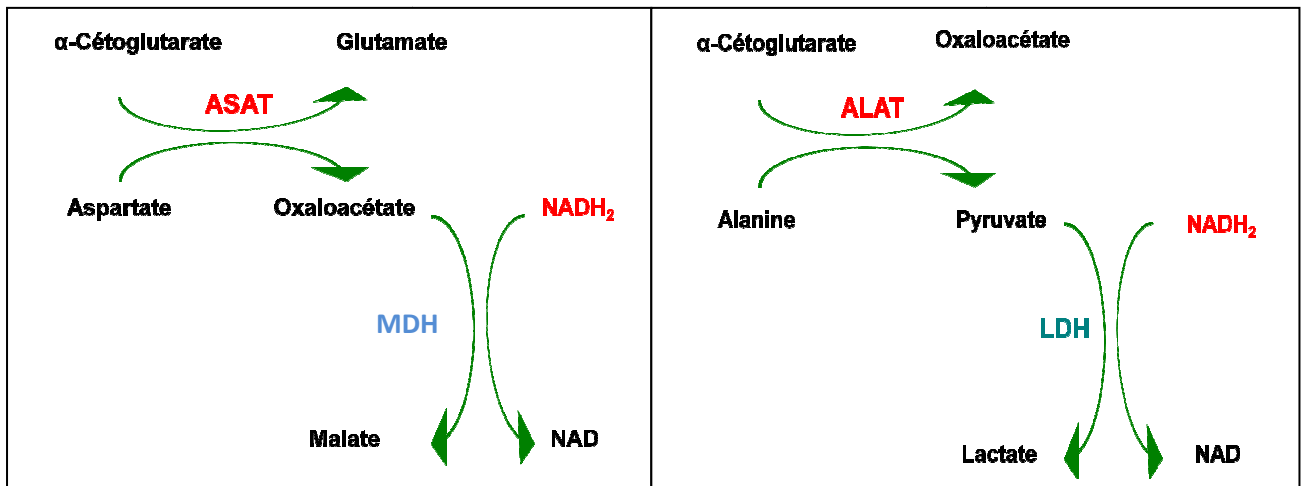


Figure23. Dosage de l'activité de l'ASAT(A), Dosage de l'activité de l'ALAT(B)

c- Evaluation de l'activité enzymatique de LDH

La lactate deshydrogénase (LD ou LDH) catalyse la réduction du pyruvate par le NADH, pour donner le lactate et le NAD<sup>+</sup> (Figure24). La concentration catalytique est déterminée à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesuré à 340 nm.

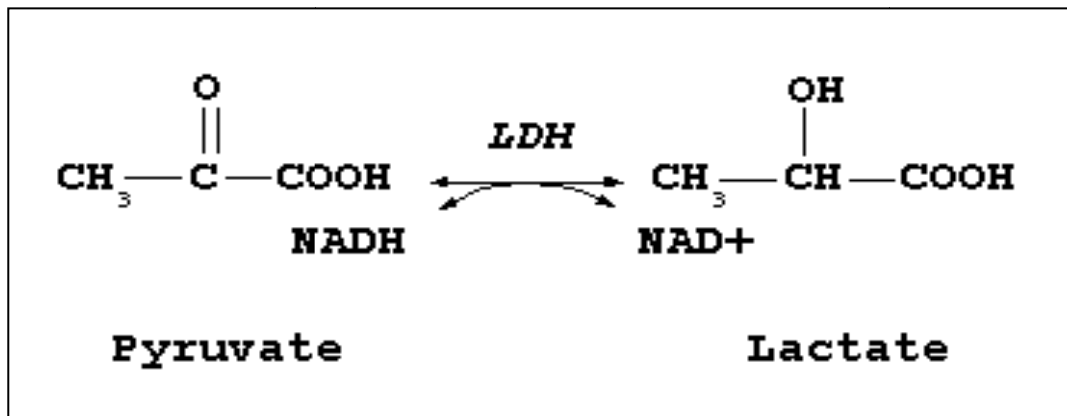


Figure24. Dosage de l'activité de la LDH

II.3. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été faites en triple, Les résultats ont été exprimés en moyenne avec son écart type (n = 3) pour chaque cas.

Les résultats quantitatifs des différentes évaluations réalisées *in vivo* sont exprimés en moyenne ± écart type. Ces résultats sont traités statistiquement par le test d'ANOVA.

Le seuil de signification est supérieur à 95% (p<0.05), tel que :

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

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

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

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

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

.

# **RÉSULTAT ET DISCUSSION**

## Chapitre III. Résultat et discussion

Le présent travail porte sur l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits de la partie aérienne de la plante médicinale « *R. Montana* ».

### I. Le rendement des extraits

a. L'extrait a été préparés à partir de la poudre de la partie aérienne de *R.Montana*; EMRM. Les résultats sont représentés dans le **Tableau4**.

**Tableau4.** Le rendement d'extrait méthanolique (EMRM) de *Rutamontana*

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
<i>Ruta Montana</i>	640	342	43.71

b. L'extraction des flavonoïdes de *R. Montana* a été effectuée par les solvants organiques à partir d'extrait méthanolique; La partition liquide-liquide a permis d'extraire trois fractions : fraction éther de pétrole, acétatique et fraction butanolique. Les résultats sont représentés dans le **Tableau5**.

**Tableau5.** Le rendement des extraits (EEPRM, EAERM, EBRM) de *R. Montana*

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Les extraits	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
<i>Ruta Montana</i>	640	EEPRM	15.04	02.35
		EAERM	03.55	0.55
		EBRM	25.14	03.98

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale (**Tableau4** et **Tableau5**) a montré que l'EMRM représente le rendement le plus élevé (53.43%), l'EBRM a un rendement de (03.98%) et enfin les rendements de l'EEPRM (2.35%) et de l'EAERM (0.55%) sont les plus faibles.

Selon Newman et Markham [40] les flavonoïdes que pourraient contenir les différentes fractions issue de l'extrait méthanolique seraient comme suit: l'extrait éther de pétrole qui est

en générale constitué de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, l'extrait d'acétate d'éthyle contient les flavonoïdes aglycones et flavonoïdes glycosylés en particulier monoglycosylés et l'extrait butanolique est plus riche en flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tétra-glycosylés).

c. L'extraction des flavonoïdes totaux de *R.Montana* a été effectuée par le solvant organiques butanolique à partir d'extrait méthanolique. La partition liquide-liquide a permis d'extraire une fraction butanolique représente les flavonoïdes totaux *R.Montana*. Les résultats sont représentés dans le **Tableau6**.

**Tableau6.** Le rendement d'extrait méthanolique et des flavonoïdes totaux de *R.Montana*

La plante	Le poids du matériel végétal en (g)	Les extraits	Le poids des extraits en (g)	Le rendement en (%)
<i>Ruta Montana</i>	200	EMRM	74	43.71
		EFTRM	16	8

Le calcul de rendements de l'extrait flavonoïde totaux par rapport au poids sec de la poudre végétale (**Tableau6**) a montré que l'EMRM représente le rendement le plus élevé **34%** et la fraction des flavonoïdes totaux représente le rendement le plus faible **8%**.

## II. Tests de mise en évidence de certains composés Phytochimiques

Les tests phytochimiques réalisés sur ETARM révèlent la présence de plusieurs familles de composés dont les résultats sont présentés dans le **Tableau7**.

**Tableau7.** Analyse phytochimique préliminaire d'extrait méthanolique de *R. Montana*.

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

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

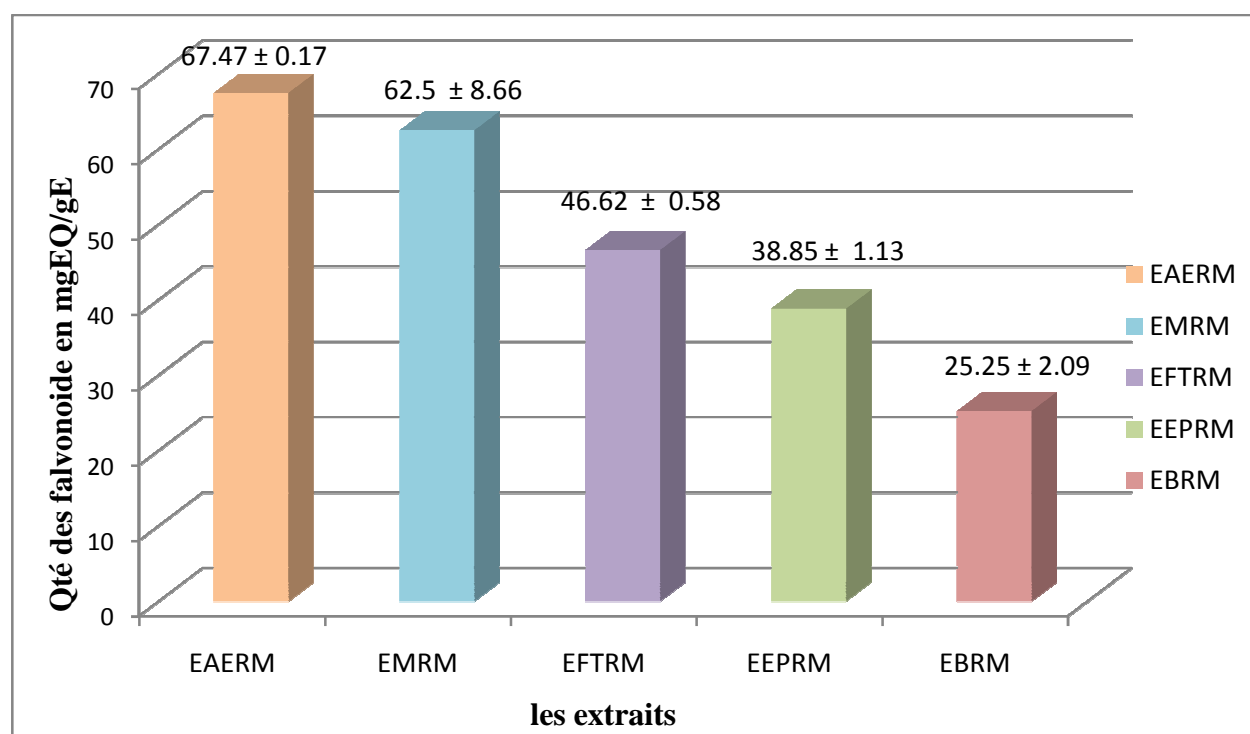
L'étude phytochimique d'EMRM a montré que cette plante contient: des flavonoïdes, des saponosides, des tanins, des coumarines, des composés réducteurs, et des alcaloïdes sels. Ce qui confirme les travaux de Belkassam [122] qui a été révélé la présence de Flavonoïdes, Saponosides, Tanins et Coumarines chez *R.Montana*. La richesse de ces extraits en composés chimiques actifs pourrait expliquer son utilisation traditionnelle pour soigner de nombreuses maladies telles que: la Fièvre, contre les vers intestinaux, Antispasmodique... [114, 127, 128, 122].

### III. Etude quantitative

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des gaines *R.Montana*, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydants des plantes leur sont attribués.

#### III.1. Dosages des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium [93]; en utilisant comme standard la quercétine. Les résultats sont représentés dans la **Figure 28** et dans la gamme d'étalonnage de la quercétine (**Figure19**).



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

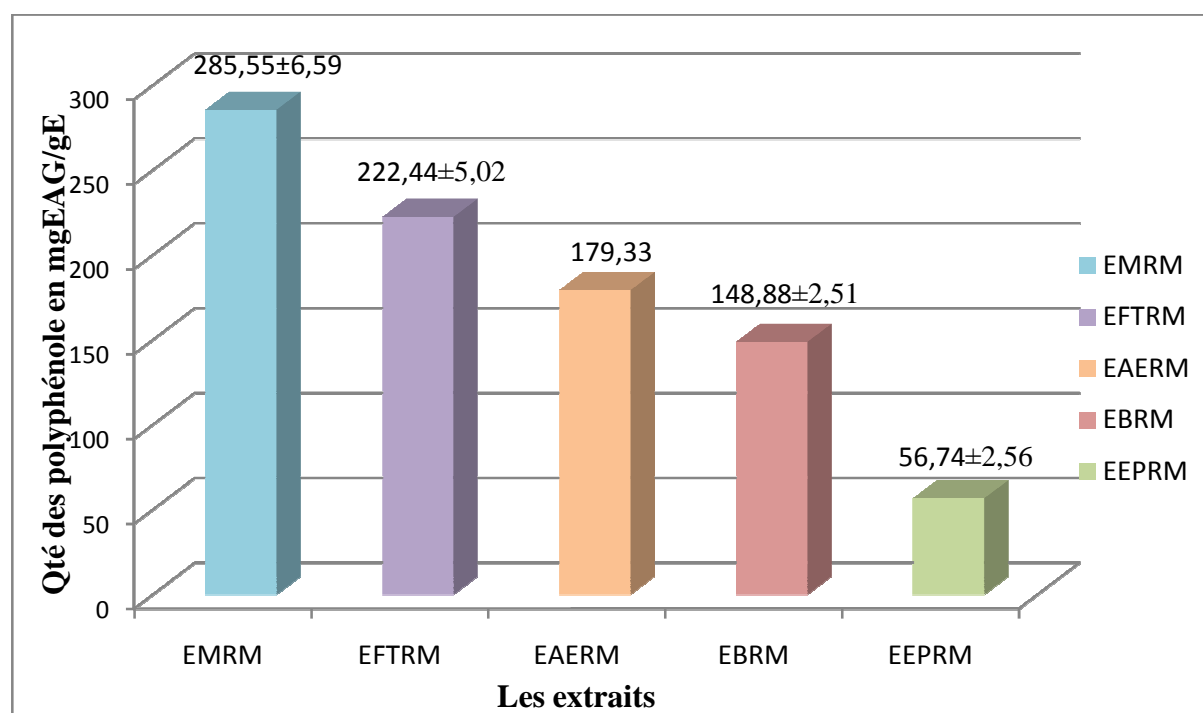
**Figure 25.** Teneur en flavonoïdes totaux (mgEQ/gE)

La détermination quantitative des flavonoïdes par la méthode du trichlorure d'aluminium révèle que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait méthanolique sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de ( $67.47 \pm 0.17$  mg EQ/g d'extrait) et ( $62.5 \pm 8.66$  mg EQ/g d'extrait) respectivement, Par la suite vient l'extrait des flavonoïdes totaux ( $46.62 \pm 0.58$  mg EQ/g d'extrait) suivi par l'extrait éther de pétrole ( $38.85 \pm 1.13$  mg EQ/g d'extrait).

Cependant seulement ( $25.25 \pm 2.09$  mg EQ/g d'extrait) sont trouvés dans l'extrait butnaolique.

### III.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux des extraits de *R.Montana* ont été effectué selon la méthode de bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifiée par Graham (1992). Les résultats sont représentés dans la **Figure 30** et dans la gamme d'étalonnage d'acide gallique (**Figure20**).



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

**Figure26.** Teneur en polyphénols totaux (mg EAG/g E)

Les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait brut méthanolique contient ( $285.55 \pm 6.59$  mg EAG/g d'extrait), c'est la fraction phénolique la mieux représentée. Cependant, la fraction phénolique dans l'extrait des flavonoïdes totaux constitue ( $222.44 \pm 5.02$  mg EAG /g d'extrait) suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle ( $179.33$  mg EAG /g d'extrait), l'extrait butanolique renferme ( $148.88 \pm 2.51$  mg EAG /g d'extrait), alors que l'extrait éther de pétrole ne contient que ( $56.74 \pm 2.56$  mg EAG /g d'extrait).

## IV. Etude qualitative

### IV.1. Résultat de la Chromatographie sur Couche Mince

Le développement de la méthode pour la Chromatographie sur Couche Mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, dimension de la chambre de développement et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation [129]. La CCM nous a permis d'avoir les empreintes flavoniques dans différentes phases de la plante *R. Montana*, l'identification des composés était basée sur la comparaison des Rf's et couleurs observés sous lampe UV des taches apparues sur CCM.

Les tableaux 8-9-10-11 comportent les Rf's des différents spots apparus et les types de flavonoïde, ainsi que la couleur révélée sous une lampe UV.

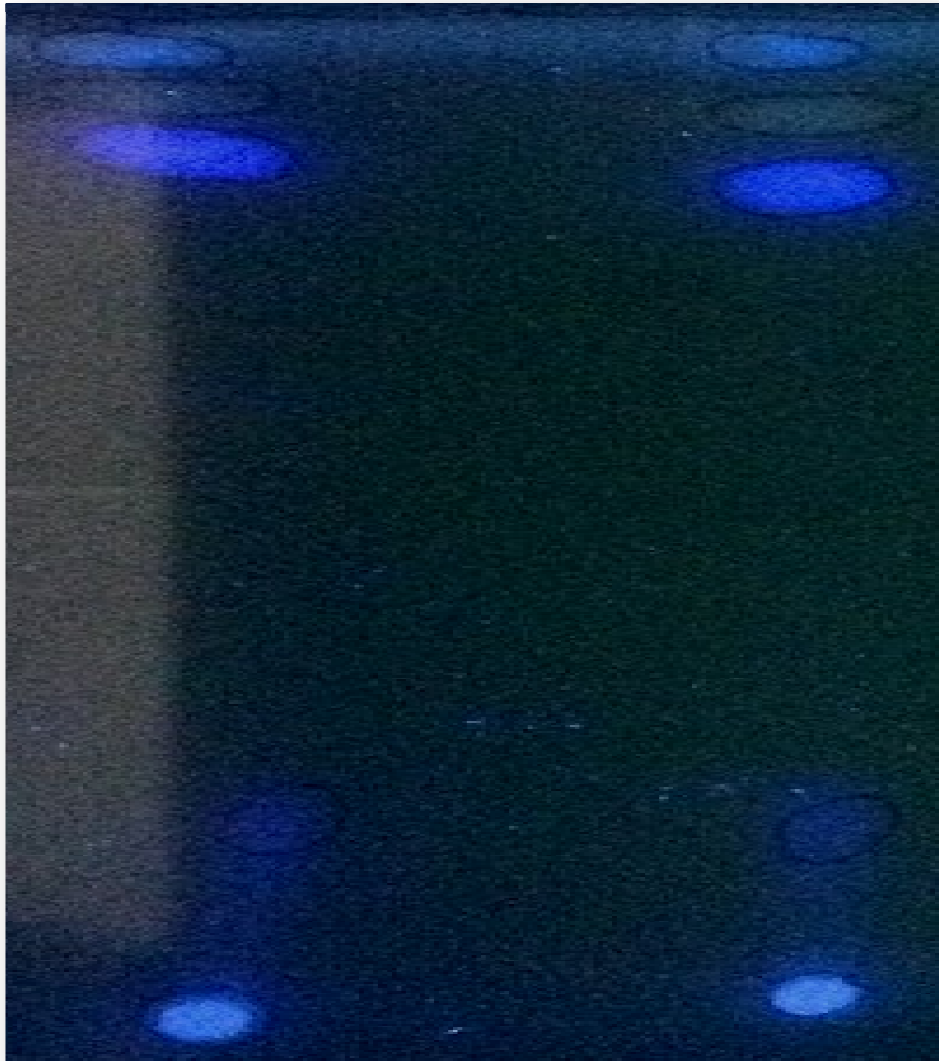
#### IV.1.1. Composés identifiés dans l'extrait éther de pétrole

Quatre spots ont été ségrégués des dépôts de la fraction éther de pétrole par le système de solvant utilisé (Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartient probablement surtout aux classes des Flavonols et flavones.

Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8** et la **Figure 29**.

**Tableau 8.** Résultat de la CCM de la fraction **éther de pétrole**. **Système solvant** : Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80. **Adsorbant** : gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Les Rf's (cm)	Les Types des flavonoïdes possibles
<b>Bleu blanc fluorescent</b>	<b>0.17</b>	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
<b>violet</b>	<b>0.77</b>	flavones
<b>jaune</b>	<b>0.89</b>	Flavonols
<b>Bleu</b>	<b>0.96</b>	Flavoneméthylée ou hydroxyflavonol



**Figure27. Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait ether de pétrole de R.montana par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80 (révélation à l'UV),  $\lambda=365\text{nm}$**

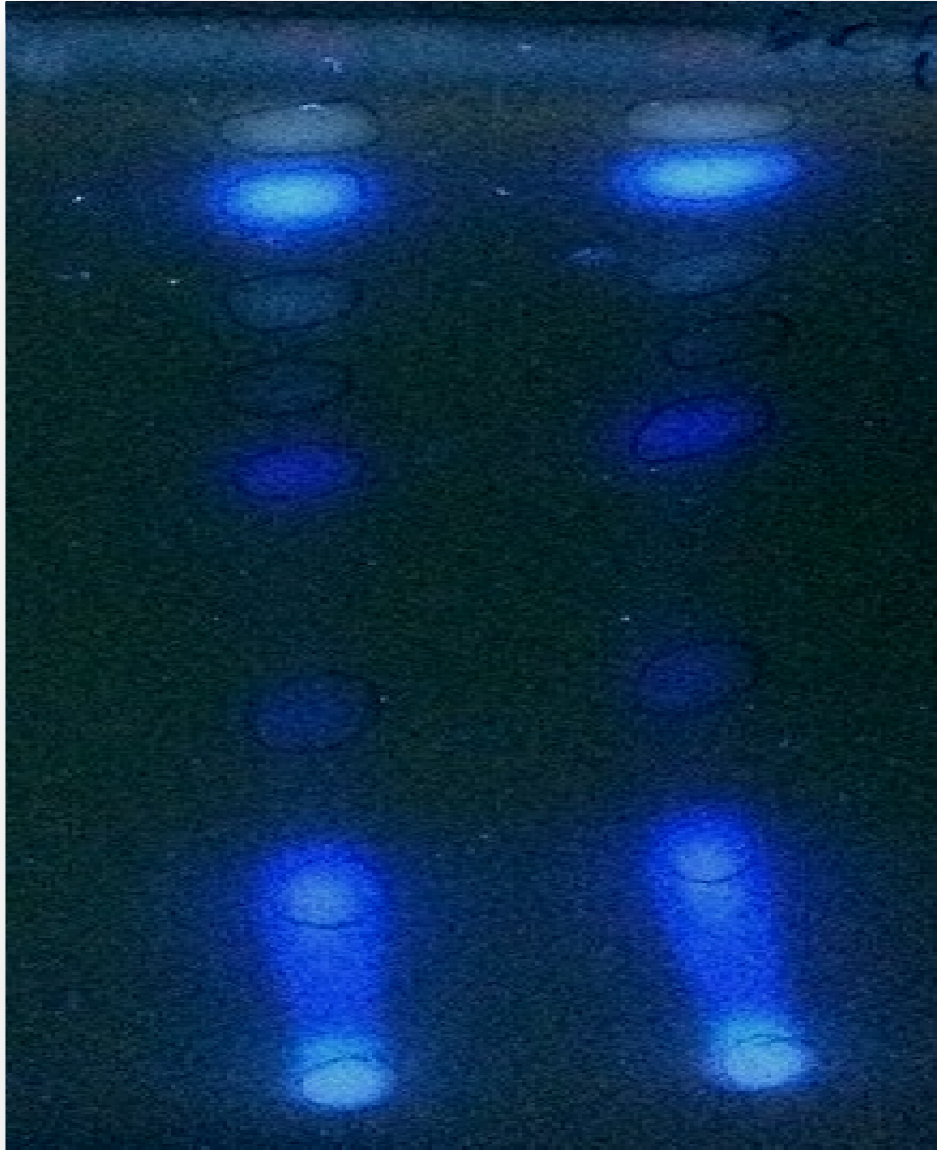
## IV.1.2. Composés identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle

Sept spots ont été ségrégués des dépôts de la fraction éther de pétrole par le système de solvant utilisé (Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des Flavonols et flavones.

Les résultats sont présentés dans le **Tableau9** et la **Figure30**.

**Tableau9.** Résultat de la CCM de la fraction acétate d'éthyle. **Système solvant** : Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80. **Adsorbant** : gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Les Rfs (cm)	Les Types des flavonoïdes possibles
Bleu blanc fluorescent	0.20	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
Mauve claire	0.37	Anthocyanidine 3- glycosides
violet	0.61	flavones
Bleu blanc fluorescent	0.69	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
Bleu blanc fluorescent	0.76	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
Bleu vif	0.85	Acide phénol
jaune	0.91	Flavonols



**Figure28. Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait acétate d'éthyle de R.montana par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Acétate d'éthyle/éther de pétrole 20/80 (révélation à l'UV),  $\lambda=365\text{nm}$**

## IV.1.3. Composés identifiés dans l'extrait butanolique

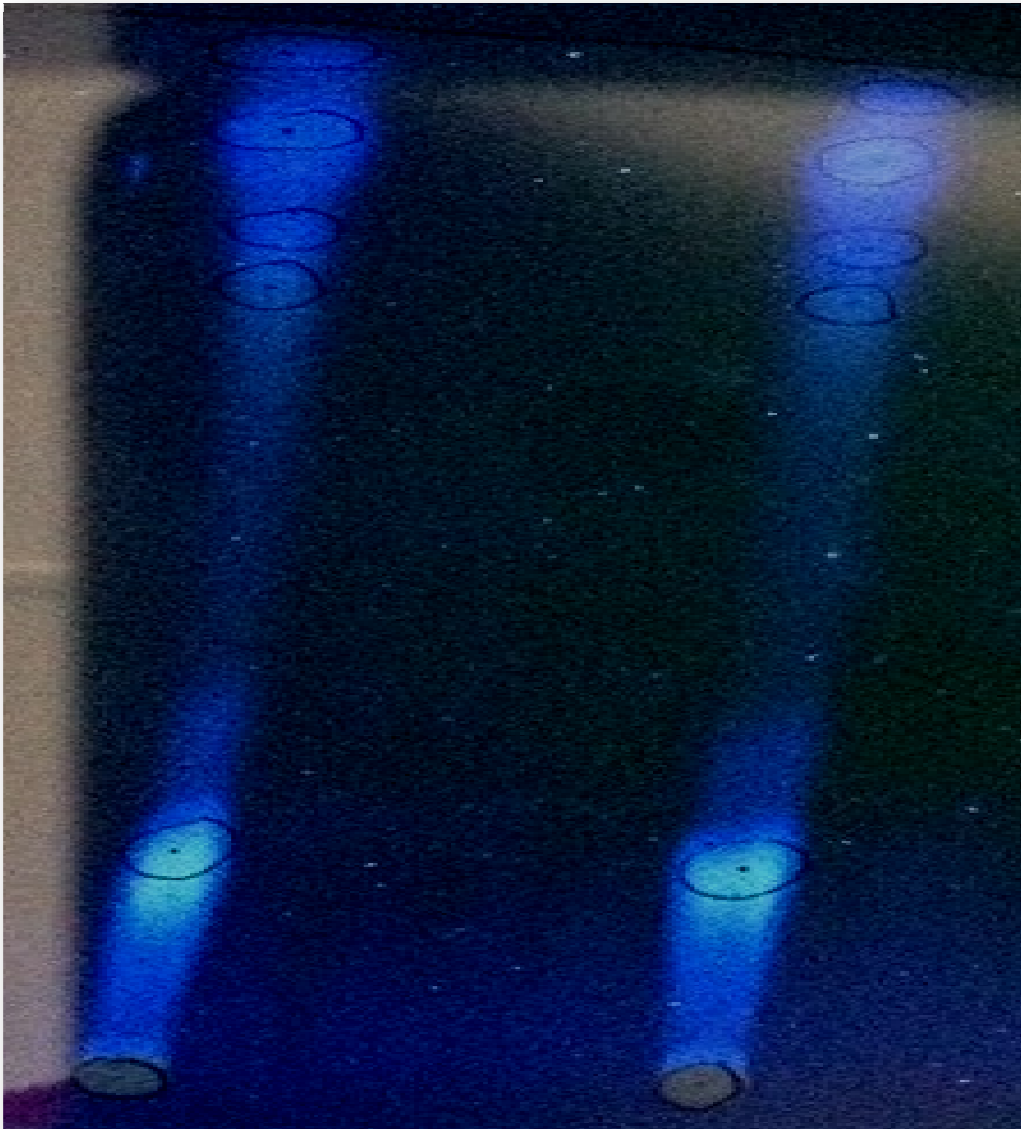
Cinq spots ont été ségrégués des dépôts de la fraction éther de pétrole par le système de solvant utilisé (Chloroforme/méthanol/H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des flavones et, flavonols, isoflavones, flavonones ou aurones et des anthocyanidines 3- glycosides.

Les résultats sont présentés dans le **Tableau10** et la **Figure31**.

**Tableau10.** Résultat de la CCM de la fraction extrait butanolique. **Système solvant :**

Chloroforme/méthanol /H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. **Adsorbant :** gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Les Rfs (cm)	Les Types des flavonoïdes possibles
<b>Bleu blanc fluorescent</b>	<b>0.21</b>	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
<b>Bleu</b>	<b>0.74</b>	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
<b>Mauve</b>	<b>0.80</b>	Anthocyanidine 3- glycosides
<b>Bleu sombre</b>	<b>0.89</b>	flavonones, aurones
<b>Bleu blanc fluorescent</b>	<b>0.96</b>	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones



**Figure29. Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait butanolique de R.montana par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Chloroforme/méthanol/ H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (révélation à l'UV),  $\lambda=365\text{nm}$**

## IV.1.4. Composés identifiés dans l'extrait flavonoïde totaux

Six spots ont été ségrégués des dépôts de la fraction éther de pétrole par le système de solvant utilisé (Chloroforme/méthanol /H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) appartenant aux différentes classes flavoniques, mais une grande partie appartiennent probablement surtout aux classes des Anthocyanidine 3-glycosides

Les résultats sont présentés dans le **Tableau11** et la **Figure32**.

**Tableau11.** Résultat de la CCM de la fraction extrait flavonoïde totaux. **Système solvant :** Chloroforme/méthanol /H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. **Adsorbant :** gel de silice

Couleur sous UV 365 (nm)	Les Rfs (cm)	Les Types des flavonoïdes possibles
Bleue blanc fluorescent	<b>0.23</b>	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
Bleue	<b>0.74</b>	Flavonols, flavones, isoflavones, flavanones
Bleu sombre	<b>0.83</b>	flavonones, auronnes
Mauve	<b>0.86</b>	Anthocyanidine 3- glycosides
Mauve foncé	<b>0.88</b>	Anthocyanidine 3- glycosides
Bleue	<b>0.93</b>	Flavoneméthylée ou hydroxyflavonol



**Figure30.Photo de chromatogramme résultant de l'analyse d'extrait flavonoïde totaux de R.montana par Chromatographie sur gel de silice par le système solvant : Chloroforme/méthanol/ H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (révélation à l'UV),  $\lambda=365\text{n}$**

### V. Détermination de l'activité anti-radicalaire des extraits *R. Montana* par la méthode de DPPH° (effet scavenger)

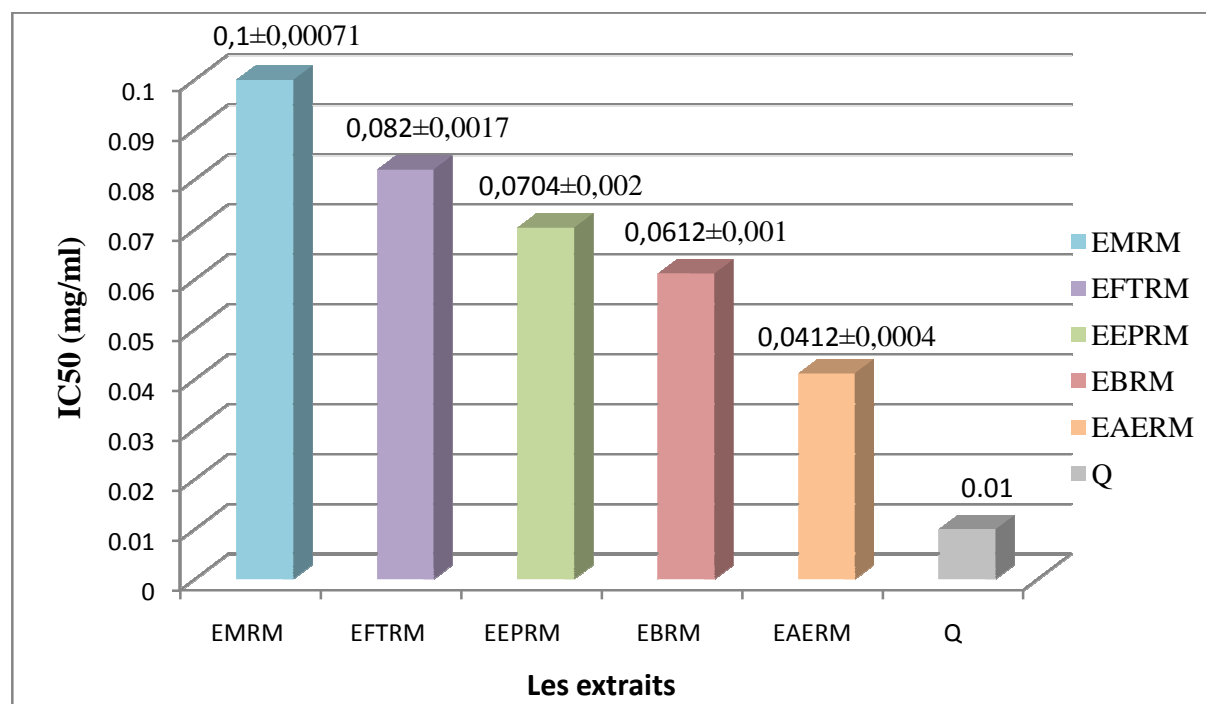
Dans le test de DPPH°, la cinétique de décoloration de ce radical a été suivie à 517 nm après addition de 15 µl de chacune des concentrations des extraits. Ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydants, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire.

Pour des fins comparatives un antioxydant standard est utilisé; la quercétine Il a montré une activité antiradicalaire très puissante avec **IC50 0.01 µg EQ/mg d'extrait**.

**Tableau12. Les pourcentages de réduction du radical DPPH°.**

Les concentrations		Les pourcentages de la réduction du radical DPPH°					
Concentrations initiales en (mg/ml)	Concentrions dans le mélange réactionnel en (mg/ml)	(%) de réduction de EMRM	(%) de réduction de EPRM	(%) de réduction de EAERM	(%) de réduction de EBRM	(%) de réduction de EFTRM	(%) de réduction de Q
10	0.1	47.71±0.21	65.10±2.41	92.61±0.85	75.43±1.73	60.69±0.32	-
5	0.05	32.77±1.25	41.76±3.84	78.44±1.76	45.24±0.18	30.84±0.64	95.89±0.19
3	0.03	25.51±0.07	26.32±1.75	49.05±0.78	31.46±2.77	22.09±7.29	95.75±0.05
2	0.02	23.05±1.66	14.78±2.00	38.58±1.03	26.04±1.17	14.12±3.20	95.94±0.19
1	0.01	20.92±3.44	9.95±1.52	24.03±1.28	8.64±1.33	7.61±3.36	95.94±0.05
0.5	0.005	10.83±0.17	2.20±0.85	2.73±0.66	3.12±0.49	1.60±0.84	95.96±0.22
0.250	0.00250	8.07±1.97	-	3.70±1.77	1.92±0.83	-	95.01±0.43
0.125	0.001	7.73±2.76	-	1.50±0.250	0.39±1.0	-	46.43±2.43

L'histogramme représente les concentrations des extraits de la plante *R.Montana* qui piègent 50 % du radical DPPH° (IC50) (**Figure33**). C'est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydant. Plus cette concentration est faible plus l'effet antioxydant est très élevé [130, 131,132].



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

**Figure31.** Les concentrations des extraits méthanolique de *R.Montana* inhibent 50 % du radical DPPH°.

Parmi les cinq extraits *R.Montana*, l'acétate d'éthyl représente l'extrait le plus actif avec une IC50(0.0412±0.0004mgEQ/g extrait),Une activité intermédiaire a été obtenue avec l'extrait butanolique avec une IC50 de (0.0612±0.001 mgEQ/g extrait),puis l'extrait de l'éther de pétrole avec IC50(0.0704±0.002mgEQ/g extrait) ,et l'extrait des flavonoïdes totaux avec IC50(0.082±0.0017mgEQ/g extrait),par contre l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par extrait méthnolique IC50(0.1±0.00071mgEQ/g extrait ) qui est 2 à 3 fois moins actifs par rapport a l'extrait d'acétate d'éthyle.

En comparaison avec antioxydant standard (quercitine), tous les extraits testés s'avèrent moins actifs. Ceci est probablement dû à l'absence des anthocyanes dans notre plante, qui sont dotés de puissante capacité à piéger les radicaux libres [143,144].

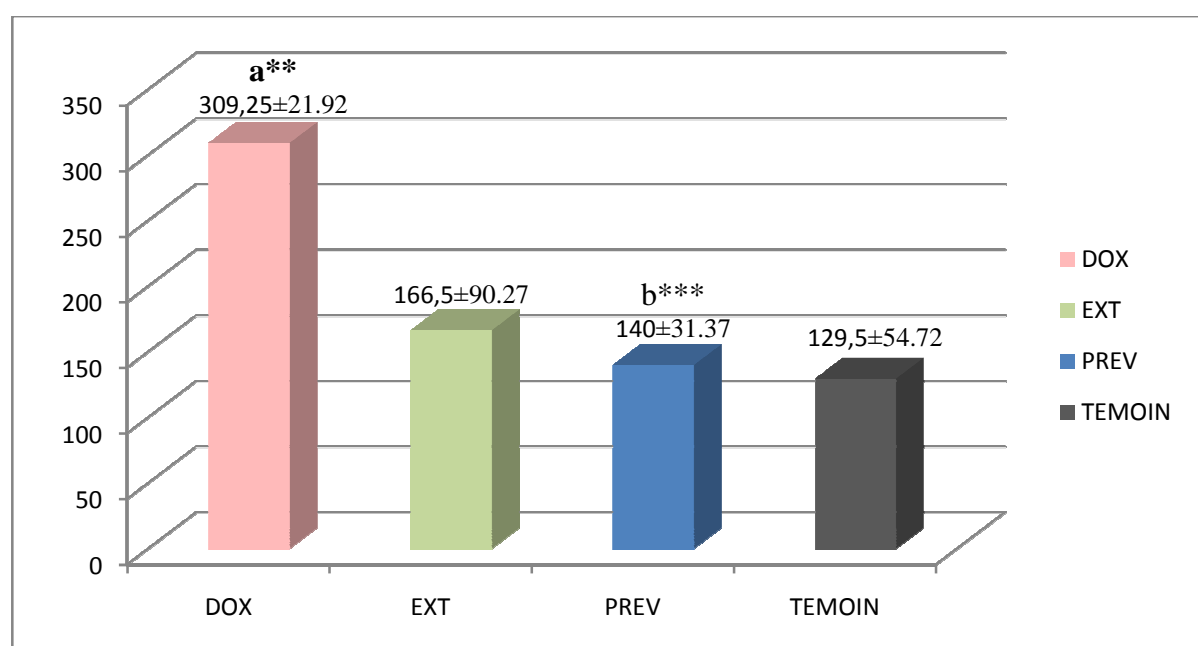
La quercétine est trois à quatre fois plus actif que l'EAERM. L'effet d'EAERM est fort probablement attribué à leur richesse en composés phénoliques et en flavonoïdes aglycone monglycosylée.

Les extraits méthanolique, butanolique, éther de pétrole et flavonoïde totaux sont huit à dix fois moins actif en comparaison avec la quercétine ce qui confirme la teneur de ces extrait avec des polyphénols et flavonoïdes di et tri glycosylée et méthylée.

L'estimation de cette activité antioxydante *in vitro*, montre que l'extrait acétate d'éthyl est le plus actif comparé aux différents extraits de *Ruta montana* ceci nous a encouragé à évaluer cet extrait *in vivo* sur un model animal.

## VI. Résultat des dosages biochimique in vivo (activité de CPK, ASAT, ALAT et LDH)

### VI.1.Evaluation de l'activité enzymatique de la LDH



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

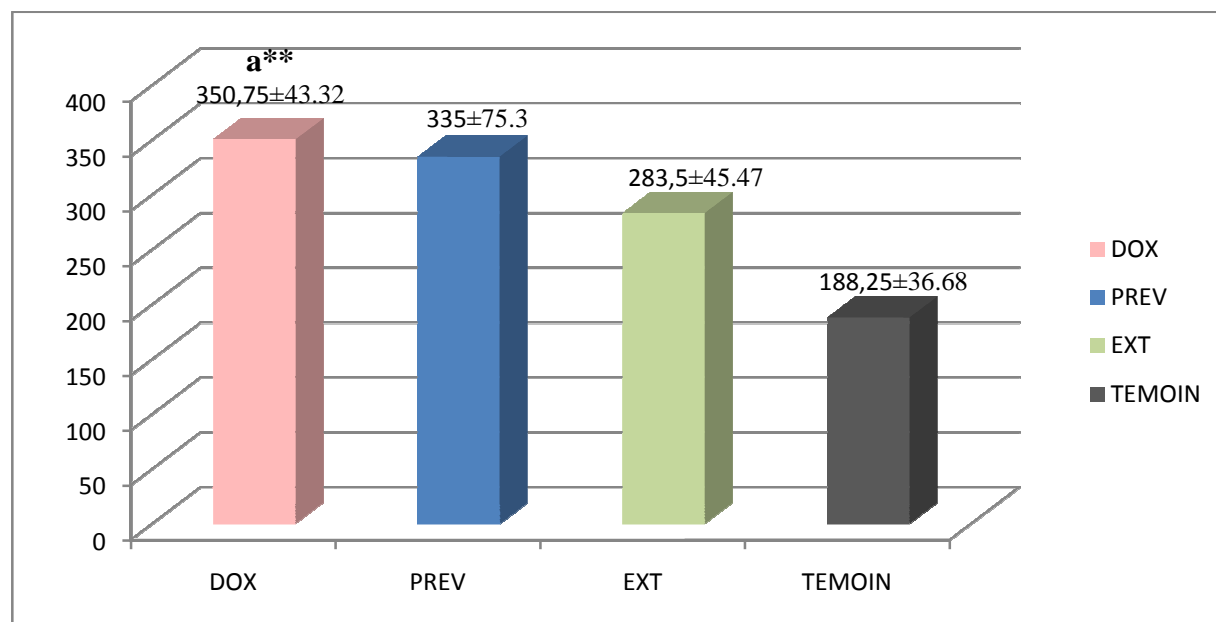
Test ANOVA : (a) Les résultats sont comparé avec ceux du lot témoin ; (b) les résultats sont comparés avec ceux du lot doxo; (\*\*\*) désigne un effet très significatif ( $p \leq 0.01$ ), (\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ).

**Figure32.** Variations des activités enzymatiques de la LDH chez les animaux traités par la doxorubicine seule (15mg/kg i.p.) ou précédée par l'administration de l'extrait acétate d'éthyle de *Ruta montana* (100mg/kg p.o endant 15 jours)

D'après la figure32, on peut remarquer que, par rapport aux animaux témoins, chez lesquels l'activité enzymatique de LDH atteint (129.5 $\pm$ 54.72 UI/l), cette activité enzymatique augmente très significativement ( $p \leq 0.01$ ) chez les animaux traités par la doxorubicine seule (309.25 $\pm$ 21.92 UI/l) Cependant on peut remarquer une diminution hautement significative

( $p \leq 0.001$ ) de l'activité enzymatique de LDH ( $140 \pm 31.37$  UI/l) chez les animaux du lot préventif comparé aux animaux doxorubicine ( $309.25 \pm 21.92$  UI/l).

### VI.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la CPK



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

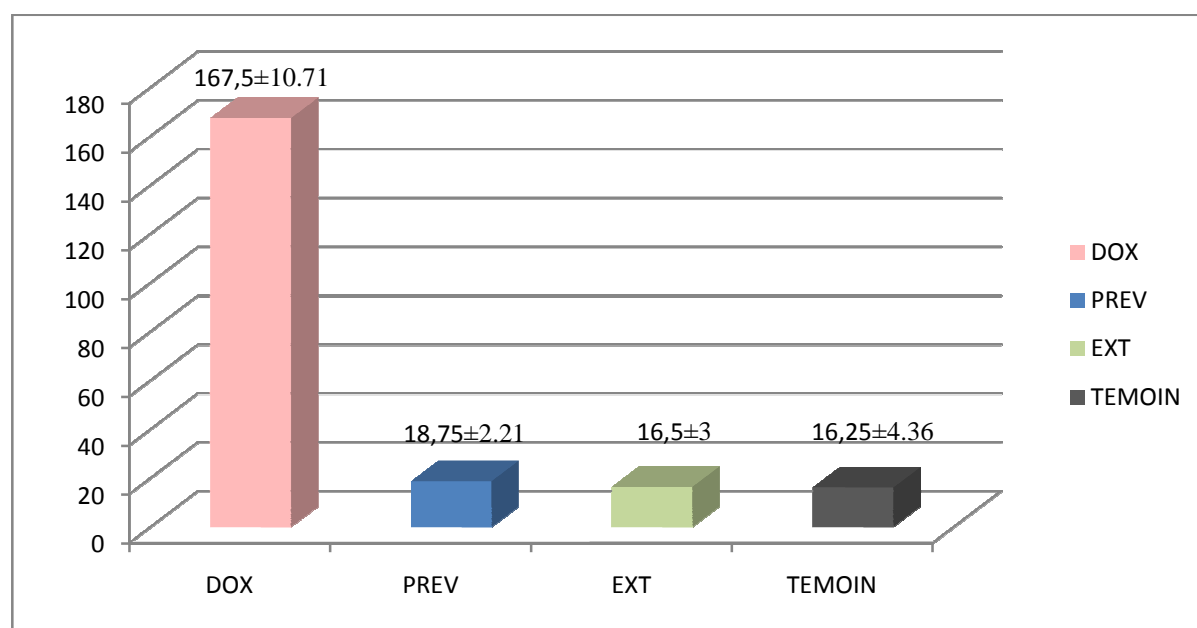
Test ANOVA : (a) Les résultats sont comparé avec ceux du lot témoin ; (b) les résultats sont comparés avec ceux du lot doxo; (\*\*\*) désigne un effet très significatif ( $p \leq 0.01$ ),

**Figure33.** Variations des activités enzymatiques de la CPK chez les animaux traités par la doxorubicine seule (15mg/kg i.p.) ou précédée par l'administration de l'extrait acétate d'éthyle de *Ruta montana* (100mg/kg p.o endant 15 jours).

Les résultats ci-dessus montrent une élévation très significative ( $p \leq 0.001$ ) de l'activité enzymatique de la CPK chez les animaux traités par la doxorubicine seule ( $350,75 \pm 43,32$  UI/L) par rapport aux animaux témoins ( $188,25 \pm 36,68$  UI/L). Toutefois, l'activité enzymatique de la CPK chez le lot extrait présentent une augmentation ( $283,5 \pm 45,47$  UI/L) comparés aux rats témoins. D'autre part, on remarque que les animaux du lot préventif présentent une augmentation de l'activité enzymatique de la CPK ( $335 \pm 75,30$  UI/L) comparés aux rats témoins mais présentent une réduction observées comparés aux rats du lot DOXO.

Malgré la réduction observée chez les rats du lot préventif par rapport à ceux traités par la doxorubicine seule, les résultats ne sont pas corrélés ( $p > 0.05$ ).

## VI.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la l'ASAT



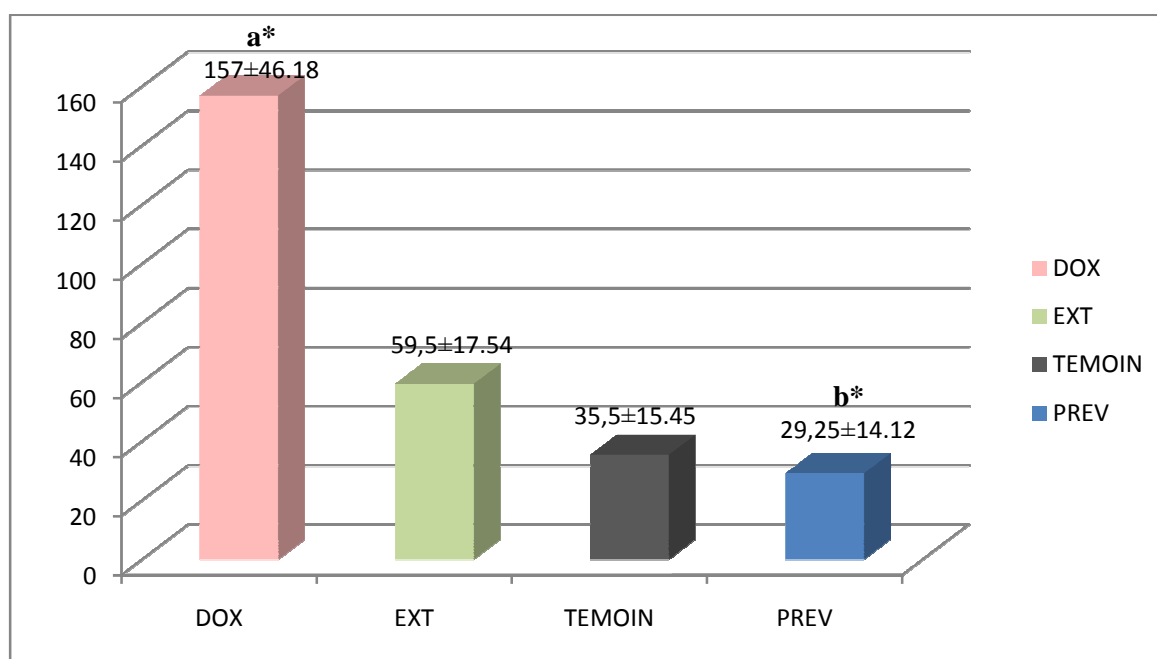
Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

Test ANOVA : (a) Les résultats sont comparé avec ceux du lot témoin ; (b) les résultats sont comparés avec ceux du lot doxo; (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p \leq 0.001$ ).

**Figure 34.** Variations des activités enzymatiques de la l'ASAT chez les animaux traités par la doxorubicine seule (15mg/kg i.p.) ou précédée par l'administration de l'extrait acétate d'éthyle de *Ruta montana* (100mg/kg p.o endant 15 jours)

Les résultats de cette figure (**Figure 34**) montrent clairement que le traitement des rats par la doxorubicine a causé une augmentation hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de l'activité de l'ASAT ( $167.75 \pm 10.71$  UI/l) par rapport aux rats témoins ( $16.25 \pm 4.34$  UI/l). On remarque aussi une diminution hautement significative ( $p \leq 0.001$ ) de cette activité chez les animaux prétraités par l'extrait acétate d'éthyle ( $18.75 \pm 2.21$  UI/l) comparés aux animaux traités par la doxorubicine seule.

## VI.4. Evaluation de l'activité enzymatique de la l'ALAT



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

Test ANOVA : (a) Les résultats sont comparé avec ceux du lot témoin ; (b) les résultats sont comparés avec ceux du lot doxo; (\*) désigne un effet significatif ( $p \leq 0.05$ ).

**Figure 35.** Variations des activités enzymatiques de la l'ALAT chez les animaux traités par la doxorubicine seule (15mg/kg i.p.) ou précédée par l'administration de l'extrait acétate d'éthyle de *Ruta montana* (100mg/kg p.o endant 15 jours)

Les résultats ci-dessus montrent une élévation significative ( $p \leq 0.05$ ) de l'activité enzymatique de l'ALAT chez les animaux traités par la doxorubicine seule ( $157 \pm 46.18$  UI/l) par rapport aux animaux témoins ( $35.5 \pm 15.45$  UI/l). D'autre part, on remarque que les animaux du lot préventif présentent une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) de l'activité de l'ALAT ( $29.25 \pm 14.12$  UI/l) comparée avec celle des animaux traités par la doxorubicine seule.

Dans le cadre de notre étude, notre choix s'est porté sur l'induction d'une toxicité cardiaque aiguë par administration de la doxorubicine à une dose unique de 15mg/kg i.p. plusieurs étude ont établi que cette dose provoque effectivement ce type de toxicité [145,146].

Au cours de certaines lésions cardiaques comme l'infarctus du myocarde, les cellules nécrosées déversent leurs contenus cytosoliques dans le courant circulaire, par conséquent, au niveau plasmatique, les activités enzymatiques de certaines enzymes (CPK, ASAT, ALAT

et LDH) augmentent. Voilà pourquoi, la mesure de ces activités enzymatiques peut être un indicateur crédible de lésions cardiaque [147,148].

Dans notre étude, les activités enzymatique de la CPK, LDH, l'ASAT et de l'ALAT, mesuré 48 heures après la fin du traitement, ont montré des augmentations chez les rats traités par la doxorubicine seule, ces résultats prouvent l'atteinte toxique des cellules cardiaque par ce médicament. En revanche, le prétraitement des rats par l'extrait acétate d'éthyle avant l'adminstration de la doxorubicine montre une diminution des trois activités enzymatiques par rapport aux rats traités par la doxorubicine seule. Ceci ne peut être expliqué que par le fait que l'extrait de la plante a assuré la protection de l'intégrité cellulaire cardiaque contre les lésions provoquées par la doxorubicine. Nos résultats corroborent parfaitement avec ceux enregistrés dans l'étude d'Abdul et coll, Praveen B et coll[149,150].

**CONCLUSION**

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La présente étude contribue à l'évaluation de l'effet préventif de l'extrait acétate d'éthyl de *Ruta montana* sur le stress oxydant induits par la doxorubicine.

L'estimation de l'activité antioxydant *in vitro*, montre que l'extrait acétate d'éthyl est le plus actif comparé aux différents extraits de *Ruta montana* ceci nous a encouragé à évaluer cet extrait *in vivo* sur un model animal (Rats Wistar albinos). Il ressort clairement de notre travail que le prétraitement des rats par l'extrait acétate d'éthyl à la dose 100mg/kg pendant 15 jours montre une diminution des activités enzymatiques par rapport aux rats traités par la doxorubicine seule à la dose 15mg/kg, et a empêché ainsi le stress oxydant de se produire au niveau cardiaque, il améliore plutôt l'équilibre de la balance antioxydant-prooxydant.

On peut dire que l'extrait acétate d'éthyl de *Ruta montana* a prouvé son effet préventif sur la cardiotoxicité générée du traitement par la doxorubicine et nous donne un grand espoir d'une action préventive chez l'homme dans le domaine de la chimiothérapeutique.

Ceci montre que la flore Algérienne peut constituer une réserve importante d'espèces végétales intéressantes, dont les principes actifs peuvent être employés dans plusieurs domaines tels que les industries pharmaceutiques et agroalimentaires.

Cette étude reste préliminaire et plus superficielle, donc, elle nécessite d'autres études approfondies pour mieux se concentrer sur les effets révélés. Même des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour déterminer, d'une part les composés du *R.montana* qui peuvent être responsables de tels effets et d'autre part, le mécanisme absolu par lequel ces composés accomplissent leurs rôles.

# LES RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Kasmi N ; Saadaoui S ; 2014.** étude phytochimique et évaluation de l'activité anti oxydante et anti inflammatoire d'extrait méthanolique de deux plantes médicinales *Rutamontana(Clus.L).*et *Thymus algériensisBoiss.* Mémoire de master en Biochimie appliqué, Université Abbès Laghroue Khenchela, 3-.
2. **Durande, 1782,** Notions Elémentaires de Botanique, 284.
3. **Nadia Z ; 2009.** Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne, Mmoire de magister (Ecole doctorale) de Biotechnologie végétale. Université Mentouri Constantine, 17-32.
4. **Alin H ; Bekro Y A ; Olivier N ; et al ; 2011.**Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en cote d'Ivoire.6, 55.61.
5. **Belfadel A ; 2013.** Etude phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de la partie aérienne de la plante médicinale (*Ruta montana*).Mémoire de master en microbiologie, Université Abbès laghroue Khenchela, 1-4.
6. **Bruneton J.** *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>e</sup> éd., revue et augmentée,* Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 2009, 1288 p.
7. **Tirichine H ; 2010.** Etude ethnobotanique, activité antioxydant et analyse phytochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) du Sud-Est algérien. Mémoire de master en Ecophysiologie végétale, Université d'Oran, p : 14.
8. **Larsson S, 2007.** The new chemosystematics : Phylogeny and phytochemistry, 68,2903-2907.
9. **Tirichine H ; 2010.** Etude ethnobotanique, activité antioxydant et analyse phytochimique de quelques cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*) du Sud-Est algérien. Mémoire de master en Ecophysiologie végétale, Université d'Oran, p : 14.
10. **Bruneton J ; 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème edition. Ed.
11. **Nait achour K ; 2012.** Etude de la composition chimique des essences de Quatre espèces d'eucalyptus poussant dans la region de Tizi Ouzou. Mmoire de magister en chimie appliquée, Université MOULOUD MAMERI- Tizi Ouzou, p : 16.
12. **Osborn A.E. et Lanzotti V; 2009.** Plant- derived Natural Products: Synthesis, Function and Application; Ed: SPRINGER; p: 3- 44

13. **Attou A ; 2010.** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire de Magister en Activités biologiques et synthèses, UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEEN, p : 9.
14. **Stanley et al ; 2003.** *Antioxidants and the Free Radical Theory of Degenerative Disease*, Alternative Medicine and Rehabilitation.
15. **Chen D et al ; 2004.** *Green tea and tea polyphenols in cancer prevention*, Front Biosci, vol. 9, n° 2618.
16. **Daayf F. et Lattanzid V; 2008.** Recent Advances in Poly phenol Research 1; Ed: WILEY-BLACKWELL; p:1- 24.
17. **Walton N.J. et Brown D.E; 1999.** Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products; Ed: WORLD SCIENTIFIC; p: 1-14.
18. **Bruneton J ; 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème ed. Ed. Tec et Doc, 1120 p.
19. **Martin S, Andriantsitohaina R ; 2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. Annales de cardiologie et d'angéiologie. **51**: 304-315
20. **Milane H ; 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg
21. **Athamena S ; 2009.** Etude quantitative des flavonoides des graines de *cuminum cyminum* et les feuilles de *Rosmarinus officinalis* et lievaluation, Mimeoire de magister en biochimie appliques. Université Hadj Lakhder- Batna, 17-39.
22. **Wilson A ; 1987.** Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. J. Chem. Ecol. 1987, 13 (3): 473-493.
23. **Dacosta E ; 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (Ed). Paris, 317p.
24. **Bruneton J ; 2009.** *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>e</sup> éd., revue et augmentée*, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, 1288 p.
25. **Seghiri R ; 2008.** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*, THESE Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat d'Etat En Chimie Organique - Option Phytochimie. Université Mentouri – Constantine, p : 53.

26. **Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O., Regerat F., 1996.** Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Méd. Nut.* 32 (1) :17-27.
27. **Kebieche M ; 2009.** Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens L* : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine, Thèse de Doctorat en biochimie. Université Mentouri Constantine ; p 25.
28. **Manach C., Morand C., Texier O., Favier M. L., Agullo G., Regerat F., Remesy C ; 1995.** Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr*, 125: 1911-1922.
29. **Elicoh-Middleton Jr. Chithan K., Theoharis C., 2000 ;** Effect of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52): 673-751.
30. **Rechner A. R., Spencer J. P. E., Kuhine G., Rice-Evans C ; 2000.** Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid and derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med*, 30: 1213-1222.
31. **Bruneton, J ; 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Edition. Tec & Doc (Ed). Paris, 575p.
32. **Burda S, Oleszek W ; 2001.** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids *J. Agric Food Chem* 49: 2774-9
33. **Catapano AL ; 1997.** Antioxidant effect of flavonoids. *Angiology* 48: 39-44
34. **Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S ; 1994.** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16: 845-50
35. **Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, et al ; 2001.** Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nut* 74 (4): 418-25
36. **Rice-Evans CA, Miller NJ ; 1996.** Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24: 790-5
37. **TabarT J ; 2011.** Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire et Etude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium, l'obtention du grade de Docteur en Sciences (Biochimie, Biochimie moléculaire et cellulaire, Bioinformatique et modélisation). Académie Universitaire Wallonie-Europe ; p 29.
38. **Pietta PG ; 2000.** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63 (7), 1035-42.

39. Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M ; 2009. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* 80 (11): 1799-808.
40. Markham K. R; 1982. Techniques of flavonoids identification, Academic press, London. Chap. 1 and 2: 1-113.
41. Halliwell B ; 2013. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol.* 75(3):637-44.
42. Blandine G ; 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GliSODin, Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire. Université Joseph fourier- grenoble1.Sciences-Technologie-Sante, 08-26.
43. Lavoie ME ; 2012. Inflammation, stress oxydant, profil métabolique : influence des apports alimentaires et de la dépense énergétique, Thèse présentée à la Faculté de Médecine. Université de Montréal, 21-32.
44. Jamal B ; 2010. Etude d'effets des statines sur la fonction mitochondriales muscles cardiaque et squelettiques, Ecole doctorat sciences de la vie et de la santé. Université Strasbourg, 45-53.
45. Méd Dany M-U; 2010. Le Stress Oxydatif, Unilabs, 03-53.
46. Carine Daum-B; 2006. Les lésions des acides nucléiques : détection par CLHP-SM/SM dans les milieux biologiques humains et intérêt comme biomarqueurs du stress oxydant et de l'inflammation, Université Joseph Fourier-Grenoble, 13-53.
47. Favier A ; 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique.* 108-13.
48. Winterbourn CC and Kettle AJ ; 2013. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal.* 18(6):642-60.
49. Dröge W ; 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews.* 82(1): 47-95.
50. Chen SX and Schopfer P ; 1999. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem.* 260(3):726-35.
51. Howes RM ; 2006. The free radical fantasy: a panoply of paradoxes. *Ann NY Acad Sci.* 1067: 22-6.

52. **Humblet M-F; Godeau J-M; 2005.** L'haptoglobine, marqueur protéique de l'inflammation aiguë, dans l'espèce bovine, Ann. Méd. Vét., 2005, 149, 20-33.
53. **Hamanaka RB and Chandel NS ; 2010.** Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. Trends Biochem Sci. 35(9):505-13.
54. **Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Pénicaud L and Casteilla L ; 2006.** Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie Médecine Sciences 22:47-53.
55. **Adly A ; 2010.** Oxidative Stress and Disease: An Updated Review. Research Journal of Immunology. 3:129-145.
56. **Hadi M ; 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Thèse de doctorat en Sciences de Pharmaco-chimie. Université Louis Pasteur strasbourg1, 13-36.
57. **Deshmukh L, Rode S, Wagh P, Thakur P and Bandawane D ; 2013.** Oxidative stress and antioxidants in focus: a review. Inventi Impact: Molecular Pharmacology.
58. **Therond P ; 2006.** Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). Ann Pharm Fr. 64(6):383-9.
59. **Nathalie C ; 2014.** Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique, Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé et Université LIBANAISE ; 18 p.
60. **Pham-Huy LA, He H, and Pham-Huy C ; 2008.** Free radicals, antioxidants, in disease and health. Int J Biomed Sci. 4(2):89-96.
61. **Hamadi N ; 2010.** Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine, Thèse en vue de l'obtention du diplôme de magistère en biologie cellulaire et moléculaire. Université Mentouri Constantine, 10-20.
62. **Lindau-Sehpard B, Shaffer J ; 1993.** Expression of human catalase in acatalasemic murine SVB2 cells confers protection from oxidative damage. Free Rad Biol Med, 15 : 581 - 8.
63. **Ferradji A; 2011.** Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies *Pistacia lentiscus*. Mémoire de magister. universite ferhat abbas –setif
64. **Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot ; 2005.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris, 1 - 405.

65. **Fiedor J and Burda K ; 2014.** Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 27;6(2):466-88.
66. **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.
67. **OMS ; 2013.** Organisation mondiale de la santé. [www.who.int](http://www.who.int)
68. **Diamandopoulos GT ; 1996.** Cancer: an historical perspective. Harvard Medical School, USA. *Anticancer Res*. 16:1595-602.
69. **Sudhakar A ; 2009.** History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*. 1(2):1-4.
70. **Weinberger V, Minář L and Brančíková D. Ceska Gynekol ; 2012.** Modern surgical and biological therapy of breast cancer. 77(6):513-20
71. **.Lancet ; 2000.** Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group*. 355(9217):1757-70.
72. **Murphy J, Sacchini V and Minerva C ; 2013.** New innovative techniques in radiotherapy for breast cancer. 68(2):139-54.
73. **Pouillart P ; 1998.** Chemotherapy and hormonotherapy of breast cancers. *Médecine oncologique Institut Curie, Paris. Rev Prat*. 48(1):60-6.
74. **Padilha M, Henriques M, Guardado MJ, Miranda C, Melo G and Alves P ; 2013.** Neoadjuvant radiotherapy and hormonotherapy in locally advanced breast cancer: state of the art. 25(6):422-6.
75. **Cvitkovic-Bertheault F and Rouessé J ; 1999.** Forty years of progress in chemotherapy. *Soins*. 635:16-20.
76. **Teuffel O, Leibundgut K, Lehrnbecher T, Alonzo TA, Beyene J and Sung L ; 2013.** Anthracyclines during induction therapy in acute myeloid leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol*. 161(2):192-203.
77. **Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R, Gansler T, Holland J and Frei E ; 2003.** *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th edition American Cancer Society, BC Decker, Hamilton.
78. **Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L ; 2004.** Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 56:185-229.

- 79. Tacar O, Sriamornsak P and Dass CR ; 2013.** Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol.* 65(2):157-70.
- 80. Hortobàgyi G ; 1997.** Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs.* 54(4):1-7.
- 81. Szulawska A and Czyz M.** Molecular mechanisms of anthracyclines action. *Postepy Hig Med Dosw.* 60:78-100. 2006.
- 82. Isaacs RJ, Davies S1, Wells NJ and Harris A ; 1995.** Topoisomerase II  $\alpha$  and  $\beta$  as therapy targets in breast cancer. *Anti-Cancer Drugs.* 6:195-211.
- 83. Lubgan D, Marczak A, Walczak M, Distel L and Józwiak Z ; 2006.** Pharmacological mechanisms of Doxorubicin activity (DOX) - current state of knowledge. *Przegl Lek.* 63(9):782-8.
- 84. Ferte J ; 2000.** Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem.* 267:277-94.
- 85. Gallois L, Fiallo M, Laigle A, Priebe W and Gamier-Suillerot A ; 1996.** The overall partitioning of anthracyclines into phosphatidyl-containing mode membranes depends neither on the drug charge nor the presence of the anionic phospholipids. *Eur J Biochem.* 241:879-87.
- 86. Hande KR ; 1998.** Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400:173-184.
- 87. Campos FC, Panis C, de Rossi T, Victorino VJ, Cecchini A and Cecchini R ; 2012.** Aspects related to oxidative stress-mediated toxicity of doxorubicin during chemotherapy treatment. *Applied Cancer Research.* 32(1).
- 88. Lal S, Mahajan A, Ning Chen W and Chowbay B ; 2010.** Pharmacogenetics of Target Genes Across Doxorubicin Disposition Pathway: A review. Bentham Science Publishers Ltd. *Current Drug Metabolism.* 11(1):115-128.
- 89. Hortobàgyi GN ; 1997.** Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs.* 54(4):1-7.
- 90. Tannock I, Hill R, Bristow R and Harrington L ; 2004.** The basic science of oncology, 4 ed. New York: McGraw-Hill Health Professions Division.
- 91. Edeaga H-O; Okwu D-E; Mbaebie B-O; 2005.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African journal of biotechnology.* 4 (7):685-688.

92. **Benmahdi A ; 2001.** Identification des Principes actifs des extraits des plantes médicinales. *Phytochimie* 6: 11-27.
93. **Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C. and Pinkas, M ; 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*, 46(11): 1086-1089.
94. **Daloz F, Maingon P, Cottin Y, Briot F, Horiot JC and Rochette L ; 1999.** Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat. *Free Radic Biol Med.* 26:785-800.
95. **Floyd J, Nguyen D, Lobins R, Bashir Q, Doll D and Perry MC ; 2005.** Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol.* 23:7685.
96. **Zucchi R, Danesi R ; 2003.** Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents.* 3:151-71.
97. **Olson RD and Mushlin PS ; 1990.**Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J.* 4:3076–86.
98. **Cummings J, Willmott N and Smyth J ; 1991.** The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer.* 27:532-5.
99. **Minotti G, Cairo G and Monti E ; 1999.** Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J.* 13:199-212.
100. **Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA and Kalyanaraman B ; 1997.** Endothelial nitric oxide synthase dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry.* 36:11293-7.
101. **Beckman J, Beckman T, Chen J, Marshall P and Freeman B ; 1990.** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxyde. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 87:1620-4.
102. **Hsiu-Chuan Y, Oberley TD, Vichitbandha S, Ye-Shih HO and StClair DK ; 1996.** The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest.* 98:1253-1260.
103. **Wojtacki J, Lewicka-Nowak E and Lesniewski-Kmak K ; 2000.** Anthracycline induced cardiotoxicity: clinical course, risks factors, pathogenesis, detection and prevention: review of the literature. *Med Sci Monit.* 6:411-20.
104. **Monsuez JJ, Charniot JC, Vignat N and Artigou JY ; 2010.** Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *Int J Cardiol.* 144:3-15.

105. **Zhang S, Liu X and Bawa-Khalfe T2012.** Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 18:1639.
106. Anversa P, Kajstura J and Olivetti G ; 1996. Myocytes death in heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 11(3):245-51.
107. **Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T and Leeuwenburgh C; 2002.**Doxorubicin treatment in vivo causes cytochromes C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio. *Cancer Res.* 62:4592-8.
108. **Molyneux P; 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26, 211-219.
109. **Collins L, Zhu T, Guo J, Xiao ZJ and Chen CY; 2006.** Phellinus linteus sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *British Journal of Cancer.* 95:282-288.
110. **Billingham ME, Masson JW, Bristow MR and Daniels JR ; 1978.** Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep.* 62:865-972.
111. **Lefrak E, Pit'ha J, Rosenheim S and Gottlieb J. A ; 2006.** clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *32(2):302-314.*
112. **HAS (Haute Autorité de Santé) / Service évaluation des actes professionnels ; 2010.** Marqueurs cardiaques, p : 5.
113. **Réalisé en collaboration avec des professionnels de la santé et de la médecine, sous la direction du Docteur Pierrick HORDÉ ; 2014.** Sante-Medecine ([santemedecine.commentcamarche.net](http://santemedecine.commentcamarche.net)). Transaminases - SGOT, SGPT, p : 1.
114. **Benkiki N ; 2006.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Ruta montana*, *Matricaria pubescens* et *Hypericum perforatum*, thèse de doctorat d'état en chimie, université El-Hadj Lakhdar Batna, 12-75.
115. **Alain F ; 2003.** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, mécanisme biochimique. 108-115.
116. **Servais S ; 2004.** Altération mitochondriales et stras oxydant pulmonaires en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3, L'université Claude Bernard-Lyon, 19-30.

117. **Jayaprakasam R; Ravi T K; 2012.** Evaluation of anti arthritic activity of the root extract of *acalypha indica* linn. using in vitro techniques. 2012. International Journal of Phytopharmacy 2 (6): 169-173).
118. **Quezel p ; Santa S ; 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome II, Ed. CNRS, Paris, 590-593.
119. **Francis C; Devergnas A; 2012.** Identifier les fleurs du Maroc Atlantique par leurs couleur,fiches botaniques des fleurs. Professeur agrégé de biologie aux lycées Lyautey de Casablanca PP 1-185.
120. **Quezel p ; Santa S ; 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome II, Ed. CNRS, Paris, 590-593.
121. **Collin F ; 2007.** Identifier les fleurs du Maroc Atlantique par leurs couleurs, 59
122. **Belkassam A; Zellagui A; Gherraf N; Lahouel M; Rhouati S; 2011.** Essential oil composition of Algerian *Ruta montana* (Clus.) L. And it's antibacterial effects on microorganisms respon sible for respiratory infections. Advances in Natural and Applied Sciences, 5(3): 264-268.
123. **Djarri L; Ferhat M; Merabet G; Chelghoum A; Laggoune S; Semra Z; Smati F; Kabouche Z; 2013.** Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ruta montana*, Scholars Research Library Der Pharmacia Lettre, Constantine. Algeria. 5 (4).70-73.
124. **Bast A.,Haenen Guido R. M. M., Bruynzeel Anna M. E., Van der Vijgh Wim J.F ; 2007.** Protection by flavonoids against anthracycline cardiotoxicity : from chemistry to clinical trials. *Cardiovasc Toxicol*, 7: 154-159.
125. **Kaiserová H, Simunek T, Van der Vijgh Wim J.F, Bast A, Kvasnickova E ; 2007.** Flavonoids As protectors against doxorubicin cardiotoxicity : role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772 : 1065-1074.
126. **Brchm M, Schiller E, Zeller W.J ; 1995.** Comparative antitumor activity of doxorubicin plus two radical scavenging plant extract preparations (*Ginkgo biloba*, *Crataegus oxyacantha*) and of doxorubicine alone. *Conbrib Oncol*, 48 : 48-52.
127. **Kambouche N; Merah B; Bellahouel S; Bouayed J; Dicko A; Derdour A; Younos C; Soulimani R; 2008.** Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food*, 11(3) : 593-595.

- 128. Claisse R; 1993.** Plante à usage dermatologique de la pharmacopée traditionnelle marocaine. Médicaments et aliments : l'approche ethnopharmacologique, 24(27) : 172-173.
- 129. Yrjonen T; 2004.** Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products. Conference room 513 at viikki info center. Faculty of pharmacy of the university Helsinki, 64.
- 130. Brand-Williams W; Cuvelier M.E; Berset C; 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 28, 25-30.
- 131. Tsimogiannis D.I; Oreopoulou V; 2004.** Free-radical scavenging and antioxidant activity of 5, 7,3',4'-hydroxy-substituted flavonoids. Innovative Food Science and Emerging Technologies 5, 523-528.
- 132. Atoui A.K; Mansouri A; Boskou G; Kefalas P; 2005.** Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. Food Chemistry 89, 27-36.
- 133. Judson I, Verweij J, Gelderblom H, Hartmann JT, Schöffski P and Blay JY ; 2014.**  
Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. Lancet Oncol. 15(4): 415-23.
- 134. Billingham ME, Masson JW, Bristow MR and Daniels JR ; 1978.** Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. Cancer Treat Rep. 62:865-972.
- 135. Chatterjee K, Zhang J, Hombo N and Karliner J ; 2010.** Doxorubicin Cardiomyopathy. Cardiology. 115(2): 155-62.
- 136. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C and Pacher P ; 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.
- 137. Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V and Simůnek T ; 2013.** Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. Antioxid Redox Signal. 18(8):899-929.

138. **Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M and Swierczek-Zieba G ; 2013.** Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*. 20;19(1):78-101.
139. **Georgiev V, Ananga A and Tsoleva V ; 2014.** Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*. 21;6(1):391-415.
140. **Belfadel A; 2013.** Etude phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antibactérienne de la partie aérienne de la plante médicinale « *Ruta montana* ». Mémoire de master en microbiologie, Université Abbès Laghrour Khenchela, 1-4.
141. **Du Y and Lou H ; 2008.** Catechin and proanthocyanidin B4 from grape seeds prevent doxorubicin-induced toxicity in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*. 591(1-3): 96-101.
142. **Vincent DT, Ibrahim YF, Espey MG and Suzuki YJ ; 2013.** The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. *Cancer Chemother Pharmacol*. 72(6):1157-68.
143. **Derbel S., Ghedira K ; 2005.** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1:28-34.
144. **Tsai J, Mcintosh J, Pearce P, Camden B, Jordan BR; 2002.** Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle extract. *Food Research International*, 35 : 351-356.
145. **Bandari U, Shweta S, Madhusudhana K, Bidya DS, Challa VS, Rajeswara RP, V.G.M.Naidua, Rama Ks.** Ethanolic extract of *Boswellia ovalifoliolata* bark and leaf attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Environmental toxicology and pharmacology* 36 (2013) 840–849. Ce choix a été adopté afin d'avoir une idée préliminaire sur l'effet de l'extrait de notre plante vis-à-vis de la cardiotoxicité de la doxorubicine
146. **Osama M A, Ahmed AE, Abdulrahman MA.** Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against doxorubicin-induced oxidative cardiotoxicity in rats. *Med Sci Monit*, 2011; 17(4): BR110-115
147. **Deepa PR, Varalakshmi P.** Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity, *Chem. Biol. Interact*, 146, 2003, 201–210
148. **Liu X, Chen Z, Chua CC, Ma Y, Youngberg GA, Hamdy R, Chua BHL; 2002.** Melatonin as an effective protector against Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 283, 254–263.

## Les références bibliographies

---

149. Praveen B, Chandrasekar M, Joghee N, Nanjan MJ, Satishkumar MN, Suresh B;2008. *Phyllanthus maderaspatensis*, a dietary supplement for the amelioration of adriamycin-induced toxicity and oxidative stress in mice, *J Nat Med*, 62, 2008, 149–154.
150. Abdul SN, Shibli JA, Krishna KP, Mohammad A, Aftab A, Abul KN; 2013. Protective effects of *Bombyx mori*, quercetin and benazepril against doxorubicin induced cardiotoxicity and nephrotoxicity, *Journal of Saudi Chemical Society*.

## RÉSUMÉ

Le but de notre travail tend à étudier l'effet préventif de l'extrait acétate d'éthyl de la plante médicinale *Ruta montana* sur le stress oxydant induit par la doxorubicine chez des rats wistar. D'abord on a réalisé un screening phytochimique sur l'extrait méthanolique qui a révélé la présence des tanins, flavonoïdes, composés réducteurs, coumarines et alcaloïdes.

L'étude quantitative des extraits bruts de la plante a révélé que l'extrait acétate d'éthyl représente la fraction la plus riche en flavonoïdes ( $67.47 \pm 0.17$  mg EQ/g d'extrait) alors que les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait brut méthanolique ( $285.55 \pm 6.59$  mg EQ/g d'extrait) et l'extrait des flavonoïdes totaux ( $222.44 \pm 5.02$  mg EQ/g d'extrait) sont les plus riches en polyphénols.

Qualitativement, l'analyse effectuée par CCM des extraits a montré la présence d'une multitude de variété des flavonoïdes comme : Flavonols, Flavones, Isoflavones, Flavanones. Hydroxyflavonol, Anthocyanidine 3- glycosides, Aurones...etc.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH<sup>°</sup> a montré que l'extrait acétate d'éthyl est le plus actif comparé aux différents extraits avec un IC<sub>50</sub> de  $0.0412 \pm 0.0004$  mg/g.

Par ailleurs, des rats wistar ont été divisés en quatre groupes. Le groupe témoin reçoit l'eau saliné par gavage (5ml/kg) pendant 15jours. Les animaux du deuxième groupe reçoivent par voie orale l'extrait acétate d'éthyl de *R. montana* à la dose 100mg/kg pendant 15jours. Le troisième groupe d'animaux, reçoit par voie intrapéritonéale une dose de 15mg/kg. Le dernier groupe est prétraité par l'extrait de plante à la même dose pendant 15jours suivi d'une injection unique de DOX à la dose de 15 mg/kg (i.p).

Après 48h de l'injection de la DOX, différents paramètres biochimiques ont été évalués et les résultats ont été comparés entre les différents groupes d'animaux. Le prétraitement des rats par l'extrait de plante a abaissé l'augmentation des activités des enzymes cardiaques CPK, ASAT, ALAT et LDH dans le sang qui est provoquée par l'administration de la DOX.

Au bout de cette étude, nous retiendrons l'effet bénéfique et intéressant de l'extrait acétate d'éthyl quant à la prévention de la cardiotoxicité causés par la doxorubicine.

**Mots clés:** activité antioxydante, *Ruta montana*, cardiotoxicité, flavonoïdes, doxorubicine.

## ABSTRACT

The goal of our work is to examine the preventive effect of ethyl extract from the medicinal plant *Ruta montana* on oxidative stress induced by doxorubicin in the Wistar rats.

Firstly we will provide the phytochemical screening on methanolic extract which revealed the presence of tannins, flavonoids, reducing compounds, coumarins and alkaloids.

The quantitative study of the crude extracts of the plant revealed that the ethyl acetate extract is the most rich fraction flavonoids ( $67.47 \pm 0.17$  mg EQ / g of extract), while the results show us that the polyphenols dosage methanolic crude extract ( $285.55 \pm 6.59$  mg EQ / g extract) and extraction of all flavonoids ( $222.44 \pm 5.02$  mg EQ / g of extract) are the richest in polyphenols.

Qualitatively, the analysis by TLC extracts show us the presence of a multitude of variety as flavonoids: flavonols, flavones, isoflavones, flavanones. Hydroxyflavonol, anthocyanidin 3-glycosides, auronones ... etc.

The study of the antioxidant power by the method of DPPH<sup>°</sup> showed that the ethyl acetate extract was the most active compared to different extracts with an IC<sub>50</sub> of  $0.0412 \pm 0.0004$  mg / g.

In addition, Wistar rats were divided into four groups. The control group receives water Saliné by gavage (5 ml / kg) for 15 days. The animals of the second group receive orally the ethyl acetate extract *R. montana* dose 100mg / kg for 15 days. The Flanker group of animals, receives intraperitoneally a dose of 15mg / kg. The last group is pretreated with the plant extract have a same dose for 15 days followed by a single injection of DOX 15 mg / kg (ip).

After 48 h of injection of DOX, different biochemical parameters were evaluated and the results were compared between different groups of animals. Pretreatment of rats by the plant extract lowered the increased activity of cardiac enzymes CK, AST, ALT and LDH in the blood which is caused by the administration of DOX.

In the end of this study, we will retain the beneficial and interesting effect of the ethyl acetate extract on the prevention of the cardiotoxicity caused by doxorubicin

Keywords: antioxidant activity, *Ruta montana*, cardiotoxicity, flavonoids, doxorubicin.

## الملخص

الهدف من عملنا هو محاولة دراسة المفعول الوقائي للمستخلص الايثيلي للنبتة الطبية *Ruta montana* على الإجهاد المؤكسد الذي يسببه doxorubicin عند الفئران rats wistar أولاً قمنا بالتقصي الفيتوكيميائي على المستخلص الميثانولي والذي اثبت وجود التينينات والفلافونويدات والمكونات الارجاعية والكومارينات والالكالويدات.

الدراسة الكمية للمستخلصات الخامة اثبتت ان المستخلص الايثيلي يمثل الجزء الاغنى بالفلافونويدات في حين اثبتت النتائج الخاصة بقياس متعدد الفينول ان المستخلص الميثانولي الخام ومستخلص الفلافونويد. الخام هم الاكثر احتواء لمعدد الفينول.

نوعياً اثبتت الدراسة المنجزة بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وجود عدد كبير من انواع الفلافونويدات .

دراسة النشاط المضاد للاكسدة بطريقة DPPH<sup>o</sup> اثبتت ان المستخلص الايثيلي هو الاكثر نشاطا مقارنة بمختلف المستخلصات

في موضع اخر قسمت الفئران الى اربعة مجموعات. المجموعة الشاهدة كانت تستقبل الماء الملحي عن طريق التزقيم 5مل/كغ لمدة 15 يوما . فئران المجموعة الثانية تستقبل عن طريق الفم المستخلص الايثيلي بجرعة 100مغ/كغ لمدة 15 يوما. أما المجموعة الثالثة فكانت تستقبل جرعة 15مغ/كغ عن طريق الصفاق. المجموعة الأخيرة عولجت مسبقا بمستخلص النبتة بنفس الجرعة لمدة 15 يوما ثم حقنت بجرعة وحيدة من doxorubicin

بعد 48 ساعة من حقن doxorubicin تم إجراء التحاليل البيوكيميائية لمختلف المجموعات والمقارنة فيما بينها ومن هذا وجدنا أن العلاج المسبق للفئران بمستخلص النبتة انقص نشاط الإنزيمات القلبية LDH, ALAT, ASAT, CPK الذي يسببه doxorubicin

في نهاية هذه الدراسة نستنتج الدور الهام والمفيد للمستخلص الايثيلي في الوقاية من التسممات القلبية التي يسببها doxorubicin

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للأكسدة, تسمم قلبي, فلافونويد, *Ruta montana*, doxorubicin,

Présenté par : Boughdiri Abd elmalek  
Bouhlala ali

Date de soutenance :  
...../06/2015

**Thème :**  
***Effet préventif de l'extrait de la plante médicinale *Rutamontana* (Clus.)L. (الفيجل) sur le stress oxydant induit par la doxorubicine***

**Résumé**

Le but de notre travail tend à étudier l'effet préventif de l'extrait acétate d'éthyl de la plante médicinale *Ruta montana* sur le stress oxydant induit par la doxorubicine chez des rats wistar.

D'abord on a réalisé un screening phytochimique sur l'extrait méthanolique qui a révélé la présence des tanins, flavonoïdes, composés réducteurs, coumarines et alcaloïdes.

L'étude quantitative des extraits bruts de la plante a révélé que l'extrait acétate d'éthyl **représente la fraction la plus riche en flavonoïdes** ( $67.47 \pm 0.17$  mg EQ/g d'extrait) alors que les résultats du dosage des polyphénols montrent que l'extrait brut méthanolique ( $285.55 \pm 6.59$  mg EQ/g d'extrait) et l'extrait des flavonoïdes totaux ( $222.44 \pm 5.02$  mg EQ/g d'extrait) sont les plus riches en polyphénols.

Qualitativement, l'analyse effectuée par CCM des extraits a montré la présence d'une multitude de variété des flavonoïdes comme : Flavonols, Flavones, Isoflavones, Flavanones. Hydroxyflavonol, Anthocyanidine 3- glycosides, Aurones...etc.

L'étude du pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH° a montré que l'extrait acétate d'éthyl est le plus actif comparé aux différents extraits avec un  $IC_{50}$  de  $0.0412 \pm 0.0004$  mg/g.

Par ailleurs, des rats wistar ont été divisés en quatre groupes. Le groupe témoin reçoit l'eau saliné par gavage (5ml/kg) pendant 15jours. Les animaux du deuxième groupe reçoivent par voie orale l'extrait acétate d'éthyl de *R.montana* à la dose 100mg/kg pendant 15jours. Le troisième groupe d'animaux, reçoit par voie intrapéritonéale une dose de 15mg/kg. Le dernier groupe est prétraité par l'extrait de plante à la même dose pendant 15jours suivi d'une injection unique de DOX à la dose de 15 mg/kg (i.p).

Après 48h de l'injection de la DOX, différents paramètres biochimiques ont été évalués et les résultats ont été comparés entre les différents groupes d'animaux. Le prétraitement des rats par l'extrait de plante a abaissé l'augmentation des activités des enzymes cardiaques CPK, ASAT, ALAT et LDH dans le sang qui est provoquée par l'administration de la DOX.

Au bout de cette étude, nous retiendrons l'effet bénéfique et intéressant de l'extrait acétate d'éthyl quant à la prévention de la cardiotoxicité causés par la doxorubicine.

**Mots clés:** activité antioxydante, *Ruta montana*, cardiotoxicité, flavonoïdes, doxorubicine.