

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل  
Université Mohammed Seddik Ben yahia de Jijel

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Thèse Présentée par  
**Hanane Nadia BOUSSENANE**

Pour l'obtention du diplôme  
**De Docteur en Sciences en Biologie**

**Option : Toxicologie**

**Thème**

**Etude des risques de potentialisation des effets  
prooxydants du Féruénéol et des médicaments  
anticancéreux en cas d'association aux activateurs  
enzymatiques sur tumeurs Expérimentales et tissus  
sains**

Soutenue publiquement devant le jury composé de :

<b>Président:</b> Essaïd LEGHOUCI	(Professeur, Université MSB Jijel)
<b>Rapporteur:</b> Mesbah LAHOUEL	(Professeur, Université MSB Jijel)
<b>Examinatrice:</b> Nedjoud GRARA	(Professeur, Université de Guelma)
<b>Examineur:</b> Mohamed Rida DJEBAR	(Professeur, Université d'Annaba)
<b>Examineur:</b> Abd Elwahab BOUZIDI	(Professeur, Université de Setif)
<b>Examineur :</b> Hocine RECHRECHE	(Professeur, Université MSB Jijel)

# *Remerciements*

*En tout premier lieu, je remercie le bon DIEU, tout puissant de m' avoir donné la force pour accomplir ce travail.*

*Je désire exprimer notre profonde et vive reconnaissance à mon encadreur, **Mr LAHOUEL Mesbah**, Qui a mis toute sa compétence à notre disposition, pour ces directives et Conseils judicieux et pour son suivi à l'élaboration de Ce travail.*

*Nos remerciements vont aux membres de jury qui ont bien accepté de juger ce travail :*

***Mr LEGHOUCHI Essaid**, professeur à l'université de jijel qui m' a fais l'honneur de présider le jury,*

***M<sup>me</sup> GRARA Nedjoud** professeur à l'université de Guelma, d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.*

***Mr DJEBAR Mohamed Rida** professeur à l'université d'Annaba qui va honorer le jury pour évaluer ce travail.*

***Mr BOUSIDI Abd Elwahab** professeur à l'université de Sétif d'avoir accepté de critiquer ce travail.*

***Mr RECHRECHE Hocine** professeur à l'université de Jijel pour avoir bien voulu juger ce travail.*

*Afin de n'oublier personne, mes vifs remerciements s'adressent à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour réussir ce modeste travail.*

# Table des matières

## Liste des abréviations

## Liste des Figures

## Liste des Tableaux

INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1. L'induction enzymatique .....	4
I.1.1. les inducteurs enzymatiques.....	4
I.1.2. Présentation des cytochromes P450 .....	4
I.1.2.1. Le rôle des cytochromes P450 .....	5
I.1.2.2. Les CYPs dans la mitochondrie.....	7
I.1.3. Les médicaments inducteurs enzymatiques. ....	7
I.2. Les tumeurs broncho-pulmonaires.....	8
I.2.1. Définition .....	8
I.2.2. Classification des tumeurs broncho-pulmonaires .....	8
I.2.2.1. Les Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules (CBPC) .....	8
I.2.2.2. Les Carcinomes Broncho-pulmonaires Non-à Petites Cellules.....	9
I.2.3. Les bases de l'oncogénèse pulmonaire .....	9
I.3. Le stress oxydatif et le cancer du poumon.....	10
I.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans l'oncogénèse.....	10
I.3.2. La peroxydation lipidique (LPO) .....	12
I.3.3. Le système de défense antioxydant .....	12
I.3.3.1. Antioxydants enzymatiques.....	13
I.3.3.2. Antioxydants non-enzymatiques .....	14

I.4. La mitochondrie source des ROS .....	15
I.4.1. La chaîne respiratoire mitochondriale .....	15
I.4.2. La production de ROS .....	16
I.5. La mitochondrie cible des ROS .....	17
I.6. La chimiothérapie anti -cancer pulmonaire .....	18
I.6.1. Le cyclophosphamide (CP) .....	18
I.6.2. Pharmacocinétique et métabolisme du cyclophosphamide .....	19
I.6.3. Le cyclophosphamide et stress oxydatif.....	21
I.7. la phytothérapie pour le cancer de poumon .....	22
I.7.1. Les plantes ayant un effet anti- tumorale .....	23
I.7.2. <i>Ferula vesceritensis</i> .....	24
I.7.2.1. Présentation de la plante .....	24
I.7.2.2. Description botanique de <i>Ferula vesceritensis</i> .....	24
I.7.2.3 Répartition géographique.....	24
I.7.2.4. Utilisations traditionnelles de <i>Ferula vesceritensis</i> .....	25
I.7.2.5. Le ferulénol , un coumarine extrait de <i>Ferula</i> .....	25

## **MATERIEL ET METHODES**

II.1. Etude I.....	28
II.1.1. Extraction et isolement du Ferulénol .....	28
II.1.2. préparation de l'extrait brut de la propolis.....	29
II.1.3. Isolement des mitochondries du foie de rat .....	30
II.1.4. dosage des paramètres mitochondrial .....	31
II.1.4.1. Mesure de la respiration mitochondriale et du gonflement.....	31
II.1.4.2. Surveillance optique du potentiel membranaire mitochondrial .....	31
II.2. Etude II .....	32
II.2.1. Induction de la Pathologie Expérimentale : Cancer de Poumon.....	32

II.2.2. Traitement des Animaux par le Cyclophosphamides (CP), le féruléol (FR) et le phénobarbital (PB).....	32
II.2.3. Groupes Expérimentaux.....	32
II.2.4. Prélèvement des poumons.....	33
II.2.5. Evaluation du statut oxydatif au niveau de la mitochondrie pulmonaire.....	34
II.2.5.1. préparation des mitochondries pulmonaires.....	34
II.2.5.2. préparation de la fraction cytosolique des cellules pulmonaires.....	34
II.2.5.3. Dosages mitochondrial et cytosolique.....	35
II.2.5.3.1. Mesure de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries.....	35
II.2.5.3.2. Mesure du taux de gonflement mitochondrial.....	35
II.2.5.3.3. Mesure du taux du Malon dialdéhyde mitochondrial (MDA).....	36
II.2.5.3.4. Mesure de la concentration du Glutathion réduit cytosolique (GSH).....	36
II.2.5.3.5. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase.....	37
II. 8. Etude Histopathologique.....	38
II. 8. 1. Examen macroscopique des poumons.....	38
II. 8.2. Examen microscopique des poumons.....	38
II. 9. Analyse statistique.....	38

## **RESULTATS ET INTERPRETATION**

III.1. Etude I.....	39
III.1.1. Les composés chimiques.....	39
III.1.2. Modulation du gonflement mitochondrial.....	40
III.1.3. L'extrait de propolis rétablit la perturbation du potentiel membranaire de la mitochondrie induit par le Feruléol.....	43
III.1.4. Interaction de l'extrait de la propolis et du Feruléol avec la chaîne respiratoire mitochondrial.....	43
III.2. Etude II.....	44
III.2.1. Etude histologique du poumon.....	44

III.2.1.1. L'examen macroscopique des poumons des rats traités par le B(a)P .....	44
III.2.1.2.Examen des coupes histologiques des différents groupes observées au microscope optique G x40 .....	45
III.2.2. Evaluation du statu oxydatif dans la cellule cancéreuse du poumon.....	46
III.2.2. 1. Mesure du taux du Malondialdéhyde mitochondrial (MDA) .....	46
III.2.2.2. Evaluation des taux de l'anion superoxyde dans la cellule cancéreuse du poumon .....	48
III.2.2.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase dans la cellule cancéreuse du poumon .....	49
III.2.2.4. Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) dans la cellule cancéreuse du poumon .....	51
III.2.2.5. Evaluation du taux du gonflement (swelling) mitochondrial dans la cellule cancéreuse du poumon.....	53
III. 2.3. Evaluation du statu oxydatif dans la cellule saine du poumon.....	54
III. 2.3. 1. Mesure du taux du Malondialdéhyde mitochondrial (MDA) .....	54
III. 2.3. 2. Evaluation des taux de l'anion superoxyde dans la cellule saine du poumon	56
III. 2.3.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase dans la cellule saine du poumon .....	57
III. 2.3.4. Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) dans la cellule saine du poumon.....	59
III.2.3. 5. Evaluation du taux du gonflement (swelling) mitochondrial dans la cellule saine du poumon .....	60

## **DISCUSSION**

IV. 1. Etude I.....	63
IV. 2. Etude II.....	66

## **CONCLUSION**

## **REFERENCES**

## Liste des abréviations

**8-oxodGuo** : 8-oxo-7,8-dihydro-2' déoxyguanosine

**ACR**: Acroléine

**AIP**: AhR Interacting Protein

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AhR** : Aryl Hydrocarbon Receptor,

**AKR**: Aldoketoréductases

**ANT** : adénine nucléotide translocator.

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**Arnt**: Aryl de translocation nucléaire

**B (a) P**: benzo (a) pyrène,

**Bax**: Bcl-2-associated X protein

**BPD** :benzo(a)pyrène dihydrodiol

**BPDE** : 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyrène 9,10-oxyde,

**BPQ**: B(a)P-7,8-dione

**CYP**: cytochrome P450

**CYP 3A4**: la super-famille d'enzymes du cytochrome P450

**CAT**: catalase

**CAPE** : caffeic acid phenethyl ester

**CDNB**: chlorodinitrobenzène

**CP**: cyclophosphamide

**dAMP** : désoxyadénosine monophosphate

**DD** : Dihydrodiol Déshydrogénase

**DTNB**: 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque)

**DO**: densité optique

**EGF**: epidermal growth factor

**EGFR**: epidermal growth factor receptor.

**EH** : Epoxydes Hydrolases

**ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène

**FAS** : protéine de la famille du récepteur de TNF

**GBA** : acide galbanique

**GSH/GSSG** : glutathion réduit/oxydé

**GST:** glutathione S-transférase

**GST $\mu$**  : l'une des isoenzyme de la GST.

**GPx:** glutathione peroxydase

**HAP:** hydrocarbures aromatiques polycycliques

**Hsp 90:** Heat shock protein 90

**HNE:** 4-hydroxy-2-nonenal

**IP:** intrapéritonéale

**IV** : intraveineuse

**LPO:** peroxydation lipidiques

**MDA:** malondialdéhyde

**NBT:** nitroblu-tétrazolium

**NADPH:** Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NF- $\kappa$ B:** Nuclear factor  $\kappa$ B

**NO:** monoxyde d'azote

**PEG:** polyéthylène glycol lyophilized

**PM:** phosphoramide moutarde

**SOD:** superoxyde dismutase

**TBA:** acide thiobarbiturique

**TBARS:** substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique

**TCA:** acide trichloracétique

**TNF** : tumor necrosis factor

**TNFR1:** Tumor-Necrosis-Factor-Receptor-Type-I

**XRE** : Elément de Réponse aux Xénobiotiques



## Liste des figures

Figure 1: Implications physiologiques et physiopathologiques des CYP P450 ....	6
Figure 2: Les CYPs dans la chaîne de transfert d'électrons. La classe I comprend les CYPs mitochondriaux.....	7
Figure 3: Les trois stades de la cancérogenèse et le niveau de l'effet carcinogène. le niveau des ERO à différents stades du processus de la cancérogenèse .....	11
Figure 4: La chaîne respiratoire mitochondriale.....	15
Figure 5: Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.....	16
Figure 6: les étapes du processus apoptotique .....	17
Figure 7: Structure du cyclophosphamide .....	18
Figure 8: Métabolisme du cyclophosphamide.....	20
Figure 9: Les conséquences variables de blessure induites par les métabolites réactifs et les ERO des drogues pour différentes membranes cellulaires ainsi que les mécanismes de défense .....	21
Figure 10: photos de <i>Ferula vesicaria</i> .....	25
Figure 11: structure chimique d'une coumarine.....	26
Figure 12: structure chimique du férulénol.....	26
Figure 13: Structure chimique du férulénol .....	39
Figure 14: Chromatographie liquide haute performance de l'extrait éthanolique de la propolis.....	40
Figure 15: Effet de l'extrait de la propolis sur le férulénol induisant un gonflement mitochondriaux .....	41
Figure 16: Effet du férulénol sur le potentiel de la membrane mitochondriale..	42
Figure 17: examen macroscopique du poumon du rat sain non traité (Gx 40) ...	44
Figure 18: coupe histologique du poumon du rat recevant le B(a)P (Gx 40).....	45
Figure 19: variation du taux de Malondialdéhyde mitochondrial (MDA) dans la cellule cancéreuse du poumon .....	45

Figure 20 : variation taux du Malondialdéhyde mitochondrial (MDA) dans la cellule cancéreuse du poumon. ....	47
Figure 21 : variation du taux de l'anion superoxyde dans la cellule cancéreuse du poumon.....	48
Figure 22 : évaluation de l'activité enzymatique de la catalase dans la cellule cancéreuse du poumon.....	50
Figure 23 : Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) dans la cellule cancéreuse du poumon.....	52
Figure 24: taux du gonflement (swelling) mitochondrial dans la cellule cancéreuse du poumon.....	53
Figure 25 : taux du Malondialdéhyde mitochondrial (MDA) dans la cellule pulmonaire normale.....	55
Figure 26 : taux de l'anion super oxyde dans la cellule saine du poumon.....	56
Figure 27 : variation de l'activité enzymatique de la catalase dans la cellule saine du poumon.....	58
Figure 28 : évaluation la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) dans la cellule saine du poumon.....	59
Figure 29: taux du gonflement (swelling) mitochondrial dans la cellule cancéreuse du poumon.....	61

## **Liste des tableaux**

Tableau 1: Classification des types et des sous-types du cancer du poumon. ....	9
Tableau 2:Composition chimique de la propolis algérienne .....	40
Tableau 3:effet du féruléol sur la respiration mito chondrial .....	43
Tableau 4:Effet de la propolis sur la respiration mitochondrial.....	44

# **Introduction**

# Introduction

---

## INTRODUCTION

Le métabolisme de nombreux agents chimio-thérapeutiques utilisés pour le traitement des cancers, implique essentiellement les enzymes du cytochrome P450 (CYP<sub>S</sub>) et déclenchent l'apoptose des cellules tumorales en activant la voie mitochondriale.

Ces bio-activations enzymatiques par les cytochromes P450 sont souvent à l'origine des risques d'événements indésirables ; des conséquences cliniques dues à l'augmentation de synthèse de métabolites actifs conduisant à une augmentation de l'effet thérapeutique ou l'augmentation de synthèse de métabolites toxiques engendrant des effets fonctionnels délétères. Ces situations sont observées en cancérologie lors de l'association d'antiémétiques ou de sédatifs (souvent des neuroleptiques et des barbituriques) aux chimiothérapies, et aboutis aux résultats inattendus ou mal étudiés.

En effet, d'après les résultats de la littérature rapportant ces associations, les métabolites ne sont pas élucidés et leur pharmacocinétique et les interactions n'ont été que très peu rapportées. Toutefois, plusieurs recherches ont confirmé que les CYP<sub>S</sub> ont également la capacité d'activer les molécules de dioxygène en des entités hautement réactives (ROS), d'autres ont démontré leur implication dans la mort cellulaire programmé, l'apoptose.

C'est dans ce cadre que notre recherche vise à élucider l'interaction des inducteurs enzymatiques comme le phénobarbital avec les chimiothérapies du cancer du poumon d'une part et avec les substances bioactives végétales telle que les coumarines ; un actif potentiellement efficace contre le cancer du poumon. Notre objectif est de montrer si l'induction enzymatique aura ou non pour conséquence une diminution des effets thérapeutiques du cyclophosphamide et du féruléol.

Partant de nombreux travaux récents ayant en effet montré les effets pro-oxydants de beaucoup de coumarines, métabolites secondaires dans les graines, les racines et les feuilles de nombreuses espèces végétales toxiques et sont utilisées comme agents cytotoxiques, nous nous sommes intéressés au féruléol, sesquiterpène coumarine extrait d'une plante endémique du Sahara Algérien, *ferula veritientis*. Ces coumarines sont à l'origine de la production de radicaux libres et du déclenchement du processus toxique, ainsi une production importante de

## Introduction

---

radicaux libres oxygénés pouvant menacer la vie de la cellule tumorale. Ces substances naturelles constituent actuellement une nouvelle approche thérapeutique anti-tumorale.

Néanmoins, Ces thérapies ciblées anticancéreuses sont des molécules à risques liés à la prise concomitante des inducteurs enzymatiques, qui augmentent et induisent le système enzymatique. Cette activation serait à l'origine d'une accélération de l'oxydation de ces molécules co-administrées (coumarine et anticancéreux), produisant ainsi une production importante de radicaux libres oxygénés.

Plusieurs recherches ont montré le rôle des inducteurs enzymatique dans l'induction des cytochromes P450 (CYP). D'autre ont confirmé que ces CYP ont la capacité de produire les ROS via la chaîne respiratoire mitochondrial. Il est donc possible que l'effet pro-oxydant, des coumarines et de la chimiothérapie anticancéreuse, peut être potentialisé en cas d'association aux inducteurs enzymatiques.

La mitochondrie, l'organite responsable de la plus grande partie de la production de l'énergie (sous forme d'ATP) nécessaire au fonctionnement cellulaire, est la principale source de ROS par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires. Aujourd'hui, les recherches sur la mitochondrie sont légion et des congrès sont organisés pour aborder en détail son sujet. Certaines indiquent qu'une diminution de l'activité mitochondriale est bénéfique alors que d'autres prouvent qu'en l'augmentant il est possible d'augmenter aussi la longévité. C'est le «paradoxe de la mitochondrie».

Dans cette optique, nous avons ciblé la mitochondrie pour préciser le rôle qu'elle devrait joué dans l'apparition d'un stress oxydatif et révéler si les perturbations toxiques seraient les mêmes dans une cellule normale et dans une cellule cancéreuse exposée à des associations d'un coumarine pur, le férulenol, ou du cyclophosphamide comme agent antinéoplasique à un activateur enzymatique, le phénobarbital, et d'expliquer ainsi les interactions toxiques potentielles entre le férulenol (féru) ou le cyclophosphamide (CP) et l'activateur enzymatique, phénobarbital (PB).

Notre recherche est réalisée sur le rat Wistar albinos *in vivo* et vise à :

- induire le cancer pulmonaire expérimentalement par le Benzo(a)pyrène B(a)P, pour :
- étudier le comportement du stress oxydatif dans la cellule cancéreuse et la cellule saine pulmonaire soumise à l'effet d'un traitement chimiothérapique à base de cyclophosphamide

## Introduction

---

- ainsi qu'un traitement naturel à base d'une coumarine pur, (le férulenol).
- Ces deux traitements seront administrés aux rats chacun seul, puis associés au phénobarbital (inducteur enzymatique) choisit pour réaliser cette étude.

Nous sommes intéressés également à tester :

- l'effet pro oxydant du férulenol sur, le foie, afin d'éviter toute atteinte de cet organe qui est un obstacle majeur pour une substance sur le chemin de son site d'action. C'est l'organe principal du métabolisme des médicaments. La majorité des xénobiotiques subissent ce premier passage hépatique.

En parallèle, nous allons étudier :

- l'effet cytoprotecteur du foie d'un autre produit naturel de l'abeille qui est la propolis. L'extrait de propolis est administré aux traitements par le cyclophosphamide ou par le féruléol.

# **Analyse bibliographique**



## **I.1. L'induction enzymatique**

L'induction enzymatique se définit par une augmentation de l'activité des systèmes enzymatiques par des substances appelées inducteurs enzymatiques (ligands endogènes ou xénobiotiques). L'inducteur agit directement au niveau de l'ADN via l'action de ligands facteurs de transcription qui vont se fixer à des récepteurs nucléaires et qui vont induire la synthèse de nouvelles enzymes : cytochromes et/ou glucuronosyltransférases (UGT). Ce mécanisme nécessite 10 à 15 jours d'action par l'inducteur pour être complètement effectif. Après arrêt de l'administration de l'inducteur l'effet persiste plusieurs jours et diminue progressivement (Guéguen et al., 2006 ; Welling 2012).

### **I.1.1. les inducteurs enzymatiques**

Il s'agit de substances ou médicaments qui accentuent l'action de certaines enzymes (essentiellement hépatiques), pouvant ainsi stimuler la bio transformation d'autres substances en produits actifs ou inactifs, voire toxiques.

Les inducteurs enzymatiques accélèrent le métabolisme de certains médicaments en augmentant la quantité d'enzymes, soit en inhibant leurs dégradations (mécanisme mineur), soit en augmentant leurs expressions génétiques (mécanisme majeur) (Pharmacocinétique clinique., 2010) En présence d'un inducteur enzymatique, les médicaments métabolisés par le cytochrome P450 (CYP) ont un métabolisme accéléré et leur demie-vie d'élimination plasmatique diminue. (Le Guide., 2011).

### **I.1.2. Présentation des cytochromes P450**

Le cytochrome est une protéine indispensable à la production d'énergie par les cellules. Il participe à la chaîne respiratoire des cellules fonctionnant comme transporteur d'électrons, permettant la synthèse d'ATP (Adénosine-tri-phosphate) qui est la source d'énergie pour les cellules. Certains cytochromes ont une activité enzymatique, il s'agit du groupe des cytochromes P450 (Morin., 2003).

Les CYP constituent une famille d'hémoprotéines initialement identifiés comme des pigments dans des microsomes de foie de rat (Klingenberg.,1958). En effet, le nom de cytochrome P450 provient de la propriété de ces pigments d'émettre un spectre d'absorbance à 450 nm, spécifique de ces hémoprotéines (Omura et al., 1962). Le CYP P450 a un premier rôle de métabolisation des composés endogènes tels que les stéroïdes, un second de détoxification des substances ingérées ou inhalées (=exogènes). Ainsi le système P450 n'a pas

été initialement développé pour aider l'Homme à métaboliser les médicaments. La description du rôle du système P450 dans la métabolisation des médicaments n'est qu'un fait récent dans l'histoire de l'Homme (Cozza., 2001).

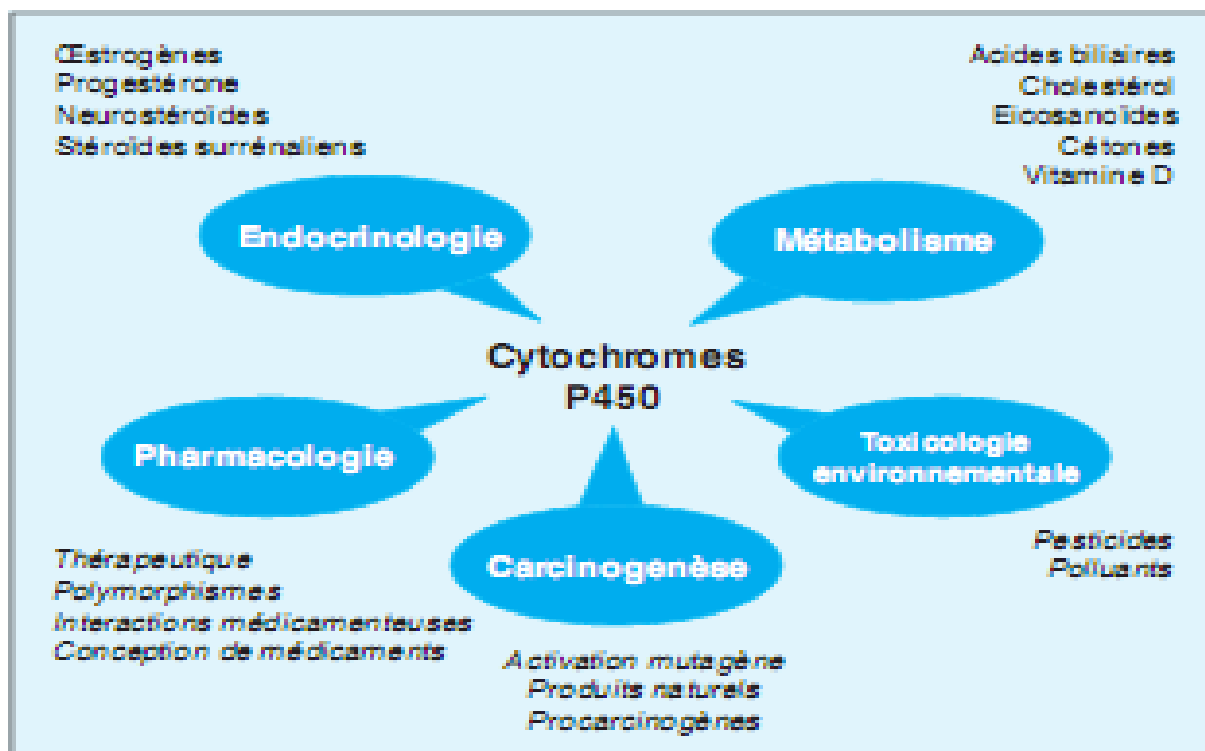
La nomenclature actuelle des cytochromes P450 tient compte de leur appartenance à des familles et sous familles grâce au pourcentage d'analogie dans la séquence d'acides aminés : S'il y a moins de 40% d'analogie dans la séquence d'acides aminés de deux cytochromes P450, ils seront classés dans des familles différentes (Lamotte., 2002).

Chez l'Homme adulte, les trois principales familles de cytochromes impliquées dans le métabolisme de nombreux médicaments sont les CYP 1, 2 et 3. Les sous-familles sont les CYP 1A, CYP 2A, CYP 2B, CYP 2C, CYP 2D, CYP 2E et CYP 3A. Soixante-dix pour cent des cytochromes hépatiques humains sont constitués des sept isoenzymes suivantes: CYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C, 2D6, 2E1 et 3A (Schenkman.,1993). Chez l'Homme il existe 18 familles et 43 sous-familles (Nelson et al., 1996).

Bien que majoritairement concentrés au niveau du foie, les P450s sont également exprimés dans d'autres organes et tissus tels que le rein, les seins, la prostate (Williams et al., 2000) la peau, l'épithélium nasal, le placenta, le cerveau, le poumon, la rate, le pancréas et la région gastro-intestinale (Waterman., 1992 ; Schenkman et Griem., 1993 ; Hellmold et al., 1998 ; Hakkola et al., 1998, 1996).

### **I.1.2.1. Le rôle des cytochromes P450**

Les cytochromes P450 sont essentiels pour effectuer des réactions de biotransformations de substances endogènes et exogènes: ils détoxifient l'organisme des molécules étrangères à celui-ci (=xénobiotiques) en les oxydant. Ces réactions donnent naissance à des métabolites inactifs, actifs ou toxiques (Mannering., 1976). Ils interviennent par exemple dans la conversion du cholestérol en androgènes, en estrogènes, et gluco et minéralocorticoïdes, dans la synthèse ou la dégradation des prostaglandines et d'autres acides gras, dans la conversion des vitamines en leur forme active ou dans le métabolisme du cholestérol en acides biliaires. Ils interviennent également dans la biotransformation des xénobiotiques comme les médicaments et les polluants. La variété des propriétés catalytiques provient de la variété de la partie protéique du cytochrome P450 (Lamotte., 2002.). Le rôle des cytochromes P450 dans l'organisme est mentionné dans la figure 1.

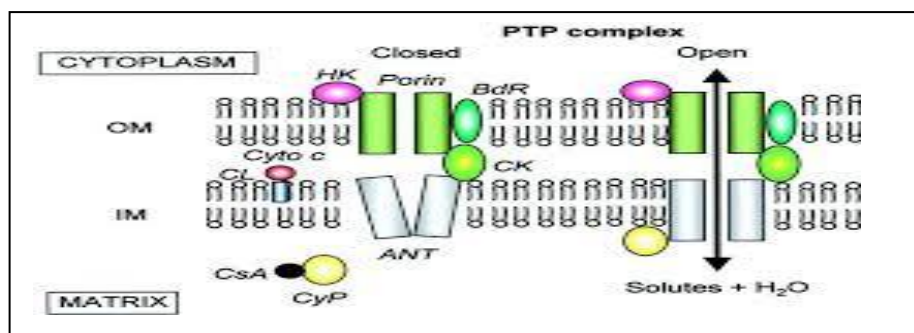


**Figure1.** Implications physiologiques et physiopathologiques des CYP P450 (Guéguenet al., 2006)

## I.1.2.2. Les CYPs dans la mitochondrie

La présence des CYPs dans les mitochondries a été découverte en 1964 (Harding et al., 1964). La majorité des réactions catalysées par les CYPs sont des mono-oxygénations qui permettent l'ajout d'un atome d'oxygène moléculaire sur un substrat. Cette réaction nécessite deux électrons qui sont transférés à partir du NADPH par une protéine partenaire : une réductase. Il y a deux types de protéines réductases distincts suivant la localisation microsomale ou mitochondriale des CYPs (Paine et al., 2006; Hannemann et al., 2007).

La classe I comprend les CYPs mitochondriaux qui utilisent un système de transfert d'électrons à deux composants : ferrédoxine réductase (FdR) à flavine FAD (flavineadénine dinucléotide) et une ferrédoxine (Fdx) à centre fer-soufre Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Les deux électrons, un par un, sont prélevés du NADPH par la FdR puis transmis à la Fdx qui les transfère ensuite au CYP. Les FdR et Fdx sont associés avec la membrane interne de la mitochondrie (Mitani *et al.*, 1982).



**Figure 2 :** Les CYPs dans la chaîne de transfert d'électrons. La classe I comprend les CYPs mitochondriaux (Weiss et al., 2003).

### I.1.3. Les médicaments inducteurs enzymatiques.

Les médicaments inducteurs les plus puissants sont la rifampicine, le phénobarbital, la phénytoïne et la carbamazépine. Ils induisent surtout les CYP3A et 2C. D'autres médicaments comme la rifabutine, lanévirapine ou l'éfavirenz sont des inducteurs plus modestes. Leur administration peut nécessiter d'augmenter la posologie du médicament associé (Barry M et al., 1999).

Le phénobarbital (acide phényl-éthyl-barbiturique), également connu sous le nom de phénobarbitone, est un médicament barbiturique qui a été découvert pour la première fois en 1911 par le chimiste allemand Emil Fischer (Kwan et Brodie., 2004).

Le phénobarbital est devenu le médicament de choix pour le traitement épileptique dans le monde entier., il est resté l'un des médicaments les plus importants dans la lutte contre l'épilepsie depuis près d'un siècle (Kumbier et Haack, 2004).

Par rapport à d'autres barbituriques, le phénobarbital présente un indice thérapeutique élevé. Ce qui signifie que la quantité de médicament prise pour atteindre un seuil mortel est beaucoup plus élevée que la quantité efficace pour une réponse thérapeutique (Clinical Pharmacology, 2009).

Le phénobarbital est métabolisé par le foie et son métabolite est inactif, La primidone est convertie rapidement en phényléthylmalonamide (PEMA) et plus lentement en phénobarbital (Ochoa et al., 2004 ; Levy René et al., 1995).

Le phénobarbital provoque une augmentation d'environ 40% de la teneur totale en CYPs du foie, qui était également associée à une augmentation de 75% de la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Shaik., 2010).

Au cours des dernières années, des séquences sensibles au Phénobarbital ont été identifiées dans les régions adjacentes en 5' de plusieurs gènes P450. L'unité d'activation sensible au phénobarbital (PBRU) des membres de la famille du gène CYP2B contient deux sites de liaison aux récepteurs nucléaires potentiels (NR1 et NR2) qui flanquent un motif de liaison du facteur nucléaire 1 (NF-1). Les facteurs nucléaires qui régissent l'activité des PBRU n'ont pas encore été caractérisés. Il semble que le phénobarbital puisse activer plusieurs récepteurs orphelins nucléaires pour induire divers gènes CYP, (Czekaj., 2000).

## **I.2. Les tumeurs broncho-pulmonaires**

### **I.2.1. Définition**

Les pathologies communément appelées « cancers du poumon » sont des tumeurs broncho-pulmonaires issues principalement des cellules épithéliales bronchiques. Ces tumeurs présentent une grande disparité en termes de morphologie, comportement biologique, temps de doublement, dissémination métastatique, réponse aux traitements ou taux de survie (Smith, Denlinge et Jones 2006 ; Wislez et al., 2006). Différents modes de classification reposent sur ces variations et ont été proposés afin de distinguer les différents types de cancers pulmonaires rencontrés. La classification la plus fréquemment utilisée et régulièrement mise à jour est celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Brambilla et al., 2001).

### **I.2.2. Classification des tumeurs broncho-pulmonaires**

Les cancers du poumon sont classés en deux groupes : les cancers à petites cellules (13% des cancers pulmonaires) et les cancers non à petites cellules (87% des cancers pulmonaires) (Brambilla et al., 2001).

#### **I.2.2.1. Les Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules (CBPC)**

Pratiquement toujours liés au tabagisme, ce sont des tumeurs de haut grade de malignité, dont la forme bénigne est la tumeur carcinoïde, et la forme intermédiaire est la tumeur carcinoïde atypique. Le CBPC est très invasif, et est constitué de cellules de petite taille, au rapport nucléo-cytoplasmique très élevé. Les CBPC représentent 15% des carcinomes bronchiques et constituent une entité anatomo clinique bien individualisée. Ces cancers sont souvent

## Analyse bibliographique

diagnostiqués à un stade avancé dans 70% des cas et sont traités par chimiothérapie. Le pronostic de ces CBPC est très mauvais, puisque la survie de ces patients n'excède pas 2,5 années (Travis et al., 2004).

### I.2.2.2. Les Carcinomes Broncho-pulmonaires Non-à Petites Cellules

Cette famille de cancers bronchiques représente 85% des cancers bronchiques (Fred et al., 2008) et contient plusieurs sous-types histologiques forts différents: les carcinomes malpighiens, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules, ou plus généralement, toute entité ne présentant pas de caractéristiques "à petites cellules" (Beasley et al., 2005).

**Tableau 1.** Classification des types et des sous-types du cancer du poumon.

(Brambilla et al ; 2001)

Cancer du poumon non à petites cellules	Cancer du poumon à petites cellules
<b>Adénocarcinome</b> (environ 40%)	<b>Carcinome à petites cellules</b> (cellules en grains d'avoine)
<b>Carcinome épidermoïde</b> (25-30%)	<b>Carcinome mixte à petites et à grandes cellules</b> (cellules intermédiaires)
<b>Carcinome à grandes cellules indifférenciées</b> (10-15%)	<b>Carcinome mixte à petites cellules</b>
<b>Localisation</b> : dans n'importe quelle partie des poumons	<b>Localisation</b> : alvéoles, bronches, bronchioles, tissus de soutien des poumons

### I.2.3. Les bases de l'oncogenèse pulmonaire

Dans l'oncogenèse, les cellules subissent des anomalies moléculaires majeures telles que des mutations, des modifications épigénétiques, des pertes d'hétérozygotie, des phénomènes de translocations chromosomiques qui vont être à l'origine du processus d'oncogenèse. Ces modifications conduisent en effet à l'inhibition, l'induction ou l'activation aberrante de certaines protéines impliquées dans des processus cellulaires variés (prolifération

cellulaire, survie, apoptose, sénescence, migration...). Dans les cellules normales, il existe une balance entre les signaux de prolifération et ceux de mort cellulaire. Cette balance étant dérégulée dans les cellules tumorales, cela conduit donc à une prolifération non-contrôlée et à la formation de tumeur. Il existe des gènes dont la suractivation ou la surexpression induit une transformation des cellules, on parle alors d'oncogènes et à l'inverse les gènes qui inhibent ce phénomène sont appelés gènes suppresseurs de tumeurs. Dans les cancers bronchiques, ces deux catégories de gènes sont dérégulés afin d'induire l'apparition de tumeur (Fred et al., 2008 ; Sekido et al., 2003).

### **I.3. Le stress oxydatif et le cancer du poumon**

Le stress oxydatif induit un déséquilibre de l'état redox cellulaire qui a été trouvé d'être présent dans différentes cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales ; le déséquilibre redox peut être lié à une stimulation oncogénique (Valko et al., 2006).

#### **I.3.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans l'oncogénèse**

Les radicaux libres peuvent être définis comme des molécules ou fragments moléculaires contenant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui leur confère un degré considérable de réactivité. Ces radicaux dérivés de l'oxygène (ERO) représentent la plus importante classe de ces espèces générées dans les systèmes vivants. Ces ERO comprennent des radicaux tels que : l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ) ou le radical hydroxyle ( $HO^{\circ}$ ) et les espèces non radicalaires telles que: le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ).

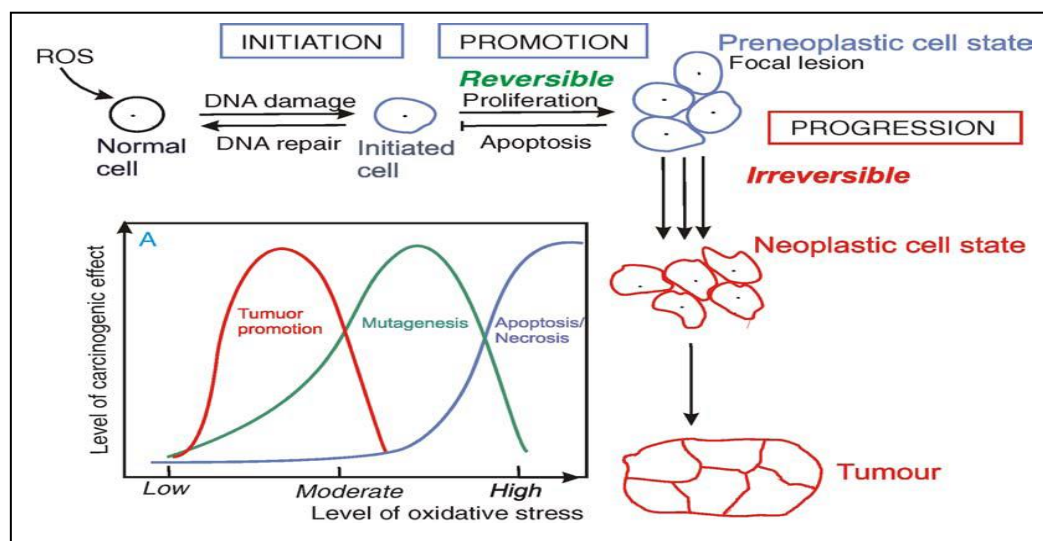
On parle de stress oxydatif lors d'une surproduction de ces espèces réactives (Valko et al., 2004).

Le benzopyrène (B(a)P), constituant important de la fumée du tabac, est un cancérigène pulmonaire bien connu, subit une activation métabolique générant des métabolites électrophiles capables de lier l'ADN mais également des métabolites capables de générer des espèces réactives de l'oxygène (DeMarini et al., 2001). Ces ERO sont générées lors du cycle redox des quinones, mais les cytochromes P450 (CYP) peuvent également en produire, au cours de leur activité catalytique (Baulig et al., 2003).

Les cancers broncho-pulmonaires comme tous les types de cancers épithéliaux, se développent selon un processus multi-étapes (Baldi et al., 2008) : initiation, promotion,

## Analyse bibliographique

progression (Adelin., 2009). Les ERO sont tumorigènes en vertu de leur capacité à augmenter la prolifération cellulaire, la migration, la survie, et en induisant des dommages de L'ADN, contribuent tous aux étapes de la cancérogenèse (Klaunig et al., 2004)



**Figure 3** : Les trois stades de la cancérogenèse et le niveau de l'effet carcinogène. le niveau des ERO à différent stades du processus de la cancérogenèse (Valko et al., 2006)

**Initiation** : cette étape correspond à la formation d'une lésion de l'ADN générée par une substance génotoxique endogène ou exogène, conduisant à la formation des mutations dont les conséquences dépendent des gènes touchés. Les gènes clés de la cancérogenèse aboutissant à la transformation cellulaire si mutés sont de 2 types :

- Les proto-oncogènes, activables en oncogène par mutation (ex : RAS, MYC).
- Les gènes suppresseurs de tumeurs (ex : p53, p21) (Adelin., 2009).

**La phase de promotion** : se caractérise par expansion clonale des cellules initiées, par l'induction de la prolifération cellulaire et/ou l'inhibition de la mort cellulaire programmée (l'apoptose) (Loft et Poulsen., 1996). Entraînant une accumulation des mutations (Adelin., 2009).

**Progression** : se caractérise par l'acquisition de nouvelles mutations avec l'accroissement du taux de division. Cette étape se caractérise également par des mécanismes d'invasion tumorale, et un mécanisme d'angiogénèse permettant d'irriguer la tumeur (Adelin., 2009).



L'émission d'ERO entraînant des cassures simples brins, double brins ainsi que des modifications au niveau des purines ou pyrimidines ou du désoxyribose (Klaunig et Kamendulis., 2004). L' $\text{OH}^\circ$  ainsi que d'autres ERO sont à l'origine de bases oxydées dont la 8-oxo-dGuo qui sont des mutagènes ( Adelin., 2009).

En plus d'avoir un rôle dans la phase d'initiation, le B(a)P a aussi un rôle dans la phase de promotion (Albert et *al.*, 1991). Les mécanismes de promotion sont mal connus (Penning et *al.*, 1996), mais la formation d'ERO pouvant avoir un effet sur la prolifération des cellules initiées (Cohen et Ellwein., 1990). Plusieurs récepteurs du facteur de croissance (EGF) sont touchés par les ERO, où une augmentation de l'expression de l'EGF et la surexpression de récepteurs de l'EGF a été observée dans les cancers du poumon et des voies urinaires (Dreves et *al.*, 2003).

### **I.3.2. La peroxydation lipidique (LPO)**

Les dommages induits par les ERO aux acides nucléiques, protéines, carbohydres et lipides, altèrent la fonction de ces molécules dans les cellules, tissus et organes (Fink et *al.*, 1997). Il est bien connu que la génération des ERO résulte en l'attaque non seulement de l'ADN, mais aussi d'autres composants cellulaires y compris les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides qui sont extrêmement sensibles à l'oxydation (Siems et *al.*, 1995).

Les ERO produits, attaquent aussi les acides gras polyinsaturés. Une fois formés, les radicaux libres peroxy ( $\text{ROO}^\circ$ ) peuvent être réorganisés via une réaction de cyclisation en un endoperoxyde (précurseur de malondialdéhyde) avec libération du produit final du processus de peroxydation, le malondialdéhyde (MDA) (Marnett., 1999).

Le produit aldéhydique majeur de la peroxydation lipidique autre que l'MDA est le 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Le MDA est mutagène chez les bactéries, les cellules mammifères et cancérigènes chez le rat. Le HNE est faiblement mutagène, mais semble être le principal produit toxique de la peroxydation lipidique (Stadtman, 2004). Les fréquences de mutation sont comparables avec celles rapportées par les 8-oxo-dGuo dans des systèmes similaires (Mao., 1999).

### **I.3.3. Le système de défense antioxydant**

L'effet des espèces réactives de l'oxygène est équilibré par l'action des antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. Ces défenses antioxydantes sont extrêmement importantes car elles représentent la suppression directe des radicaux libres, fournissant ainsi

une protection maximale des sites biologiques. Les antioxydants enzymatiques les plus efficaces impliquent la superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), et glutathion peroxydase (GPx) (Mates et al., 1999). Les antioxydants non-enzymatiques impliquent vitamine C, vitamine E, caroténoïdes, antioxydants thiols (glutathion), flavonoïdes naturels et d'autres composés (McCall et Frei., 1999). Il existe un lien entre les niveaux accrus d'ERO et la perturbation des activités des antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques dans les cellules tumorales (Valko et al., 2006).

### I.3.3.1. Antioxydants enzymatiques

#### ➤ La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD existe en plusieurs isoformes, à la différence dans la nature des centres métalliques actives ainsi que le nombre de leur sous unités, cofacteurs et d'autres caractéristiques. Chez les mammifères il y a trois formes de SOD : cytosolique Cu-Zn SOD, mitochondriale Mn-SOD et SOD extracellulaire (EC- SOD) (Landis et Tower., 2005).

La SOD est l'enzyme antioxydante qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en O<sub>2</sub> et l'espèce moins réactive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



La Mn-SOD semble être abaissée dans certaines cellules cancéreuses (Behrend et al., 2003). Pastor et al. (2003) pense que la Mn-SOD diminue la prolifération de la cellule cancéreuse par la réduction d'ERO.

#### ➤ La catalase (CAT)

La catalase est localisée dans des organites cellulaires appelées peroxysomes. Elle convertit efficacement le peroxyde d'hydrogène en O<sub>2</sub> et l'eau (H<sub>2</sub>O).



La diminution significative de la capacité de différentes tumeurs à détoxifier le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est liée à une diminution du taux de la catalase (Valko et al., 2006).

#### ➤ La glutathion peroxydase

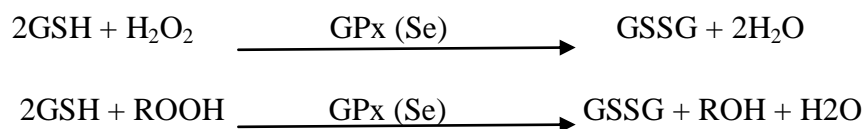
Il existe 2 formes du glutathion peroxydase, dont l'un est indépendant du sélénium (Se) (glutathion-s-transférase ; GST) tandis que l'autre est le sélénium-dépendant (GPx) (Mates et

## Analyse bibliographique

---

al., 1999). Les enzymes GPx sont connues d'ajouter deux électrons afin de réduire les peroxydes en forment des selenols (Se-OH).

GPx agit en conjonction avec la glutathion tripeptide (GSH), ou le substrat de la réaction catalytique est H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou un peroxyde organique ROOH, GPx décompose les peroxydes en H<sub>2</sub>O ou alcool tout en oxydant le GSH.



La GPx est la voie majeure de protection contre les niveaux faibles du stress oxydatif (Valko et al., 2006).

La famille d'enzyme GST est un système de défense cellulaire important, qui protège la cellule contre les dommages chimiques par la catalyse de la conjugaison des molécules électrophiles réactives avec le glutathion (Seidegard et al., 1988).

### I.3.3.2. Antioxydants non-enzymatiques

En plus du système enzymatique, la cellule peut disposer des molécules antioxydantes non-enzymatiques. Parmi celle-ci certaines sont y synthétisées comme le glutathion (GSH), ce dernier est un antioxydant non-enzymatique, intracellulaire multifonctionnel (Masella et al., 2005). La forme réduite est GSH, la forme oxydée est GSSG ; glutathion disulfide (Ji et al., 1999). En règle générale, la capacité antioxydante de composés thiols est due à l'atome de soufre qui peut facilement s'adapter à la perte d'un électron unique (Karoui et al., 1996). Le glutathion est un cofacteur de plusieurs enzymes de détoxification contre le stress oxydatif (GPx, GST). Il balaye le °OH et l<sup>°</sup>1O<sub>2</sub> directement, détoxifie le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et les peroxydes lipidiques, et génère les antioxydants, vitamine C et E à leur forme active (Jones et al., 2000). Le rapport GSH /GSSG est une bonne mesure du stress oxydatif des organismes (Hwang et al., 1992). Ce rapport est normalement > 90% à l'état physiologique (Rahman et MacNee., 1999). Le GSH /GSSG mesuré dans le sang des patients atteints du cancer de colon et sein a été diminué par rapport aux contrôles (Pastor et al., 2003). Bakar et al., (1997) ont proposé que la production accrue de peroxydes provoque une libération accrue du GSSG à partir de différents tissus. Dans les poumons le GSH apparait comme un mécanisme de défense fondamental contre les dommages pulmonaires induits par l'oxydation et l'inflammation (Rahman et MacNee., 1999).

## I.4. La mitochondrie source des ROS

La principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires (Balaban et al., 2005).

Les mitochondries sont les organites responsables de la plus grande partie de la production de l'énergie (sous forme d'ATP) nécessaire au fonctionnement cellulaire. Elles possèdent deux membranes délimitant un espace inter membranaire et un compartiment matriciel. La membrane externe, formée de 50% de protéines et 50% de lipides polaires, est perméable aux ions et aux petites molécules grâce entre autres à l'existence de porines. La membrane interne, quant à elle, est imperméable car elle est constituée pour 80% de protéines et 20% de lipides (Lieu et al., 2002).

La membrane interne est le siège de la respiration qui correspond à un transfert d'électrons à travers la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final : l'oxygène. Ces électrons proviennent des équivalents réduits  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  issus du catabolisme des nutriments (lipides, glucides). A ce flux d'électrons est associé un transfert actif de protons de la matrice vers l'espace inter membranaire générant une force, la force protomotrice (Mitchell., 1961).

### I.4.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

La phosphorylation oxydative est le processus de couplage entre le transfert d'électrons (oxydation) et la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique  $\text{P}_i$  (phosphorylation). Ce couplage n'est pas direct mais fait intervenir un intermédiaire énergétique, la force protomotrice qui est utilisée par l'ATP synthase. La chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes dont trois s'avèrent être des pompes à protons (Garcia et al., 2007)

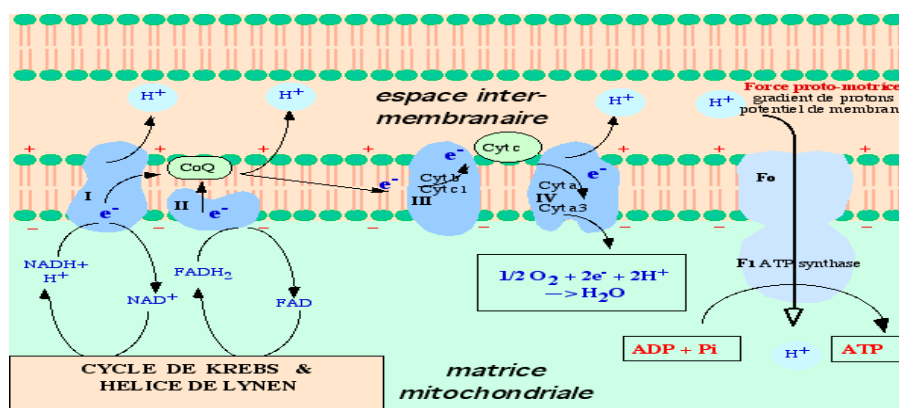
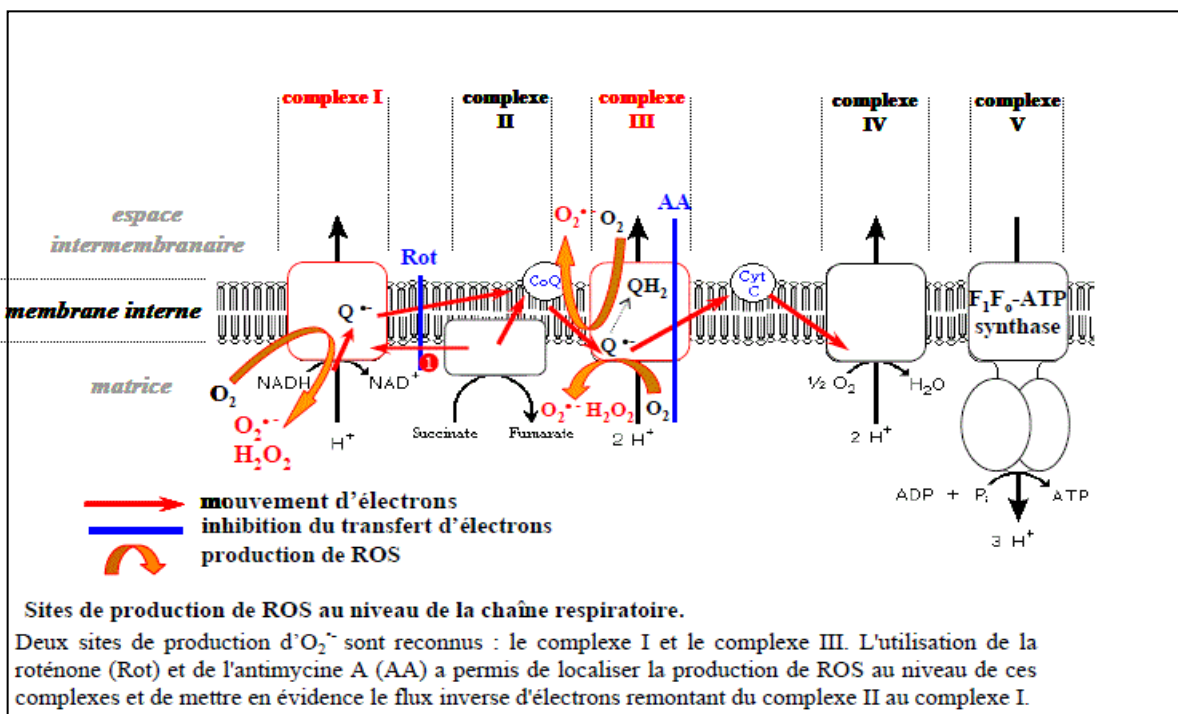


Figure 4 : La chaîne respiratoire mitochondriale (Garcia et al., 2007).

## I.4.2. La production de ROS

La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ROS (Boveris et al., 1972 ; Boveris et al., 1973). Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) (Hansford et al., 1997).

Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III (figure 5). La production de ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matricielle ainsi que dans l'espace intermembranaire (Chen et al., 2003 ; Han et al., 2003 ; St Pierre et al., 2002, Turrens., 2003).



**Figure 5:** Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire

(Chen et al., 2003).

## I.5. La mitochondrie cible des ROS

Si la mitochondrie est considérée comme l'une des principales sources de ROS intracellulaire, elle est surtout la principale cible. Les ROS peuvent avoir une action directe sur l'activité mitochondriale. Ainsi, l' $O_2^{\bullet-}$  peut réagir avec l'oxyde d'azote (NO), et produire le peroxynitrite ( $ONOO^{\bullet-}$ ) qui peut inhiber la chaîne respiratoire (Shiva., 2004) et endommager différents composants mitochondriaux (complexe de la chaîne respiratoire, membrane, ADN...). En effet, l'ADN mitochondrial (ADNmt) est à proximité directe de la source de production, du fait qu'il est fixé à la membrane interne. L'ADNmt est fragile car il est dépourvu d'histones et ne semble pas avoir de systèmes de réparation aussi efficaces que celui de l'ADN nucléaire (ADNn) (Bohr., 2002; Stevensner., 2002). Les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont codées en partie par l'ADNn et par l'ADNmt. Une altération de l'ADNmt pourrait donc altérer le fonctionnement de la chaîne respiratoire et déclencher un cercle vicieux augmentant la production de ROS et les dégâts oxydatifs mitochondriaux. De même, une oxydation accrue des phospholipides membranaires mitochondriaux pourrait modifier le fonctionnement mitochondrial ces dégâts oxydatifs conduisent la cellule à l'apoptose (Echtay., 2003).

L'apoptose est une forme « physiologique » de mort cellulaire, hautement régulée et qui est indispensable à la survie des organismes multicellulaires. Morphologiquement, l'apoptose correspond à une rétraction progressive de la cellule, avec condensation de la chromatine et du cytoplasme, suivie d'une fragmentation caractéristique de l'ADN aboutissant à la formation de fragments cellulaires ou corps apoptotiques. Les organites intracellulaires contenus dans les corps apoptotiques sont structurellement intacts. L'apoptose (du grec : chute des feuilles en automne, avec apo pour éloignement et ptose pour chute (pKerr, Wyllie et Currie., 1972).

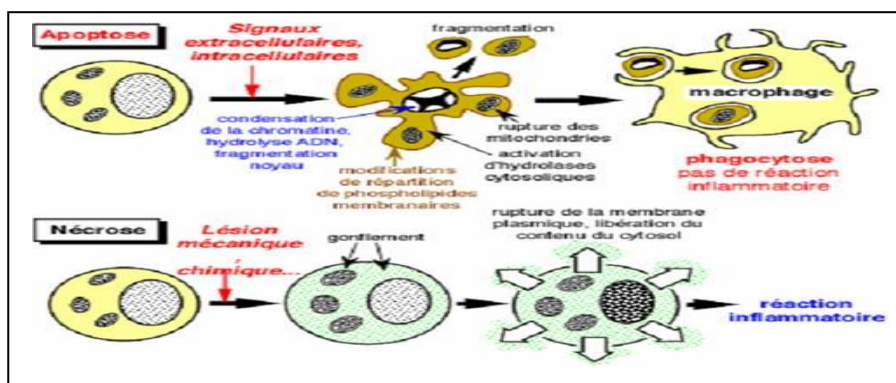


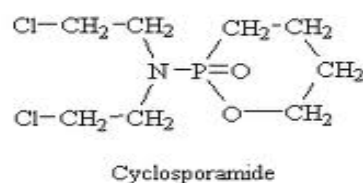
Figure 6 : les étapes du processus apoptotique ( Kerr JF et al., 1991)

### I.6. La chimiothérapie anti -cancer pulmonaire

La découverte des agents anticancéreux a le plus souvent été fortuite. C'est le cas des premiers agents mis évidence comme les moutardes azotées ou l'actinomycine D. Ces agents ont alors été identifiés pour leur toxicité médullaire chez l'animal, suggérant une activité antiproliférative. La plupart des agents anticancéreux inhibent des enzymes nécessaires à la synthèse d'ADN, c'est le cas des anti-métabolites, mais également des antracyclines. Les agents alkylants, cisplatine, la bléomycine, agissent durant l'ensemble des phases du cycle cellulaire. Les agents cycle-dépendants sont des molécules qui interagissent de façon covalente avec l'ADN, alors que les molécules phase-indépendants interagissent avec les enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN. Ces molécules ne sont pas dirigées sur une cible moléculaire spécifique de la cellule cancéreuse. Leur activité a été liée à une différence de cinétique de croissance entre les cellules cancéreuses et les cellules bénignes (Rixe., 2004).

#### I.6.1. Le cyclophosphamide (CP)

Le cyclophosphamide est un agent alkylant bifonctionnel cytotoxique, appartenant à la classe des moutardes azotées . Il est utilisé dans le rejet de greffes des organes et les maladies auto-immunes (Fiorucci et al., 2008). En chimiothérapie, le cyclophosphamide est utilisé comme un agent autonome ou en combinaison avec d'autres médicaments anticancéreux simultanément ou successivement (Younes., 2004 ; Fiorucci., 2008). En dépit de son large spectre d'utilisation clinique, il présente une toxicité grave pour les cellules normales, chez les humains et les animaux de laboratoire (Fraisier et al., 1991). Le cyclophosphamide est l'un des médicaments anticancéreux les plus toxiques du poumon en cours d'utilisation (Kehrer et Kacew., 1985). Les chances de l'induction de cancers secondaires chez les patients traités avec le cyclophosphamide en des conditions médicales différentes sont très élevées (Borgman et al., 2008).



**Figure 7 :** Structure du cyclophosphamide (Brock .,1983)

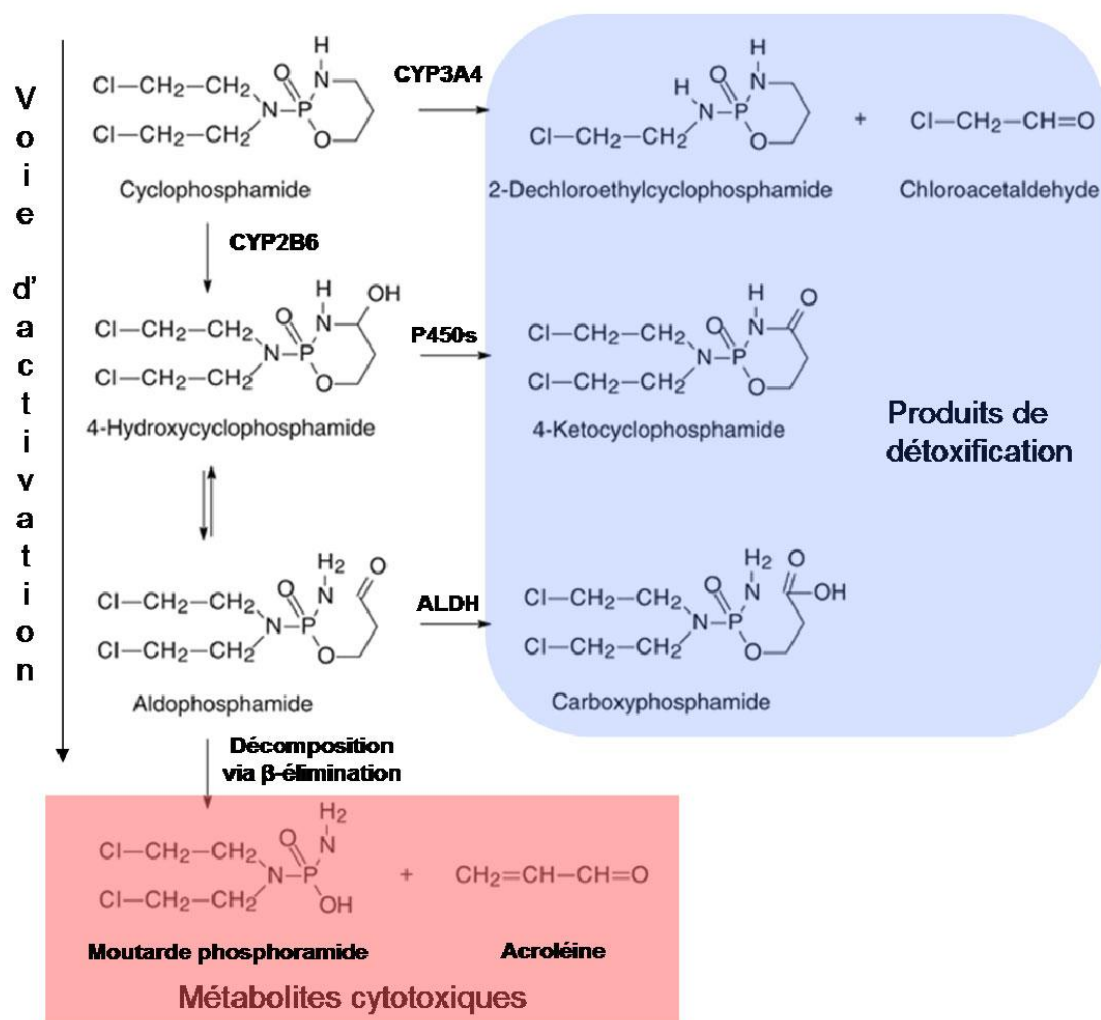
### I.6.2. Pharmacocinétique et métabolisme du cyclophosphamide

Le cyclophosphamide est administré par voie intraveineuse, ou par voie orale (Judith et April., 2007). Le médicament pris par voie orale est bien absorbé (97%). Les pics sanguins du CP dépend de la dose ; 500 micromoles pour 60mg/ kg (Clive et al., 1997). Le CP ne se lie pas significativement aux albumines du sérum (Bagley et al., 1993) et la demi-vie est variable allant de 2 à 10 heures (Friedman et al., 1976). Toutefois, les détails du transport cellulaire, et le mode d'action exacte du CP au niveau cellulaire ne sont pas complètement compris (Sensenbrenner et al., 1979).

Le cyclophosphamide est convertit dans le foie en des métabolites qui pourraient être transportés et absorbés par les tumeurs. Le 4-hydroxycyclophosphamide interconvertit rapidement avec son tautomère, l'aldophosphamide, il est probable que ces deux métabolites diffusent passivement des cellules hépatiques, rejoignent la circulation sanguine, puis pénètrent dans les autres cellules passivement (Klein et al., 2001). La plupart des métabolites (80% de 4-ketocyclophosphamide et de carboxycyclophosphamide) sont éliminés par la voie rénale (Boddy et Yule., 2000).

Le facteur important des effets thérapeutiques et toxiques du CP est l'exigence d'une activation métabolique par les systèmes oxydases à fonction mixte des CYP 450 microsomaux hépatiques (Sladek., 1988). Les principales voies du métabolisme du CP sont actuellement comprises et sont présentées dans la figure . L'étape initiale d'activation consiste en l'oxydation à fonction mixte microsomale de l'hétérocycle pour produire le 4-hydroxycyclophosphamide (4-OHCP) (Fenselau et al., 1977). Catalysée par CYP 2B6, 2C9, 3A4 (Klein et al., 2001). Takamizawa et al. ont démontrés également l'implication du CYP 2B1 dans la formation du 4-OHCP au niveau du foie. Le 4-OHCP est en équilibre spontanées avec son tautomère acyclique ; aldophosphamide (Fenselau et al., 1977) et l'existence d'une 3-5 exo-nucléase, qui clive le 4-OHCP a été démontré (Hobarst., 1981). L'aldophosphamide subit une réaction d'élimination spontanée (non-enzymatique) pour donner le phosphoramidate moutarde (PM) et l'acroléine (ACR) (Klein et al., 2001). Cependant, l'oxydation enzymatique du 4-OHCP en 4-ketocyclophosphamide (4-oxo-cyclophosphamide) et l'aldophosphamide en carboxycyclophosphamide (Block et al., 1979 ; Colvin et Hilton, 1981) est catalysée par l'aldéhyde déshydrogénase et l'aldéhyde oxydase respectivement (Connors et al., 1974). Alors que l'élimination d'une molécule d'eau du 4-OHCP produit l'iminocyclophosphamide (ICP) (Fei et al., 2010).





**Figure 8:** Métabolisme du cyclophosphamide (Roy, Yu et al.1999).

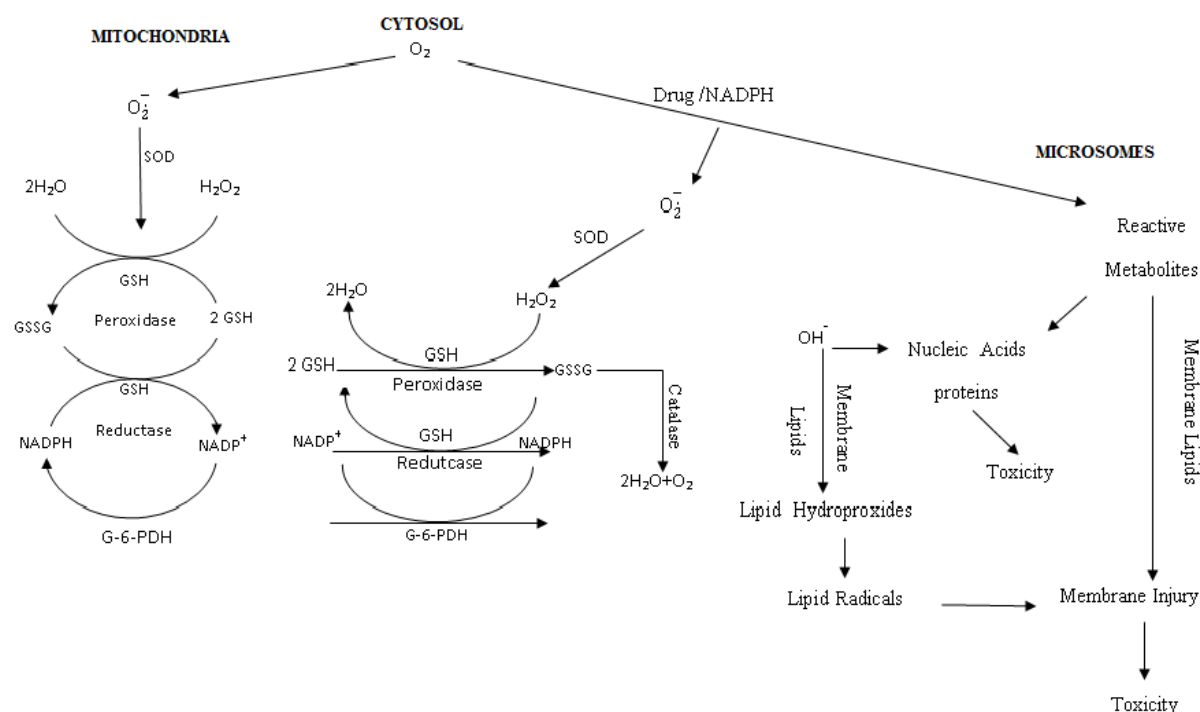
La majorité des CYPs sont exprimés dans les poumons humains (Nerbert et Dalton., 2006) en particulier le CYP 2B6 de la famille 2 qui a été détecté dans les cellules épithéliales bronchiques (Willey et *al.*, 1997), les pneumocytes de types II (Mori et al., 1996) et les macrophages alvéolaires (Raunio et *al.*, 1999). Celui-ci contribue à la bioactivation du cyclophosphamide par la 4-hydroxylation (Michael et Dohery., 2005). L'étude de Jolie et *al.* (2009) a signalée que la baisse de l'expression intratumorale du CYP 2B6 est probablement associée à la conversion intratumorale réduite du cyclophosphamide à des métabolites pharmacologiquement actifs.

En outre, le CP est métabolisé en ses métabolites alkylants par les poumons et les fractions des poumons intacts (Patal.,1990) et les microsomes du poumon (Patal et Block., 1985).

## I.6.3. Le cyclophosphamide et stress oxydatif

Considérant que les poumons sont dans un environnement riche en  $O_2$  et remplis de vaisseaux sanguins, ils sont donc très vulnérables aux dommages occasionnés par le stress oxydatif (Kirkham et Rahman., 2006). Les composés alkylants, incluant les drogues antinéoplasiques représentent un groupe significatif de médicaments, qui perturbent la balance pro-oxydant-antioxydant. L'un de ces médicaments est le cyclophosphamide qui est utilisé pour le traitement de plusieurs types de cancers dont le cancer à petite cellule pulmonaire (Bunn et Corney., 1997). Des observations suggèrent que le CP forme des métabolites réactifs, génère des ERO au cours de son métabolisme oxydatif, et déprime les mécanismes de défense antioxydants du poumon (Patel et Block., 1984 ; Patel et Block., 1985).

Les conséquences variables de blessure induit par les métabolites réactifs et les ERO des drogues pour différentes membranes cellulaires ainsi que les mécanismes de défense cellulaires sont illustrées dans la figure 9.



**Figure 9.** Les conséquences variables de blessure induit par les métabolites réactifs et les ERO des drogues pour différentes membranes cellulaires ainsi que les mécanismes de défense Cellulaires. (Patel., 1990)

L'acroléine (ACR), métabolite du CP, est un aldéhyde  $\alpha,\beta$ - insaturé très réactif, qui peut induire la formation des ERO;  $l'O_2$  et  $l'^\circ OH$  (Facchiretti et *al.*, 2007). Elle a aussi la capacité

de se lier à l'ADN et former des protéines adduites (Furuhata et *al.*, 2002). En inhibant la glutathion réductase, l'ACR empêche de régénérer la forme réduite du glutathion lorsque ce dernier est oxydé en dissulfide de glutathion (GSSG) (Nunoshiba et Yamamoto., 1999), épuisant ainsi la défense antioxydante (Yang et *al.*, 2004) et en augmentant le stress oxydatif (Luo et Shi., 2004). L'étude de Julie (2008) a démontrée que l'ACR induit une surproduction des ERO chez les cellules A 549 (cellule cancéreuse pulmonaire) en épuisant rapidement les antioxydants cellulaires, comme le GSH, empêchant ainsi la détoxification du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En outre, les médicaments cytotoxiques comme le CP peuvent causer des blessures peroxydatives et des altérations dans la structure et la fonction des membranes (Patel., 1990).

Les études *in vivo* (Patel et *al.*, 1984) et *in vitro* (Patel., 1987) de l'effet du CP et de son métabolites réactifs, l'ACR sur les microsomes du poumon de rats, ont démontrées une augmentation significative de peroxyde lipidique microsomale pulmonaire dans les microsomes traités par le CP et l'ACR, et que la peroxydation lipidique causée par le CP est supérieure à celle de l'ACR. La stimulation de la peroxydation des lipides microsomaux semble être médiée par les ERO ou les métabolites (Patel., 1987).

Comparées aux cellules normales, les cellules cancéreuses sont en état de stress oxydatif (Pelicano et *al.*, 2004). Il a été suggéré également qu'un stress intense peut aider les cellules cancéreuses à résister aux agents chimiothérapeutiques. En effet, un tel stress peut provoquer la peroxydation des lipides membranaires, ce qui amène à une génération d'aldéhydes capables d'inhiber l'apoptose (Cristea et Espoti., 2004). Certains agents chimio thérapeutiques agissent en induisant l'apoptose chez les cellules cancéreuses (ex : agents antinéoplasiques). Ce type de chimiothérapie pourrait donc tirer avantage d'un usage parallèle d'antioxydants (Pelicano et *al.*, 2004).

### **I.7. la phytothérapie pour le cancer de poumon**

La thérapeutique a développé plusieurs types de médicaments qui agissent en stoppant la prolifération excessive des cellules cancéreuses et interviennent à différents stades de développement des cancers : certains médicaments empêchent les cellules cancéreuses de se multiplier en bloquant leur division cellulaire, d'autres réorientent la cellule vers une « mort

naturelle », l'apoptose, d'autres inhibent la création de nouveaux vaisseaux destinés à alimenter la tumeur (néoangiogénèse). Parmi ces médicaments, certains sont obtenus par synthèse mais d'autres sont issus du règne végétal.

### I.7.1. Les plantes ayant un effet anti-tumorale

De nombreuses publications montrent des effets anticancéreux de plusieurs plantes chez l'animal ou sur cultures cellulaires aux différentes étapes des processus de cancérisation dans le poumon on peut citer :

Le curcuma, plante originaire de l'Inde (Hatcher et al., 2008 ; Kunnumakkara et al., 2008 ; Ichiki et al., 2000 ; Jagetia et al., 2008), le thé vert, Le théier est un arbuste originaire des forêts pluvieuses de l'Asie, (Ju et al., 2007 ; Khan N 2008., Khan N., 2010) ; Le chardon-marie est une plante herbacée du bassin méditerranéen et de l'Europe centrale (Yan et al., 2005 ; Mateen et al., 2010 ; Tyagi et al., 2009), *Platycodon grandiflorum* (Campanulaceae), *Morus alba* (Moraceae), *Prunus armeniaca* (Rosaceae), *Rhus verniciflua* (Anacardiaceae), *Perilla frutescens* (Labiatae), *Stemona japonica* (Stemonaceae), *Tussilago farfara* (Compositae), *Draba nemorosa* (Brassicaceae) (Broker et al., 2002 ; Liang et a., 2011), *Yucca aloifolia* (Sokoloff., 1968), *Undaria pinnatifida* (Furusawa et al., 1985 ; Furusawa et al., 1989 ; Furusawa et al., 1990), *Semecarpus anacardium* (Chitnis., 1980), *Ervatamia heyneana* (Chitnis et al., 1979), *Eleutherococcus senticosus* (Dzhioev., 1965 ; Yun et al., 1980), *Panax ginseng* (Yun et al., 1993) *Calamus rotang* (Dhar et al 1968), *Tagetes minuta* (Ickes et al., 1973), *Maytenus serrata* (Kupchan et al., 1972), *Chlorella vulgaris* (Noda et al., 1998), *Cladonia leptoclada* (Kupchan et al., 1975), *Croton macrostachys* (Kupchan., 1968), *Euphorbia esula* (Farnsworth et al., 1968 ; Kupchan et al., 1976) *Euphorbia fischeriana* (Shentu et al., 1984) *Euphorbia ingens* (Charlson., 1980 ; Kupchan., 1970), *Jatropha gossypifolia* (Perdue., 1982), *Cassia garrettiana* (Kimura., 2000), *Sophora flavescens* (Yang., 1983), *Sutherlandia frutescens* (Charlson., 1980), *Ganoderma lucidum* ((Furusawa, et al., 1992 ; Kimura., 2000 ; Lee et al., 1995 ; Min et al., 2002), *Pelargonium graveolens* (Yang et al., 1983), *Phellinus linteus* (Han et al., 1999), *Allium sativum* (Kyo et al., 1998 ; 1999) *Viscum album* (A.M.Burger et al., 2001 ; Bradley et al., 1989 ; Khwaja et al., 1986), *Thespesia populnea* (Dhar et al., 1968), *Hibiscus syriacus* (Cheng et al., 2008), *Memecylon umbellatum* (Dhar et al., 1968), *Mirabilis multiflora* (A. Ulubelen et al 1966), *Nyssa sylvatica* (Perdue et al., 1970), *Lophira lanceolata* (Persinos et al., 1967) *Oscillatoria acutissima* (Barchi et al., 1984), *Chelidonium majus* (Staniszewski et al., 1992), *Nigella sativa* (Dhar et al., 1968 ; Kumara., 2001), *Morinda citrifolia* (Hirazumi et al., 1996), *Bruguiera sexangula* (Loder et

## Analyse bibliographique

---

al., 1969), *Schisandra propinqua* (Liu et al., 1988) , *Brucea javanica* ( Wang et al.,1995 ; Hu et al., 1991 ; Su., 1985), *Withania somnifera* (Singh et al., 1979 ; Mishra et al., 2000), *Camellia sinensis* (Brown., 1999 ; Yang et al., 1997 ), *Hypsizygus marmoreus* (Saitoh et al., 1997), *Lentinus edodes* (Nanba et al., 1987), *Viola odorata* (Charlson., 1980).

### **I.7.2. *Ferula vesceritensis***

#### **I.7.2.1. Présentation de la plante**

Le genre *Ferula* ( famille Apiaceae) comprend 130 espèces, qui sont répandu dans toute l'Asie centrale et autour des régions Méditerranées. Plusieurs espèces ont été utilisées dans les aliments traditionnels et dans la médecine populaire comme traitement des troubles neurologiques (tranquillisant, antihystérique), dysenterie, troubles digestifs, rhumatismes, maux de tête, arthrite et vertiges (Tamemoto et al., 2001).

**Position botanique de *Ferula vesceritensis*** (Quezel et Santa, 1963 ; Dupont et Guignard, 2007)

Embranchement	Spermatophytes
Classe	Eudicots
Ordre	Apiales
Famille	<i>Apiaceae</i>
Genre	<i>Ferula</i>
Espèce	<i>Ferula vesceritensis</i> .
Noms	vernaculaires Kalkha (Quezel et Santa, 1963).

#### **I.7.2.2. Description botanique de *Ferula vesceritensis***

Elle a une taille supérieure à 1 mètre. En été, elle n'est représentée que par une rigide tige creuse. Feuilles à divisions allongées, droites. Fleurs vertes, à pétales larges portants des poils sur leurs nervures dorsales. Fruits ovales, à sommets pointus et portés par des pédoncules plus courts qu'eux (Ozenda, 1991 ; Quezel et Santa, 1963).



**Figure 10** : photos de *Ferulla vescenteris*

### **I.7.2.3 Répartition géographique**

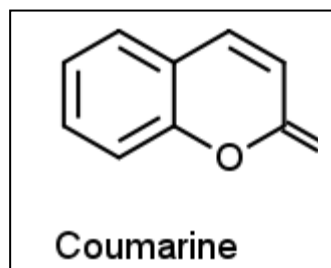
Cette espèce se retrouve dans la partie orientale de l'atlas saharien, et du Sahara septentrional. C'est une plante saharienne endémique (Quezel et Santa, 1963). *Ferula vescenteris* est indigène au Sahara algérien (Ozenda, 1983).

### **I.7.2.4. Utilisations traditionnelles de *Ferula vescenteris***

Les fruits de *F. vescenteris* (Kalkha ) sont utilisés en médecine traditionnelle comme infusion pour traiter les maux de tête (la migraine), la fièvre, les infections de la gorge, les angines et des migraines (Chehma, 2006 ; Ahmed et al 2007), le cancer et les maladies inflammatoires (Oughlissi-dehak *et al.*, 2008 ; Amira *et al.*, 2010 ; Zellagui *et al.*, 2012). Selon certaines personnes âgées interrogées sur l'utilisation en médecine traditionnelle de cette plante, elle est surtout utilisée pour prévenir la chute de cheveux.

### **I.7.2.5. Le ferulénol , un coumarine extrait de *Ferula***

Les coumarines sont des composés aromatiques naturels, portant un groupement benzopyrone dans leur structure (figure 11). La nomenclature internationale est le 2H-benzopyran-2-one, qui peut être considérée en première approximation comme une lactone de l'acide 2-hydroxy-Z-cinnamique (J. Bruneton, 1999).

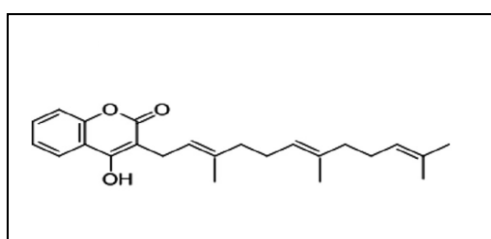


**Figure 11** : structure chimique d'une coumarine (J. Bruneton, 1999).

Les coumarines et leurs dérivées sont connues pour leurs nombreuses utilisations dans l'industrie des cosmétiques (comme additifs), l'industrie pharmaceutique et agro-chimique (S. Sudha et al 2008). Elles possèdent diverses propriétés biologiques, elles sont utilisées comme agents anti coagulants et sont très fluorescentes, elles sont employées aussi dans la préparation des insecticides (Li et al., 1998 ; Bahekar et al., 2004).

La majorité des coumarines et leurs dérivées ont été soumises à de profondes investigations dans le but d'évaluer leurs effets sur la santé humaine, les recherches ont montré qu'elles peuvent être des agents anti HIV, anti tumoraux (Miyake et al 1999), anticancéreux, antimicrobiens (Sashidhara et al., 2010), anti-inflammatoires (Curini et al., 2010) .

Parmi les coumarines prénylées , le ferulénol, un dérivé de 4-hydroxycoumarine (Carboni et al., 1964 ; Appendino et al., 1988) (Fig.1). C'est un chimiotype toxique, extrait de *Ferula communis* L, associé au syndrome hémorragique (Benkhalti et Lamnaouer., 1994; Sacchetti et al., 2003).



**Figure 12** : structure chimique du férulénol

plusieurs études ont déjà prouvé l'effet cytotoxique du ferulénol, citons:

- l'altération de la biosynthèse des facteurs de coagulation induite par le ferulénol (M. Monti et al ., 2007),

## Analyse bibliographique

---

- l' inhibition du VKORC1, une enzyme essentielle au recyclage de la vitamine K. Cette dernière est impliquée dans l'activation des facteurs de coagulation II, VII, IX, X. L'effet inhibiteur du ferulénol sur VKORC1 a été montré chez le rat (Louvet et al., 2015).
- Le ferulénol a un double effet sur les fonctions mitochondriales en fonction de la concentration. À de faibles concentrations, le ferulénol inhibe la synthèse de l'ATP, à des concentrations plus élevées, le ferulénol inhibe la consommation d'oxygène (Lahouel et al 2007).



# **Matériel et méthodes**

Ce travail de thèse repose sur deux protocoles expérimentaux. La première étude évalue l'effet toxique du ferulénol sur le foie et la réparation de cette toxicité par la propolis. L'analyse des résultats de l'étude I a permis de définir l'étude II. Ainsi l'étude II, s'intéresse à l'évaluation de l'effet pro oxydant du ferulénol seul puis associé au phénobarbital, sur les cellules cancéreuses et saines du rat.

L'étude est menée chez des rats Wistar Albinos males, pesant environ 200 g, fournis par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie). Ils sont répartis en 6 rats par lot et sont maintenus dans des cages en plastiques, à une température ambiante de 20° à 25, avec un cycle jour/nuit ; 12h/12h en ayant accès libre à l'eau et à la nourriture composée d'ingrédients naturels préparés commercialement sous forme de croquettes. Les rats sont mis en quarantaine 10 jours avant leur utilisation.

## II.1. Etude I

### II.1.1. Extraction et isolement du Ferulénol

Les racines de *Ferula vesceritensis*, ont été recueillies à Ghardaya, en mois de mars, et ont été identifiées par le Prof. Dr. M. Kaabache du Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Ferhat Abbass, Setif. Un spécimen de référence (RS / 80) a été conservé pour référence. Environ 1,5 kg des racines en poudre séchées à l'air a été macéré dans un mélange de dichlorométhane et le méthanol à température ambiante pendant 48 h et a donné 30 g d'huile visqueuse. Cet extrait a été préfractionné sur une colonne de gel de silice éluée avec du n-hexane contenant des quantités croissantes de dichlorométhane.

La fraction (chlorure de n-hexane-méthylène, 1:1) comprenait plusieurs composés qui ont ensuite été séparés par la chromatographie sur colonne de gel de silice (n-hexane-chlorure de méthylène-méthanol, 7: 4: 1).

Le ferulénol (70 mg) a ensuite été purifié par Chromatographie sur couche mince développée dans du n-hexane- éther diéthyl (1: 2) sur des feuilles d'aluminium de 0,2 mm de gel de silice.

La structure du ferulénol a été confirmée par le Spectre RMN H (250 MHz) Lahouel et al (2007).

### **II.1.2. préparation de l'extrait brut de la propolis**

La propolis (cire d'abeille et résines collectées par l'abeille à partir de plantes, en particulier de fleurs et de bourgeons à feuilles) a été obtenue auprès des apiculteurs de l'Apical de Kaous, Jijel (Est de l'Algérie) en mai-avril. L'échantillon, une fois reçu, a été conservé à 4 °C dans des récipients en plastique hermétiques / opaque jusqu'à l'analyse.

L'extrait de propolis a été obtenu en utilisant de l'éthanol et du méthanol. La propolis est coupée en petits morceaux; macérée dans l'alcool à 95 ° pendant 15 jours, filtré puis évaporé à 80 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (évaporateur E100). Le résidu a été repris en utilisant le méthanol 70 ° et a été laissé macérer pendant une nuit. Après évaporation du solvant, l'extrait produit est appelé: extrait brut ou extrait éthanolique (EEP) de la propolis.

Le taux de flavonoïdes a été déterminé avec la méthode AlCl<sub>3</sub> comme décrit par Bankova et Marcucci (2000). Ensuite, les concentrations de l'extrait de la propolis sont exprimées en équivalent de la quercétine de concentration (10<sup>-4</sup> M). Les flavonoïdes et autres acides phénoliques dans l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) ont été analysés par Chromatographie liquide à haute performance . détection de réseaux de diodes (RP-HPLCDAD).

Les composés phénoliques dans EEP à une concentration de 10 mg / mL ont été séparés sur une Colonne analytique Nucleodur, 250 mm x 4,6 mm (Machery-Nagel, Duren, Allemagne) emballé avec phase stationnaire C18, avec une taille de particule de 5 mm. Un gradient linéaire binaire a été utilisé. La durée de l'analyse HPLC était de plus de 70 minutes. Mobile binaire la phase consistait en un solvant A (acide trifluoroacétique 0,01%) et un solvant B (acétonitrile). La séparation a été obtenue en utilisant un gradient commençant à 10% de B jusqu'à 10 min; 10-50 min B augmenté à 50% et maintenu constant jusqu'à 15 min; 65-70 min B augmenté à 100% et maintenu constant jusqu'à 10 min; successivement, le solvant B a atteint 10% rééquilibrer la colonne (lavage).

L'analyse de l'extrait éthanolique de propolis (EEP) a été réalisée par capillarité GC-MS (GCMS-QP 2010, Shimadzu, Japon). Les composés ont été caractérisés par comparaison avec les recherches dans la bibliothèque. Le taux de flavonoïdes a été déterminé par la réactivité avec chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) comme décrit par Bankova et Marcucci (Bankova, V et al., 2000). Alors, la concentration de flavonoïdes totaux dans l'extrait de propolis a été exprimée en milligrammes d'équivalents de quercétine (QE) par gramme de poids sec d'extrait de propolis (DWPE), en utilisant l'équation linéaire suivante:

$$\text{Flavoin concentration (QE/g DWPE)} = \frac{\text{Absorbance}}{\epsilon} \times M \times V \times \left(\frac{d}{w}\right)$$

$\epsilon$ : Coefficient d'extinction molaire de la quercétine; M: masse molaire de la quercétine; d: dilution facteur; w: poids de l'extrait de propolis.

### II.1.3. Isolement des mitochondries du foie de rat

Les mitochondries ont été extraites d'un homogénat de foie de rat par centrifugation différentielle (Rustin, P., 1994). Des rats (mâles Wistar, pesant 280-300 g) ont été tués par décapitation et le foie est enlevé et rapidement placé dans un bain de glace.

Le foie est jeté dans un milieu d'isolement glacé (Tris 20 mM, Sucrose 250 mM, EGTA 2 mM et MgCl<sub>2</sub> 5mM, pH 7,2 à 4°C), puis homogénié en utilisant un homogénéisateur PotterElvehjem.

L'isolement des mitochondries a été effectué à 4°C, utilisant des centrifugations différentielles. L'homogénat a été centrifugé à 2000 g pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires et les noyaux, puis les mitochondries ont été séparés du surnageant par centrifugation à 12 000 g pendant 5 min. Le culot (mitochondrie) issu de cette dernière centrifugation était lavé et remis en suspension dans un tampon respiratoire (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, saccharose 200 mM, pH 7,2 à 25°C) pour mesurer les activités mitochondriales. La concentration en protéines était déterminée par la méthode de Lowry (Lowry, O., 1975)

## II.1.4. dosage des paramètres mitochondrial

### II.1.4.1. Mesure de la respiration mitochondriale et du gonflement

La consommation d'O<sub>2</sub> a été mesurée par une microélectrode à oxygène de type Clark (Eurosep Instruments) dans une chambre thermostatée. Des mitochondries (1 mg) ont été ajoutées à 1 mL de tampon phosphate (saccharose 250 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM) pH 7,2 à 25 ° C) comprenant 2 uM de roténone. La respiration mitochondriale a été initiée par l'ajout de succinate (Concentration finale 6 mM), et la phosphorylation oxydative a été initiée par addition d'adénosine di-phosphate (ADP) à une concentration finale de 0,2 mM. l'enregistrements de consommation d'O<sub>2</sub> nous a permis le calcul de : V<sub>2</sub> , le taux d'état 2 (respiration basale), V<sub>3</sub>, le taux de respiration de l'état 3 (stimulé par l'ADP), V<sub>4</sub> , le taux de respiration de l'état 4 (non-ADP stimulated) et du rapport de contrôle respiratoire (RCR = V<sub>3</sub> / V<sub>4</sub>).

Le Gonflement mitochondrial a été évaluée en mesurant la diminution de l'absorbance à 520 nm en utilisant un spectrophotomètre Jasco modèle V-530 d'une suspension de mitochondries sous tension selon Bernardi et al. (Bernardi, P., 1993)

### II.1.4.2. Surveillance optique du potentiel membranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondrial ( $\Delta\Psi$ ) a été évalué par l'absorption de rhodamine 123, qui s'accumule électrophorétiquement en mitochondries sous tension en réponse à leur potentiel membranaire négatif-intérieur (Emaus, R., 1986). Le balayage de fluorescence de la rhodamine 123 a été surveillée en utilisant un spectromètre de fluorescence Perkin-Elmer SA LS 50B. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient de 503 (largeur de fente 3.0) et de 527 nm (largeur de fente 2,5), respectivement. Des expériences ont été réalisées dans 1,8 ml du tampon phosphate comprenant 2 uM de roténone et 0,3 uM de rhodamine 23. Après 30 sec d'incubation, des mitochondries (0,5 mg / mL) ont été ajoutées. Ceci a été suivi par l'addition de succinate 6 mM. L'absorption massive de rhodamine 123 a provoqué l'auto-extinction et un signal réduit. Par conséquent, lorsque le potentiel de la membrane mitochondriale a augmenté, l'intensité de la fluorescence a diminué. Changements relatifs de la membrane potentielle ont été exprimés en unités de fluorescence arbitraires.

## II.2. Etude II

Afin d'étudier l'effet pro-oxydant du ferulénol et des médicaments anticancéreux en association à l'activateur enzymatique, phénobarbital, sur cellule cancéreuse et cellules saines de poumon, on a procédé à l'induction du cancer pulmonaire, avant d'effectuer l'administration des différents produits de l'étude.

### II.2.1. Induction de la Pathologie Expérimentale : Cancer de Poumon

L'induction chimique d'un model de Cancer Broncho-pulmonaire a été réalisé sur des rats Wistar Albinos males par injection intra-péritonéale (IP) d'une suspension contenant 200mg/kg de Benzo(a)pyrène B(a)P, véhiculé dans 1 ml de l'huile d'olive (Likhachev et al., 1992).

### II.2.2. Traitement des Animaux par le Cyclophosphamides (CP), le férulénol (FR) et le phénobarbital (PB)

Dans cette étude, les rats ont été traité par du CP à une dose unique intraveineuse (IV) de 80 mg /kg et avec un coumarine pur à une dose de 50 mg/kg par voie orale, aussi bien qu'une association des deux à l'activateur enzymatique, le phénobarbital, à une dose de 2,5mg /kg après un délai de 16 semaines du début de l'induction de la pathologie, durée suffisante pour le développement d'un Cancer Broncho-Pulmonaire.

### II.2.3. Groupes Expérimentaux

Les rats ont été répartis en 6 groupes pour l'étude de la cellule cancéreuse, et 5 groupes pour l'étude de la cellule saine. Chaque groupe contient 6 animaux :

#### II.2.3.1. Groupes recevant le B(a)P (induction du cancer broncho-pulmonaire)

**Groupe 1 : Témoins (T) :** animaux recevant une dose unique IP de 1 ml de l'huile d'olive (véhicule 1). Après 16 semaines, ils recevaient 1 ml de l'eau stérile (véhicule 2) en une injection unique IV et 2 ml de l'eau distillée par voie orale chaque jour pendant 5 jours (véhicule 3).

**Groupe 2 : Benzo(a)pyrène (B(a)P) :** animaux recevant une seule injection d'une suspension de 200 mg /kg de B(a)P dissout dans 1 ml d'huile d'olive par voie IP. Après 16

semaines, ils recevaient 1 ml du véhicule 2 en une injection unique IV et 2 ml du véhicule 3 per os.

**Groupe 3 : Benzopyrène cyclophosphamide (B(a)P-CP) :** animaux recevant une dose unique du B(a)P (200 mg/kg) dans 1 ml de l'huile d'olive. Après 16 semaines, les animaux ont été traités avec une dose unique du CP de 80 mg/kg par voie IV et 2 ml du véhicule 3 per os chaque jour pendant 5 jours.

**Groupe 4 : Benzopyrène férulenol (B(a)P-FR) :** animaux recevant une dose unique IP d'une suspension de 200 mg/kg de B(a)P dans 1ml d'huile d'olive. Après 16 semaines, ils recevaient une dose de 50 mg/kg du FR per os chaque jour pendant 5 jours et 1 ml de l'eau stérile.

**Groupe 5 : Benzopyrène-Cyclophosphamide-phénobarbital (B(a)P-CP-PB) :** animaux recevant une dose unique du B(a)P (200 mg/kg) dans 1 ml de l'huile d'olive. Après 16 semaines, les animaux sont co-traités par le CP (comme le groupe 3) en association avec le phénobarbital au cours de 1<sup>er</sup> jour, le traitement avec le phénobarbital a été suivi jusqu'aux 5<sup>ème</sup> jours.

**Groupe 6 : Benzopyrène-féruléol-phénobarbital (B(a)P-FR-PB) :** animaux recevant une dose unique IP de 1 ml de l'huile d'olive. Après 16 semaines, ils recevaient 1 ml de véhicule 2 et 2 ml de féruléol à une dose unique de 50 mg/kg per os pour le 1<sup>er</sup> jour, puis le traitement par le phénobarbital a été suivi jusqu'aux 5<sup>ème</sup> jours.

Les rats consacrés pour l'étude des cellules saines, ont été répartis et traité de la même manière, un lot été éliminé dans cette étude, c'est celui du B(a)P.

#### **II.2.4. Prélèvement des poumons**

Tous les animaux ont été sacrifiés après anesthésie par l'éther, deux semaines après l'administration du cyclophosphamide, du Férulenol et du phénobarbital correspondant à une durée totale d'étude (induction du cancer + administration du B(a)P, Féru et Phéno) de 18 semaines.

Après le sacrifice, chaque poumon a été collecté, lavé à plusieurs reprises dans le NaCl 9‰ et imbibé en papier buvard pour débarrasser les poumons du sang, puis soumis à un examen macroscopique à la recherche d'éventuels signes d'inflammation ou de cancérisation. Ainsi, les poumons droits sont stockés à - 40 °C jusqu'à l'évaluation du stress oxydatif cellulaire et les poumons gauches sont fixés dans le formol 10% pour l'étude histopathologique.

## **II.2.5. Evaluation du statut oxydatif au niveau de la mitochondrie pulmonaire**

### **II.2.5.1. préparation des mitochondries pulmonaires**

L'isolement des mitochondries est basé sur le principe de centrifugation différentielle. Toutes les opérations se déroulent à 4°C. Après plusieurs rinçages dans du tampon d'isolement (sucrose 250 mM, Tris base 20 mM, EGTA 10 mM), les tissus sont broyés dans un potter en verre avec un piston en Téflon. Les homogénats sont débarrassés des noyaux et débris cellulaires par une centrifugation à 800 g pendant 10 minutes. Le surnageant est alors filtré et centrifugé à 8000 g pendant 10 minutes. Le culot mitochondrial ainsi obtenu est ensuite remis en suspension dans du tampon d'isolement puis centrifugé à nouveau à 8000 g pendant 10 minutes. Un dernier rinçage identique est effectué, et le culot est finalement resuspendu dans le tampon d'isolement. Après avoir déterminé la quantité de protéine, par la méthode de Bradford avec l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard, la concentration en protéines mitochondriales est ajustée à 20 mg/mL ((Willet et al., 2000).

### **II.2.5.2. préparation de la fraction cytosolique des cellules pulmonaires**

Quand les poumons sont prélevés, on les jette rapidement dans le tampon phosphate contenant du kcl, ils sont pesés, puis coupé en petits morceaux, avant d'être potterisé dans 9 ml du tampon phosphate (0,1M, PH=7,2). La potterisation est faite par un homogénéiseur de DOUNCE. L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 3700 t/mn pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant ainsi obtenu est centrifugé à 3700 t/mn pendant 45 minutes à 4°C. Le surnageant issu de cette dernière centrifugation est le cytosol qui est utilisé pour les différents dosages. (Bruneton j, 1993)



### **II.2.5.3. Dosages mitochondrial et cytosolique**

Dans la présente étude on a mesuré les taux de l'anion superoxyde  $O_2^\circ$ , du MDA, du gonflement, dans la mitochondrie ainsi que l'activité de la catalase et la concentration de la GSH dans le cytosol.

#### **II.2.5.3.1. Mesure de la production de l'anion superoxyde par les mitochondries**

La production des radicaux libres par les mitochondries peut être suivie par la mesure de la production de l'anion superoxyde, qui est le principal radical libre généré par la mitochondrie notamment par les complexe I et III de la chaîne respiratoire. Elle est basée sur l'aptitude de l'anion superoxyde à réduire le nitrobleutétrazolium (NBT) en monoformazan qui absorbe à 560 nm. Pour le dosage, nous avons suivi la méthode décrite par (Ligeret et al., 2004).

Dans un volume final de 1.2 ml de tampon respirant (50 mM Sucrose, 5mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.2), nous avons introduit 2 mg/ml de mitochondries, 1.2 $\mu$ l de cyclosporine à 1 $\mu$ M et 12 $\mu$ l du NBT à 100 mM. Après une minute d'incubation, nous avons additionné 7.2 $\mu$ l de succinate (6  $\mu$ M) comme substrat du complexe II de la chaîne respiratoire. Les variations de l'absorbance sont suivies à 560 nm pendant 5 minutes.

La cyclosporine A inhibe l'apoptose par inhibition de l'ouverture du pore de transition de perméabilité. La roténone à 1 $\mu$ M est ajoutée dans le tampon respirant juste avant le dosage et permet d'évaluer l'importance du complexe III dans la production des ROS.

#### **II.2.5.3.2. Mesure du taux de gonflement mitochondrial**

Les changements du statut de la perméabilité mitochondriale ont été évalués par la méthode décrite par Kristal (Kristal et al., 1996). Le gonflement mitochondrial est évalué en mesurant la décroissance de l'absorbance de la suspension mitochondriale à 540 nm.

Dans un volume final de 1.8 ml du tampon respirant (250mM Sucrose, 5mM  $KH_2PO_4$ , pH7.2) supplémenté par de la roténone à 1 $\mu$ M, nous avons introduit 0,2 mg/ml de mitochondrie. Après une minute d'incubation, 2.25 $\mu$ l de  $CaCl_2$  (100 $\mu$ M) sont ajoutés pour induire le gonflement mitochondrial par ouverture du pore de transition de perméabilité. La réaction est déclenchée par addition de 10.8  $\mu$ l de succinate à 6mM. La décroissance de l'absorbance est suivie pendant 5 minutes à 540 nm.

### II.2.5.3.3. Mesure du taux du Malon dialdéhyde mitochondrial (MDA)

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médié par les radicaux libres. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C) entre le MDA et deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol. Le MDA est l'un des biomarqueurs fiable de l'oxydation des membranes cellulaire et mitochondriale car c'est l'un des produits terminaux de la lipoperoxydation.

Le principe de la méthode repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100 °C) entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) d'un complexe chromogène de couleur rose absorbant la lumière à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol. (Ohkawa H et al., 1979) .

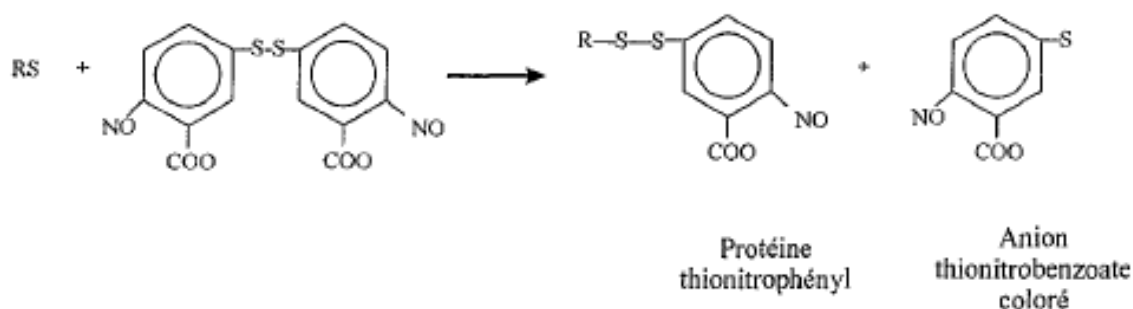
À 0,5 ml de la fraction cytosolique du poumon, 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 532 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée.

Le taux de MDA est déduit à partir d'une courbe d'étalonnage réalisé à partir du 1,1,3,3-tétraéthoxypropane qui lors de son hydrolyse acide libère du MDA.

L'activité du MDA est exprimée en nmole/gramme de tissu pulmonaire.

### II.5. 3.3.4. Mesure de la concentration du Glutathion réduit cytosolique (GSH)

Le niveau de glutathion a été estimé dans le cytosol des poumons spectrophotométriquement par le 5-5'-DiThiobis (2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) réduit par les groupements -SH en libérant l'acide thionitrobenzoïque (TNB), un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à  $\lambda = 412$  nm (Ellman, 1959)

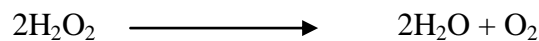


50 µl du cytosol sont additionnés à 10 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH=8. Prélever 3 ml du mélange à qui on a ajouté 20 µl d'une solution de DTNB 0,01 M (dissoudre dans le méthanol absolu). Après 15 min d'incubation à la température ambiante, l'absorbance du mélange réactionnel a été lue contre un blanc de réactif à 412 nm dans un spectrophotomètre (UV-1800 SHIMAD). Les concentrations du GSH sont exprimées en nmol/g du poumon. Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon de GSH préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

#### II.2.3.3.5. Dosage de l'activité enzymatique de la catalase

Le cytosol (sources enzymatiques) est récupéré afin de doser l'activité enzymatique de la catalase.

L'activité de la catalase est déterminée par la méthode de « Clairbone, 1985 ». Le dosage spectrophotométrique est basé sur la disparition de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 240 nm pendant 2 min.



La quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposé est directement proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme.

1ml de tampon phosphate KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, pH=7,2 est additionné à 0,95 ml de peroxyde d'hydrogène 0,019 M et 25 µl de la source enzymatique, puis l'absorbance a été mesurée par le spectrophotomètre.

La cinétique de la catalase n'obéissant pas au model Michaelien, on n'a pas utilisé la loi de Beer-Lambert. La constante de vitesse de la catalase est définie par la relation:

$$K = 2.3 / \Delta t \times \log_{10} ( DO_0 / DO_t )$$

L'activité enzymatique est exprimée en en unités UI/g de protéines.

DO<sub>0</sub> : absorbance à 0 min

DO<sub>t</sub> : absorbance au moment "t"

Δt : intervalle de temps

K: UI

## II. 8. Etude Histopathologique

### II. 8. 1. Examen macroscopique des poumons

Afin de caractériser d'éventuels signes d'inflammation ou de cancérisation, les poumons ont été soumis à un examen macroscopique à l'aide d'une loupe binoculaire.

### II. 8.2. Examen microscopique des poumons

Afin d'étudier les modifications pouvant toucher le tissu pulmonaire suite à l'induction d'une tumeur par le benzopyrène, une analyse histologique des coupes faites sur le poumon a été réalisée.

Pour une meilleure comparaison des structures du tissu pulmonaire d'un lot sain à un autre, cancéreux, un poumon gauche, de chacun des lots cités ci-dessus, sont débarrassés de l'excès de sang sur un papier buvard. Ensuite ils ont été plongés dans une solution de fixation qui est le formaldéhyde 10%.

La suite des étapes de la préparation des coupes histologiques a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyse médicales à Jijel.

L'observation des coupes histologiques des poumons des différents lots est réalisée par un microscope optique (Optika B-350) grossissement  $\times 40$ .

## II. 9. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été faites à l'aide du test de Mann-Whitney pour les comparaisons entre les échantillons. Une différence entre les résultats a été considérée comme significative pour une valeur de  $p < 0.05$ . Ces analyses ont été réalisées par le logiciel XLSTAT. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type.

Pour le seuil de signification, nous avons noté :

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

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

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

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

# **Résultats et interprétation**

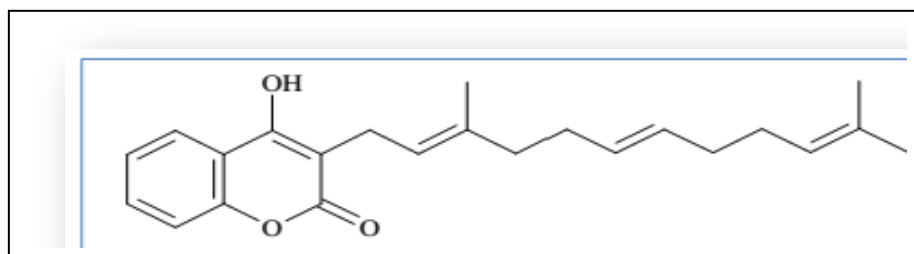
### III.1. Etude I

#### III.1.1. Les composés chimiques

Le spectre RMN H a montré quatre protons aromatiques à 7,93 et 7,56 qui pourrait être assigné aux protons d'un ortho-di- benzène substitué.

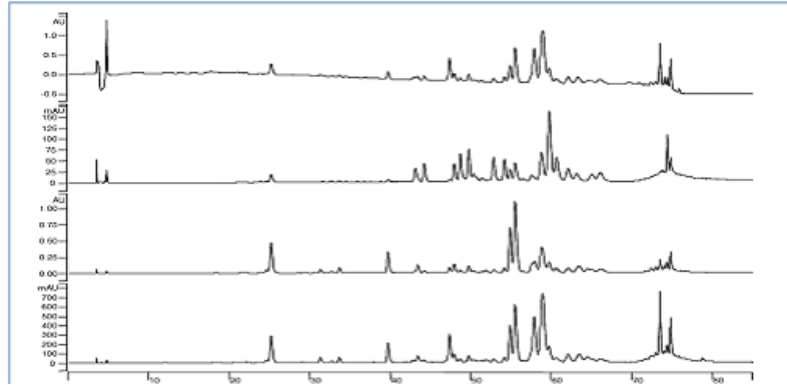
Trois signaux de triplets à  $\delta$ 5.14, 4.96 et 5.01, caractéristiques des protons oliféniques, pourraient être attribués à H-2', H-6' et H-10', respectivement. Quatre singulet pointu à  $\delta$ 1.45, 1.70, 1.58 et 1.49 pourraient être attribués à quatre groupes méthyle de H-12', H-13', H-14' et H-15', respectivement. Un signal de doublet à  $\delta$ 3.22 pourrait être assigné à H-1' et signaux multiples à  $\delta$ 1.85-2.15 pourraient être liés à quatre groupes méthylène de H-4', H-5', H-8' et H-9'. Ces signaux de protons étaient en accord avec ceux rapporté dans la littérature.

Le spectre de masse HRCI a montré un pic d'ion moléculaire à  $m/z$  367.227 [M + H] qui est en accord avec la formule moléculaire du ferulénol (C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>).



**Fig 13** :. Structure chimique du ferulénol

La concentration totale en flavonoïdes dans l'extrait de propolis déterminée par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium est égale à 370 mg QE / g DWPE. Les chromatogrammes HPLC (figure 14) indiquent la présence de 3 classes de polyphénols : flavonoïdes (absorption maximale à 280 et 370 nm); Chalcones: dihydrochalcone ( $\lambda_{\max}$ = 280–290 nm) et des acides phénoliques: les dérivés de l'acides hydroxycinnamic ( $\lambda_{\max}$ = 225 nm). cinq flavonoids sont identifié par l'analyse GC/MS : pinostrombin chalcone (38.91%), galangin (18.95%), naringenine (14.27%), tectochrysin (25.09%), methoxychrysin (1.14%) et les coumarines prénelées (1.65%) (Table 2).



**Figure 14 :**Chromatographie liquide haute performance de l'extract éthanolique de la propolis.

**Tableau 2 :** Composition chimique de la propolis algérienne

Le pic	Nom	Temp de rétention	La surfadace	% de surface	La taille	% de la taille	A /H	I
1	Pinostrobin chalcone	18.873	202 402 490	39.47	2 696 610	38.91	7.50	
2	Galangin flavanone	20.975	84 962 205	16.57	13 134 118	18.95	6.46	
3	Tectochrisin	23.361	143 995 688	28.08	17 388 828	25.09	8.28	
4	Naringenin	25.663	71 249 301	13.89	9 890 781	14.27	7.20	
5	Suberosin	25.990	6 080 989	1.19	1 142 943	1.65	5.32	
6	2'-Methoxychrysin	26.634	4 081 671	0.80	791 164	1.14	5.15	

### III.1.2. Modulation du gonflement mitochondrial

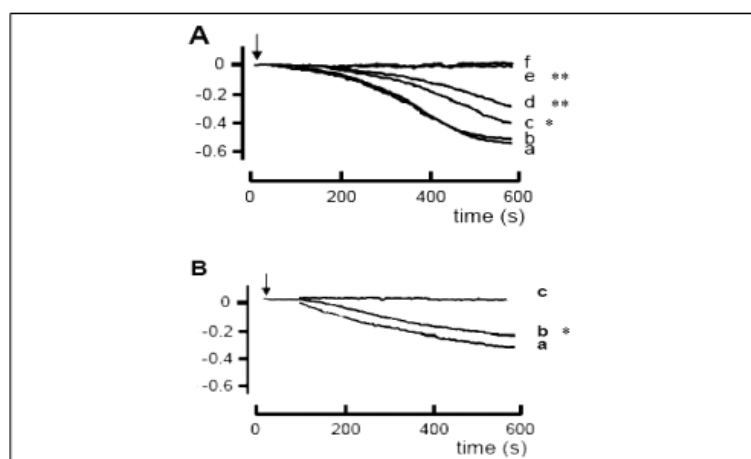
L'extract de la propolis module le gonflement mitochondrial induit par le feruléol  
 Nous avons étudié l'effet de l'extract de la propolis en présence de féruléol sur le gonflement mitochondrial qui est la conséquence d'une augmentation de la perméabilité membranaire. , des mitochondries hépatiques isolées ont été excitées avec du succinate 6 mM et un gonflement mitochondrial a été induit par l'addition de 25 uM de  $Ca^{2+}$  comme attesté par le diminution de l'absorbance de la suspension mitochondriale. Au contraire, le feruléol induit le gonflement.

A: Le Feruléol induit le gonflement des mitochondries soumis sous tension. Les mitochondries hépatiques (1 mg / mL) étaient pré-incubé pendant 2 min dans un milieu

contenant du saccharose 250 mM, du  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, incluant 2  $\mu\text{M}$  de la roténone et le succinate 6 mM, le pH est ajusté à 7,4 à 25 ° C, en l'absence (a) ou en présence de concentrations de féruléol [0,1  $\mu\text{M}$  (b), 1  $\mu\text{M}$  (c), 10 (d), 100 (e)] ou 1  $\mu\text{M}$  de cyclosporine (CsA) (f). Ensuite, l'enflure était induite par l'addition de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}_2^+$  (flèche).

B: L'extrait de la propolis inhibe le gonflement mitochondrial induit par le Feruléol. Après 1 min d'incubation en présence de 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}_2^+$  et deux minutes plus tard, le gonflement a été induit par 10  $\mu\text{M}$  de Feruléol en présence de 10  $\mu\text{M}$  (a), 100  $\mu\text{M}$  (b) d'extrait de propolis ou 1  $\mu\text{M}$  de cyclosporine, CsA (ligne c). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  versus.

la valeur observée en l'absence de Feruléol était capable de favoriser le gonflement quand il était ajouté à la place de l'agent de découplage bien connu carbonyle cyanure m-chlorophénylhydrazone. Cet effet concentration dépendant (\*  $p < 0,01$ ) était inhibé par l'extrait de la propolis à 100  $\mu\text{M}$  (\*  $p < 0,05$ ) confirmant l'implication de la PTP dans le processus de gonflement (Figure15). Le gonflement est une conséquence de l'ouverture de la PTP car il a été complètement prévenu par 1  $\mu\text{M}$  de cyclosporine A (CsA), un inhibiteur bien connu de ce canal. Le prétraitement avec l'extrait de propolis a diminué le taux de gonflement mitochondrial.



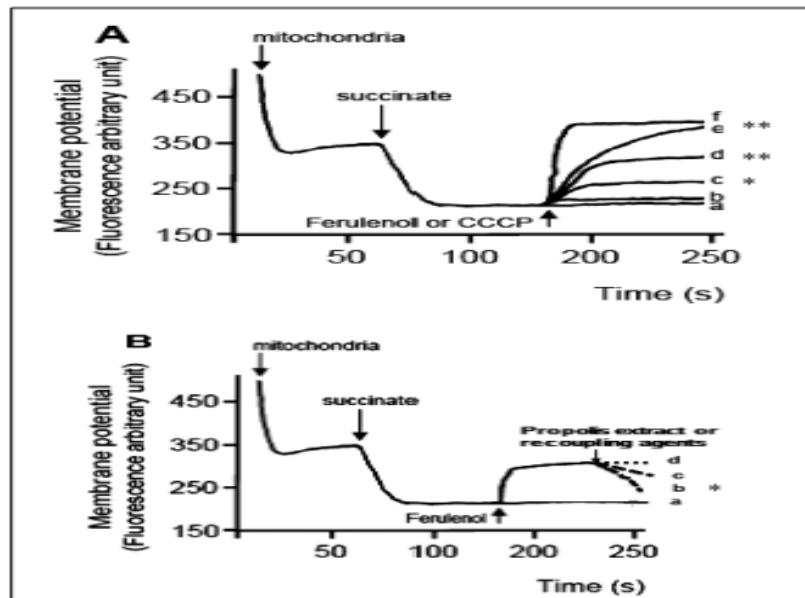
**Figure 15 :** Effet de l'extrait de la propolis sur le Féuléol induisant un gonflement mitochondrial

A: Féuléol diminue le potentiel de la membrane. Des mitochondries hépatiques isolées (0,5 mg / mL) ont été incubées dans un milieu contenant 250 mM saccharose, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\mu\text{M}$  de roténone et 0,3  $\mu\text{M}$  de rhodamine 123. Le potentiel membranaire a été



établi après l'addition de succinate 6 mM, suivie de l'addition de concentrations croissantes de Féruléol [0,1 uM (b); 1 uM (c); 10 uM (d); 100 uM (e)] ou CCCP [1 uM; (F)]. Courbe (a): courbe de contrôle sans addition.

B: L'extrait de la propolis a restauré le potentiel membranaire. L'ajout de l'extrait de propolis rétabli la rupture du potentiel membranaire [100 µM (b); 10 uM (c)]. Courbe (a): courbe de contrôle sans addition et courbe (d) addition de 100 µM d'agents de recouplage; 6-kétocholestanol, progestérone, testostérone, atractylate ou carboxyatractylate b. \* p <0,05; \*\* p <0,01 versus la valeur observée en l'absence de Feruléol (Figure 16B). En effet, l'extrait de propolis inhibe le gonflement de la mitochondrie induit par le Feruléol. Après 1 min d'incubation en présence du Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> 25 µM (flèche) et deux minutes plus tard, un gonflement a été induit par du feruléol 10 µM (ligne a), 100 µM (ligne b) d'extrait de propolis et 1 µM de cyclosporine, CsA (ligne c). Selon l'effet de ces extraits sur le gonflement mitochondrial *in vitro*, cet effet était concentration dépendant. Nous avons conclu que le blocage de l'entrée du calcium était dû à une inhibition des canaux calciques.



**Figure 16 :** Effet du Féruléol sur le potentiel de la membrane mitochondriale

### III.1.3. L'extrait de propolis rétablit la perturbation du potentiel membranaire de la mitochondrie induit par le Ferulénol

La figure 16A démontre que le Ferulénol induit une diminution concentration dépendante du potentiel membranaire contrôlé au moyen de la rhodamine 123. Des résultats identiques ont été observés avec CCCP. Cet effet a été empêché par l'extrait de propolis indiquant la dépolarisation de la membrane mitochondriale qui dépend, en partie, de l'ouverture du PTP. En effet, la figure 16B démontre que l'effet de découplage du Ferulénol a été inversé par l'extrait de propolis à des concentrations de 10 et 100  $\mu\text{M}$  (\*  $p < 0,05$ ) mais n'a pas été inversé en augmentant les concentrations d'agents de recouplage tels que le 6-cétocholestanol, la progestérone, la testostérone, l'atractylate ou le carboxyatractylate b (figure 16B).

### III.1.4. Interaction de l'extrait de la propolis et du Ferulénol avec la chaîne respiratoire mitochondrial

Il est bien démontré que l'action des protonophores est associée à une augmentation de la fréquence respiratoire mitochondriale due au cycle futile des protons à travers le cycle interne.

**Tableau 3:** effet du Ferulénol sur la respiration mitochondriale

Ferulénol (M)	$V_2$ (nmol /mg de protéine/min)	$V_3$ (nmol /mg de protéine/min)	$V_4$ (nmol /mg de protéine/min)	RCR
0	$40 \pm 2.2$	$122 \pm 5.0$	$39.9 \pm$	$3.1 \pm$
10 <sup>-7</sup>	$40.1 \pm 1.3$	$112 \pm 2.6$	$42.0 \pm$	$2.7 \pm$
10 <sup>-6</sup>	$37.9 \pm 0.3$	$41.6 \pm 0.6$	$39.4 \pm$	$1.1 \pm$
10 <sup>-5</sup>	$13.7 \pm 0.1$	–	–	–
10 <sup>-4</sup>	$9.1 \pm 0.4$	–	–	–

Le tableau 3 montre que l'addition de concentrations croissantes de Ferulénol à une suspension mitochondriale excitée avec du succinate en présence de la roténone (complexes II à IV avec ATP synthase activée) n'a pas augmenté mais plutôt à diminué la respiration mitochondriale (\* $p < 0,05$ ). Cette perturbation de la respiration mitochondriale a été empêchée par la propolis à des concentrations moyennes (10 et

100  $\mu$ M) (\* p <0,05) soutenant l'hypothèse que le canal d'ouverture du PTP est lié à la respiration mitochondriale et à l'état redox des groupes thiols mitochondriaux et des nucléotides pyridines et est donc directement modulé par le potentiel membranaire (Tableau 4)

**Tableau 4 :** Effet de la propolis sur la respiration mitochondrial

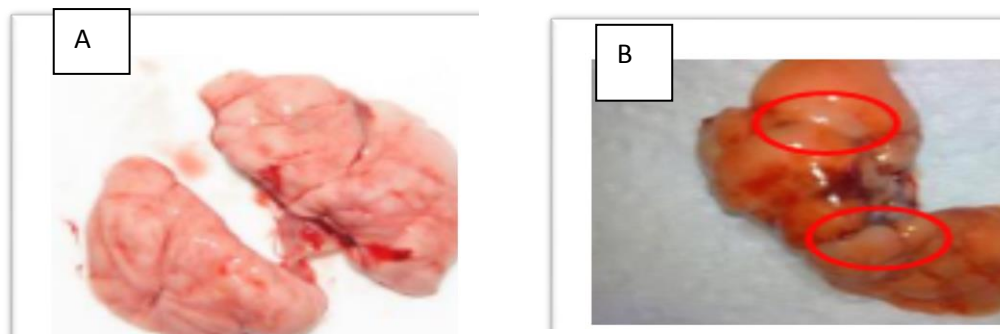
La propolis (M)	V <sub>2</sub> (nmol /mg de proteine/min)	V <sub>3</sub> (nmol /mg de proteine/min)	V <sub>4</sub> (nmol /mg de proteine/min)	RCR
0	13.7 ± 0.1	–	–	–
10-6	38.1± 2.2	124±2.1	38.109±	3.2±0.1
10-5	37.9 ± 0.3	117.00±1.2	40.1±05	2.9±0.2
10-4	21.4 ± 0.7	–	–	–
10-3	12.4 ± 0.5	–	–	–

## III.2. Etude II

### III.2.1. Etude histologique du poumon

#### III.2.1.1. L'examen macroscopique des poumons des rats traités par le B(a)P

Cet examen, montre une surface de couleur brunette, hétérogène, ainsi qu'une fusion des lobules pulmonaires (perte de lobulation) alors que, ceux des rats traités par le CP présentent une surface de couleur blanchâtre ce qui peut être due à la formation des kystes résultant de réactions inflammatoires.

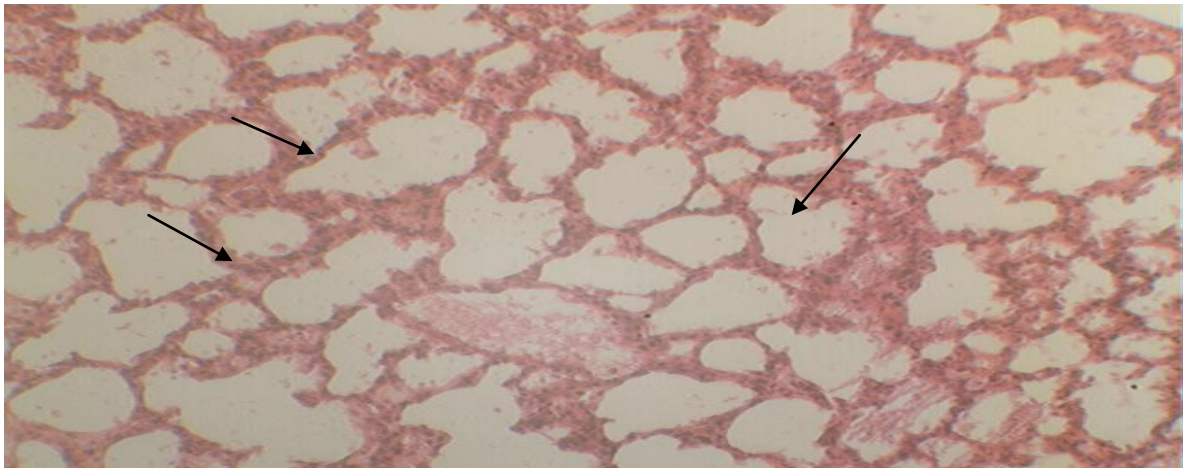


**Figure 17 :** examen macroscopique des poumons  
A : poumon du rat témoin. B : poumon du rat traité par le B(a)P

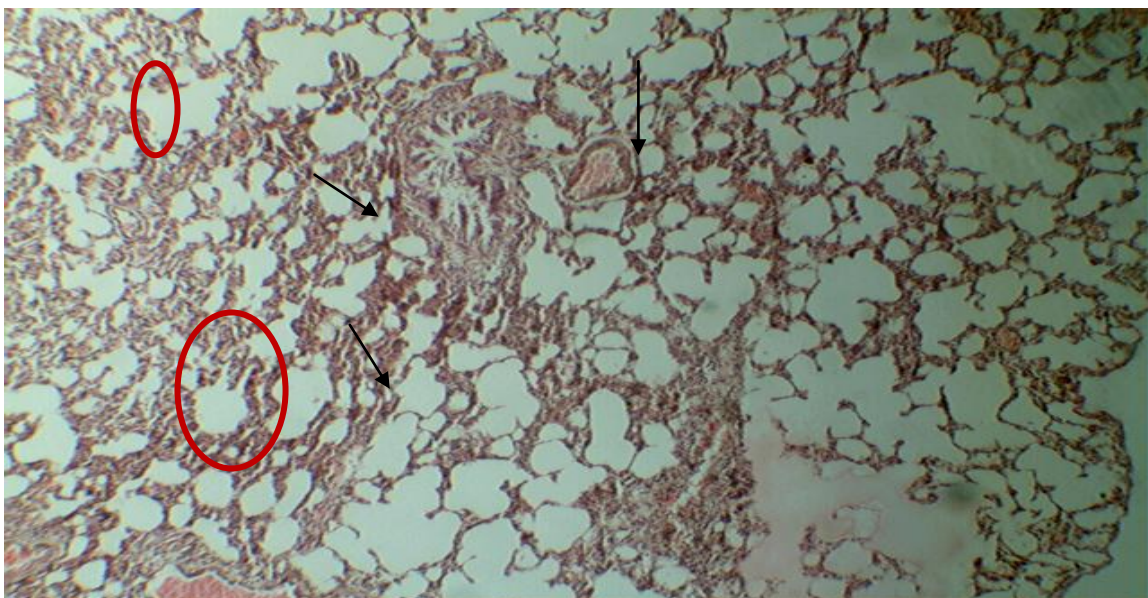
### **III.2.1.2. Examen des coupes histologiques des différents groupes observées au microscope optique G x40**

Les flèches noires désignent les espaces alvéolaires, Les cercles rouges indiquent les zones où l'infiltration de cellules inflammatoires est la plus importante.

A: coupe réalisée sur le poumon de rat du groupe témoin, B: coupe réalisée sur le poumon de rat du groupe traité par B(a)P.



**Figure 18 : coupe histologique du poumon du rat sain non traité (Gx 40)**



**Figure 19 : coupe histologique du poumon du rat recevant le B(a)P (Gx 40)**

L'examen microscopique des coupes histologiques réalisées sur des poumons normaux montre des espaces alvéolaires de dimension régulière (Fig. 14), alors que, ceux des rats traités par le B(a)P (Fig.215) démontrent un épaississement du septum qui peut être lié à un

envahissement des espaces alvéolaires par les cellules inflammatoires, soit par les cellules cancéreuses. un envahissement et une propagation de l'inflammation englobant le tissu.

### **III.2.2. Evaluation du statu oxydatif dans la cellule cancéreuse du poumon**

Les valeurs sont représentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n=6).  $P < 0.05$  présente la différence significative, Mann Whitney été utilisé pour l'analyse statistique avec le logiciel XLSTAT.

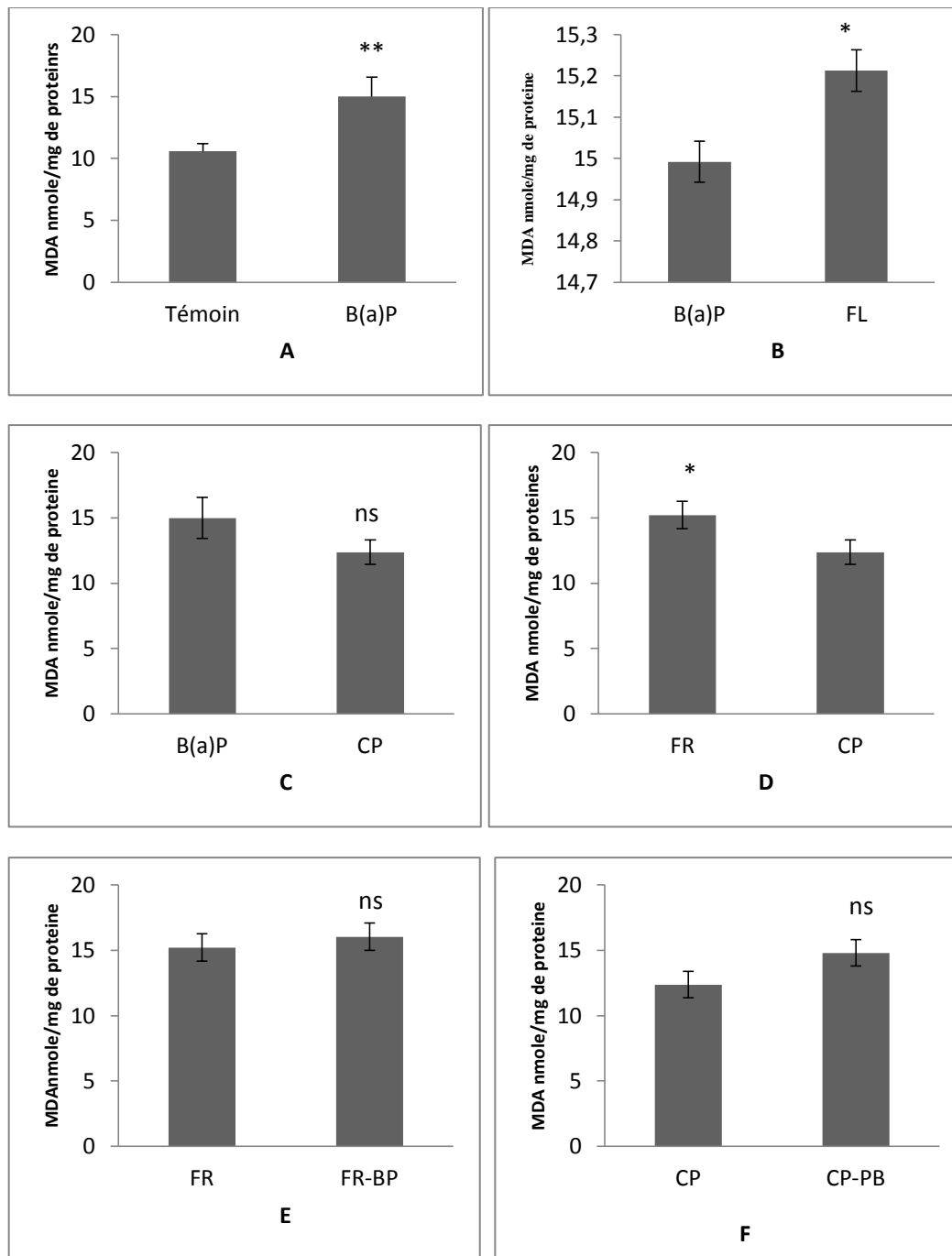
#### **III.2.2.1. Mesure du taux du Malondialdéhyde mitochondrial (MDA)**

Le niveau de la peroxydation lipidique dans les poumons des animaux traités par le B(a)P (fig: 20 A) présente une augmentation très significative ( $p < 0,01$ ) en comparaison avec les animaux du groupe témoin. L'administration du CP a été accompagnée d'une augmentation de la LPO et est exprimée par une élévation très significative ( $p < 0,01$ ) du taux de produit de LPO malondialdéhyde (MDA) (fig :25 B) en comparaison avec le groupe témoin. En revanche, nous avons noté une diminution non significative en comparaison avec le groupe traités par le B(a)P ( $p > 0,05$ ) (fig :20 C).

Les animaux traités par le Férulénol ont montré également une augmentation très significative dans le taux du MDA (fig : 25A) en comparaison avec les animaux du groupe témoin. En comparant le Férulénol au B(a)P (fig : 20B) et au CP (fig : 20D), nous avons noté une augmentation significative du taux du MDA dans la cellule cancéreuse du poumon.

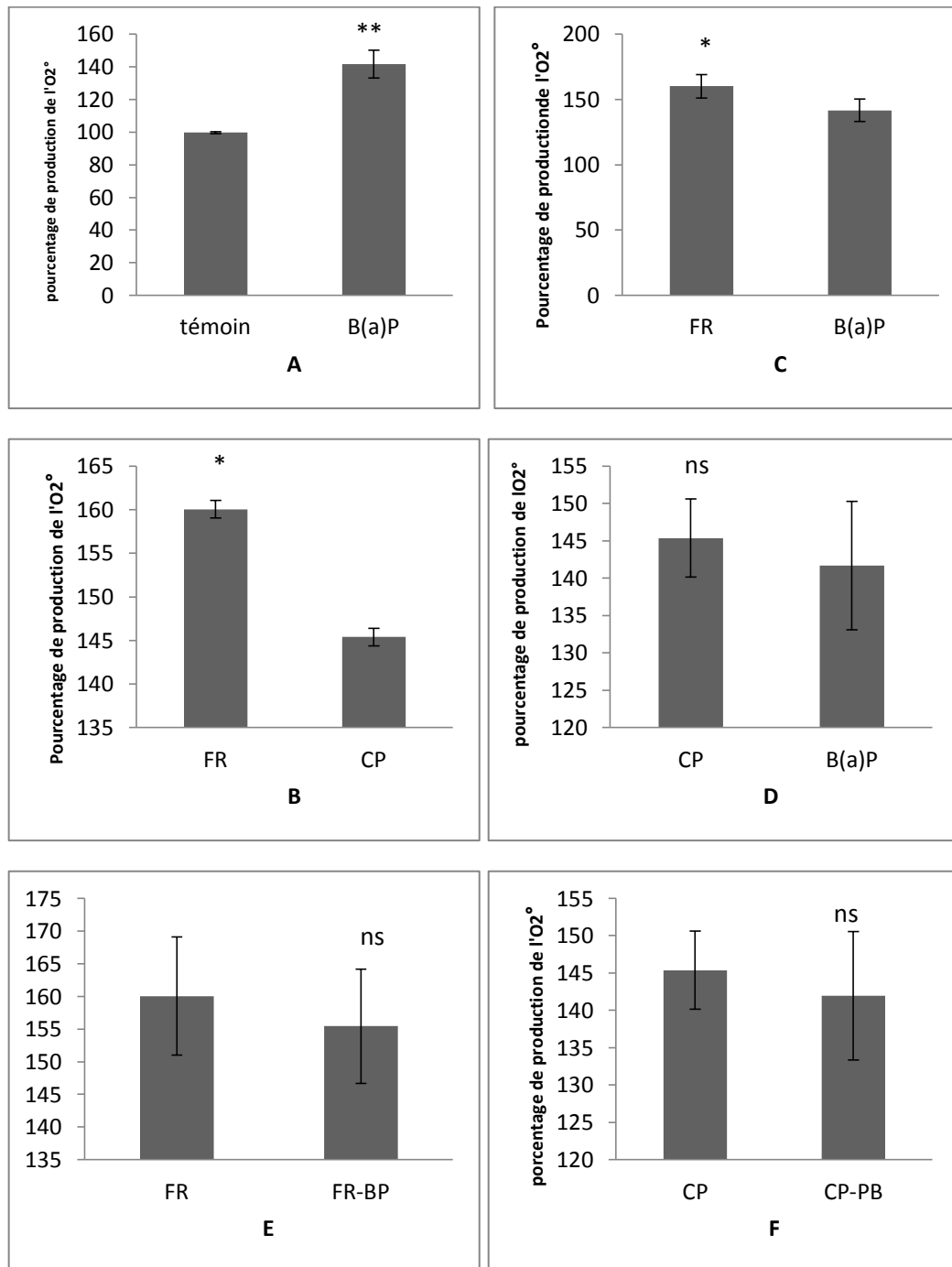
Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec l'inducteur enzymatique, phénobarbital (50 mg / kg), présentent une augmentation non significative dans le taux de MDA ( $p > 0,05$ ) dans le tissu pulmonaire cancéreux en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seule (fig :20F).

De même l'association du Férulénol au phénobarbital a montré une augmentation non significative du MDA en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg de Férulénol seul (fig: 20 E)



**Figure 20** : variation taux du Malondialdéhyde mitochondrial (MDA) dans la cellule cancéreuse du poumon. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6). Test de Mann Whitney : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

III.2.2.2. Evaluation des taux de l'anion superoxyde dans la cellule cancéreuse du poumon



**Figure 21** : variation du taux de l'anion superoxyde dans la cellule cancéreuse du poumon  
 Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6). Test de Mann Whitney : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

Le pourcentage de production de l'anion superoxyde dans les poumons des animaux traités par le B(a)P à augmenter d'une façon très significative ( $p < 0, 01$ ) en comparaison avec les animaux du groupe témoin (fig : 26 A). L'administration du CP a été accompagnée par une augmentation de la production de l'anion superoxyde, c'est une production très significative en comparaison avec le témoin. ( $p < 0,01$ ), mais on le comparant au B(a)P, nous constatons une augmentation non significative (fig: 21D).

Les animaux traités par le Férulnol ont montré une augmentation très significative dans le taux de l'anion superoxyde en comparaison avec les animaux du groupe témoin (fig: 26A), et une augmentation significative en le comparant au CP (fig: 21B) et aux B(a)P (fig: 21C).

Le groupe d'animaux atteint du cancer du poumon et recevant une chimiothérapie par le CP à une dose unique de 80 mg / kg par voie IV en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) présentent une augmentation non significative dans le taux de l'O<sub>2</sub><sup>°</sup> ( $p > 0,05$ ) dans le tissu pulmonaire cancéreux en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seulement (fig :21E). .

De même l'association du Féruléol au phénobarbital a montré une augmentation non significative de l'O<sub>2</sub><sup>°</sup> en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg de Féruléol seul (fig :21F).

### **III.2.2.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase dans la cellule cancéreuse du poumon**

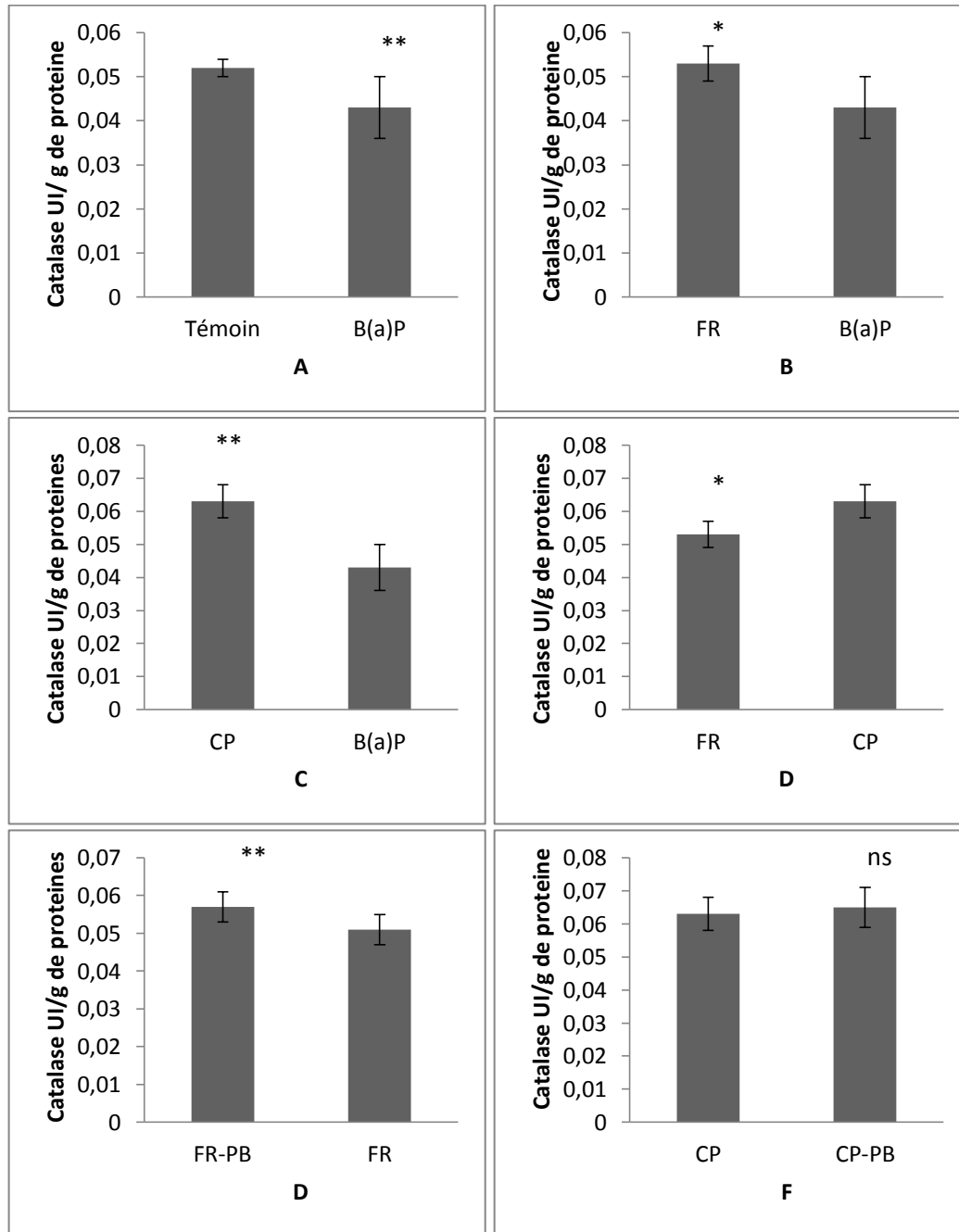
L'activité enzymatique de la catalase dans les poumons des animaux traités par le B(a)P à diminué d'une façon très significative ( $p < 0, 01$ ) en comparaison avec les animaux du groupe témoin (fig : 22A).

L'administration du CP a été accompagnée par une diminution de l'activité enzymatique de la catalase (fig :27 B), c'est une diminution très, significative en comparaison avec le témoin. ( $p < 0,01$ ), Mais par rapport au B(a)P, nous avons remarqué une activité enzymatique de la catalase plus élevée avec le CP (fig :22C).

Les animaux traités par le Férulenol ont montré une diminution non significative dans l'activité enzymatique de la catalase en comparaison avec les animaux du groupe témoin (fig :27A), et lorsque on le compare au B(a)P, nous constatons que l'activité enzymatique de la catalase est plus élevé avec le Férulenol, c'est une élévation significative (fig :22B).



Nous avons remarqué que l'activité enzymatique de la catalase, chez les rats traités par le Féruenol, diminue significativement en comparaison avec les animaux recevant le CP (fig :22D).



**Figure 22 : évaluation de l'activité enzymatique de la catalase dans la cellule cancéreuse du poumon**

. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6). Test de Mann Whitney : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) présentent une augmentation non significative dans le taux de l'activité enzymatique de la catalase dans le tissu pulmonaire cancéreux en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seule (fig :22F). En parallèle l'association du Férulénol au phénobarbital a montré une augmentation très significative de l'activité enzymatique de la catalase en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg du Férulénol seul.

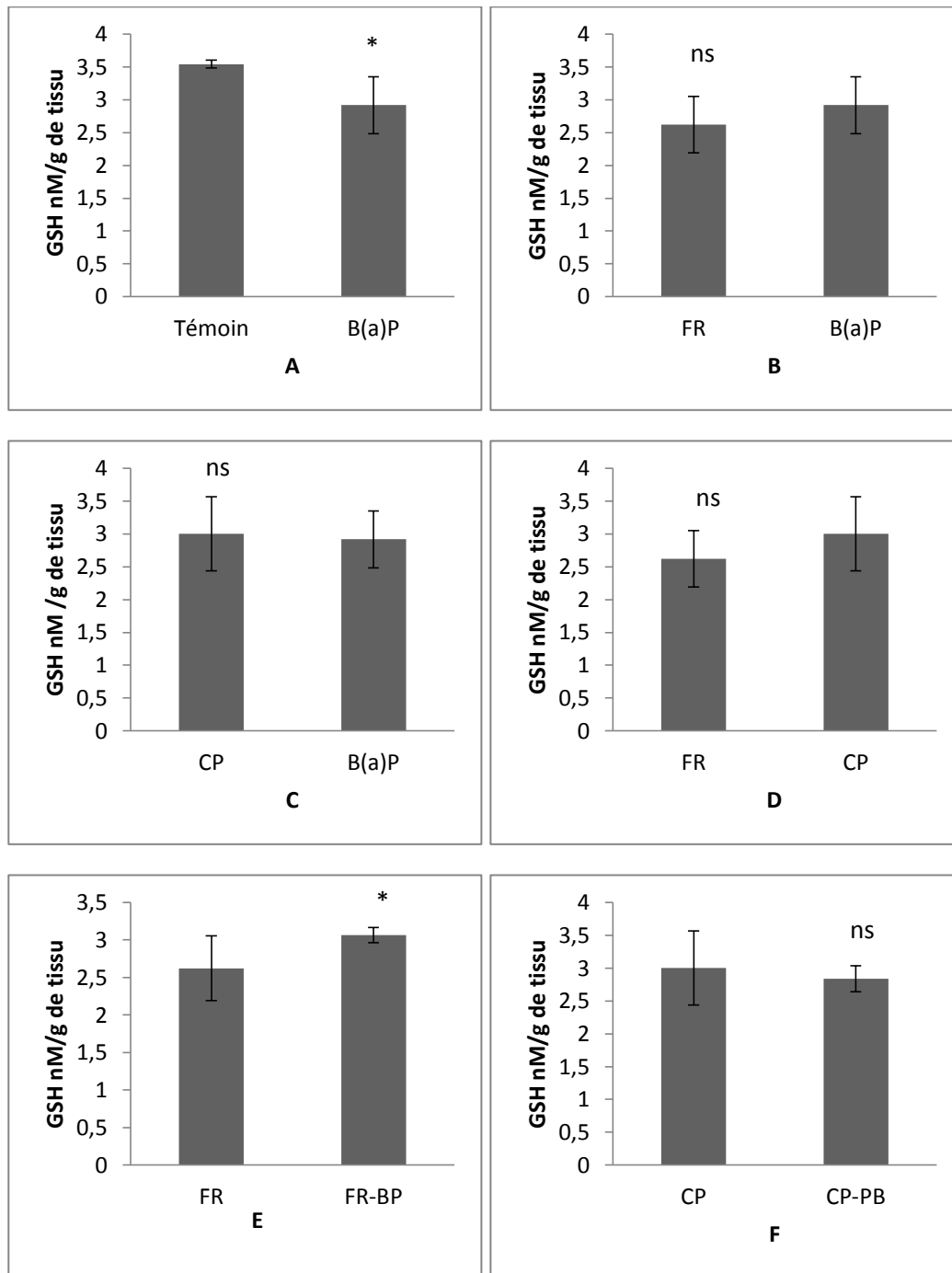
#### **III.2.2.4. Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) dans la cellule cancéreuse du poumon**

Le degré de production du GSH dans les poumons des animaux traités par le B(a)P a diminué d'une façon significative ( $p < 0, 05$ ) en comparaison avec les animaux du groupe témoin (fig :22A).

L'administration du CP a été accompagnée d'une diminution du taux de GSH, c'est une diminution très significative en comparaison avec le groupe témoin (fig :28B) et une augmentation non significative en comparaison avec le groupe traité par le B(a)P (fig23C).

Les animaux traités par le Férulénol ont montré, également une diminution très significative dans le taux de GSH en comparaison avec les animaux du groupe témoin (fig :28A). mais en le comparant au B(a)P (fig :23B) et au CP (fig :23D), nous avons constaté une diminution non significative.

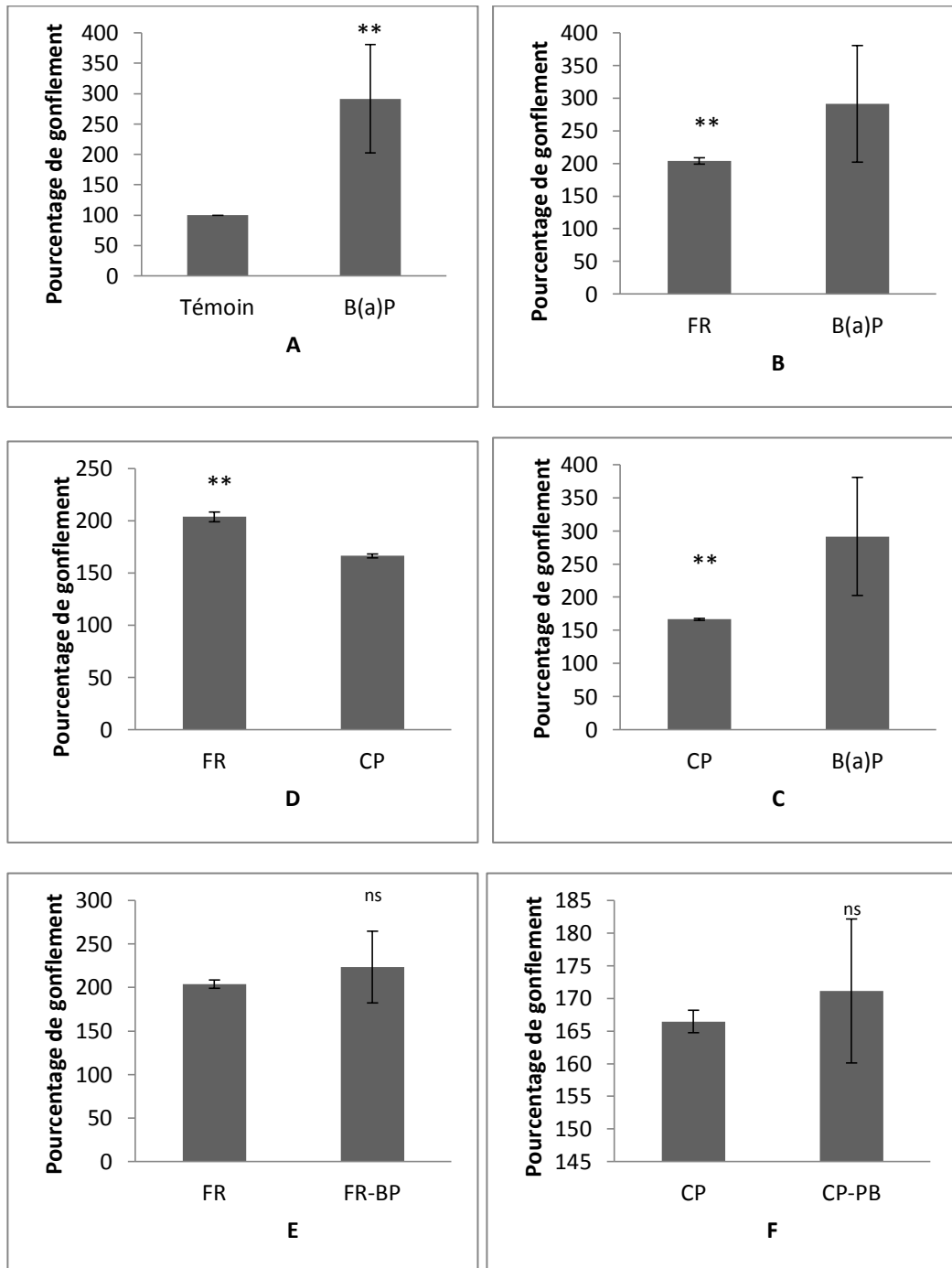
Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) présentent une diminution non significative dans le taux de GSH dans le tissu pulmonaire cancéreux en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seulement (fig :23F). alors que l'association du Férulénol au phénobarbital a montré une augmentation significative du taux du GSH en comparaison avec le groupe d'animaux recevant une dose de 50mg /kg de férulénol seul (fig :23E)



**Figure 23** : Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) dans la cellule cancéreuse du poumon

. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6). Test de Mann Whitney : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

III.2.2.5. Evaluation du taux du gonflement (swelling) mitochondrial dans la cellule cancéreuse du poumon



**Figure 24:** taux du gonflement (swelling) mitochondrial dans la cellule cancéreuse du poumon . Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6). Test de Mann Whitney : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

Le niveau du swelling dans les poumons des animaux recevant le B(a)P a présenté une augmentation très significative ( $p < 0,01$ ) en comparaison avec les animaux du groupe témoin (fig :24A).

L'administration du CP, a été accompagnée d'une augmentation du swelling c'est une élévation très significative ( $p < 0,01$ ) en comparaison avec le groupe témoin (fig :29B).

Par comparaison au B(a)P, le taux du gonflement diminue (fig :24C).

Les animaux traités par le Férulénol ont montré une augmentation significative dans le taux du gonflement en comparaison avec les animaux du groupe témoin (fig :29A)

Par rapport au CP, nous avons remarqué que le Férulénol a engendré une augmentation très significative du gonflement dans les cellules cancéreuses pulmonaires (fig :24D), mais par rapport au B(a)P, nous avons noté une diminution du swelling, c'est une diminution très significative (fig :24B).

Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) présentent de même une augmentation non significative dans le taux de swelling ( $p > 0,05$ ) dans le tissu pulmonaire cancéreux en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seulement (fig :24F). De même l'association du Férulénol au phénobarbital a montré une augmentation non significative du swelling en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg de Férulénol seul (fig :24E).

### **III. 2.3. Evaluation du statu oxydatif dans la cellule saine du poumon**

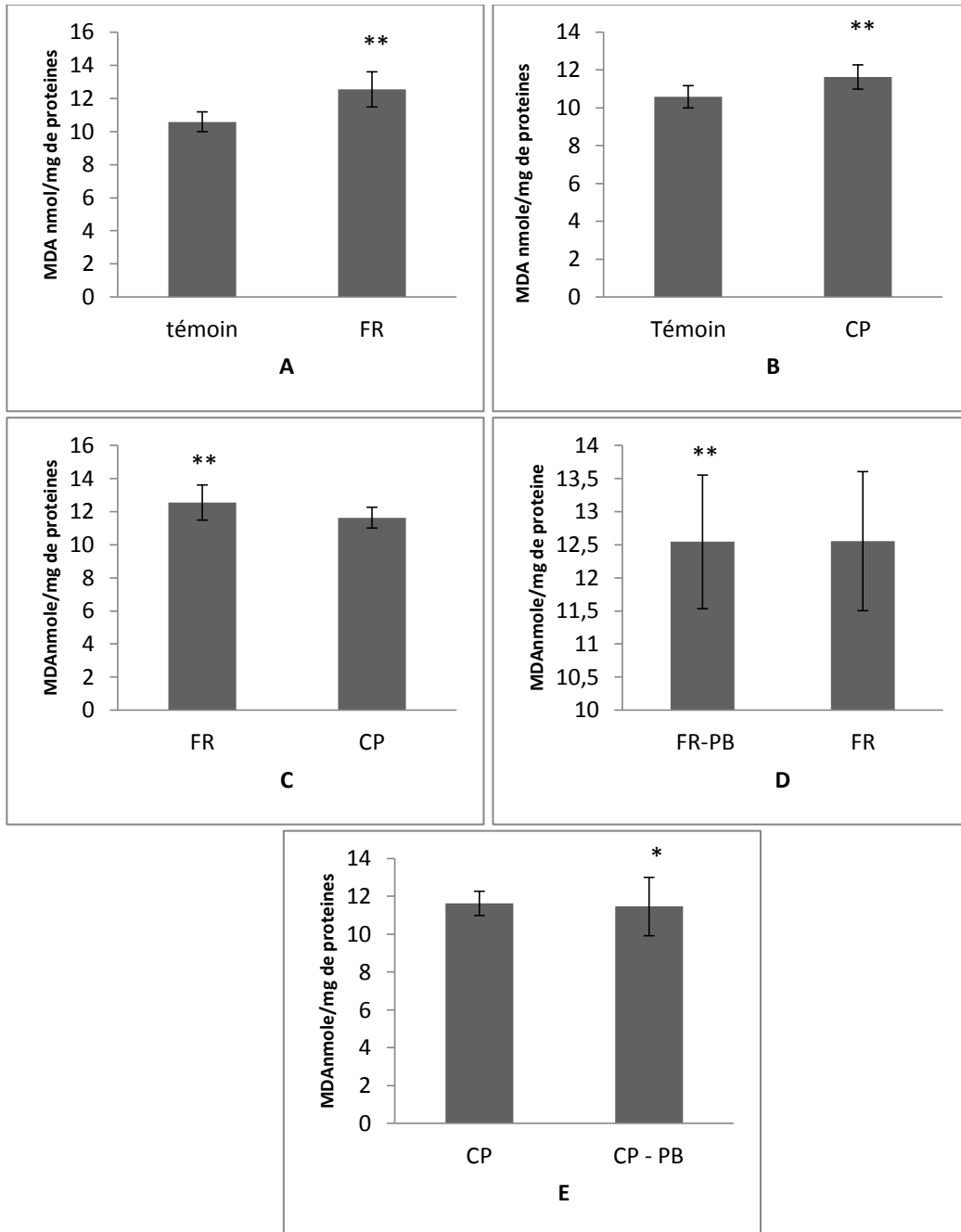
#### **III. 2.3. 1. Mesure du taux du Malondialdéhyde mitochondrial (MDA)**

L'administration du CP a été accompagnée par une augmentation de la LPO et une élévation très significative ( $p < 0,01$ ) du taux de produit de LPO malondialdéhyde (MDA) a été observée en comparaison avec le groupe témoin (fig :25 B).

Les animaux traités par le Férulénol ont montré une augmentation très significative dans le taux de MDA en comparaison avec les animaux du groupe témoin, nous avons remarqué le même résultat pour les animaux traités par le CP où le Férulénol a présenté une augmentation très significative (fig :25 C).

Le groupe d'animaux recevant une chimiothérapie par le CP à une dose unique de 80 mg / kg par voie IV, présente un taux de MDA inférieur en comparaison à celui observé chez le groupe d'animaux traité par le férulénol à une dose de 50 mg / kg per os pendant 5 jours. C'est une diminution très significative.

Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) (fig : 25E) présentent une diminution significative dans le taux de MDA ( $p < 0,05$ ) dans le tissu pulmonaire sain en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seulement. De même l'association du féruléol au phénobarbital a montré une diminution très significative du MDA en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg de Féruléol seul (fig :25D).



**Figure 25** : taux du Malondialdéhyde mitochondrial (MDA) dans la cellule pulmonaire normale.

III. 2.3. 2. Evaluation des taux de l'anion superoxyde dans la cellule saine du poumon

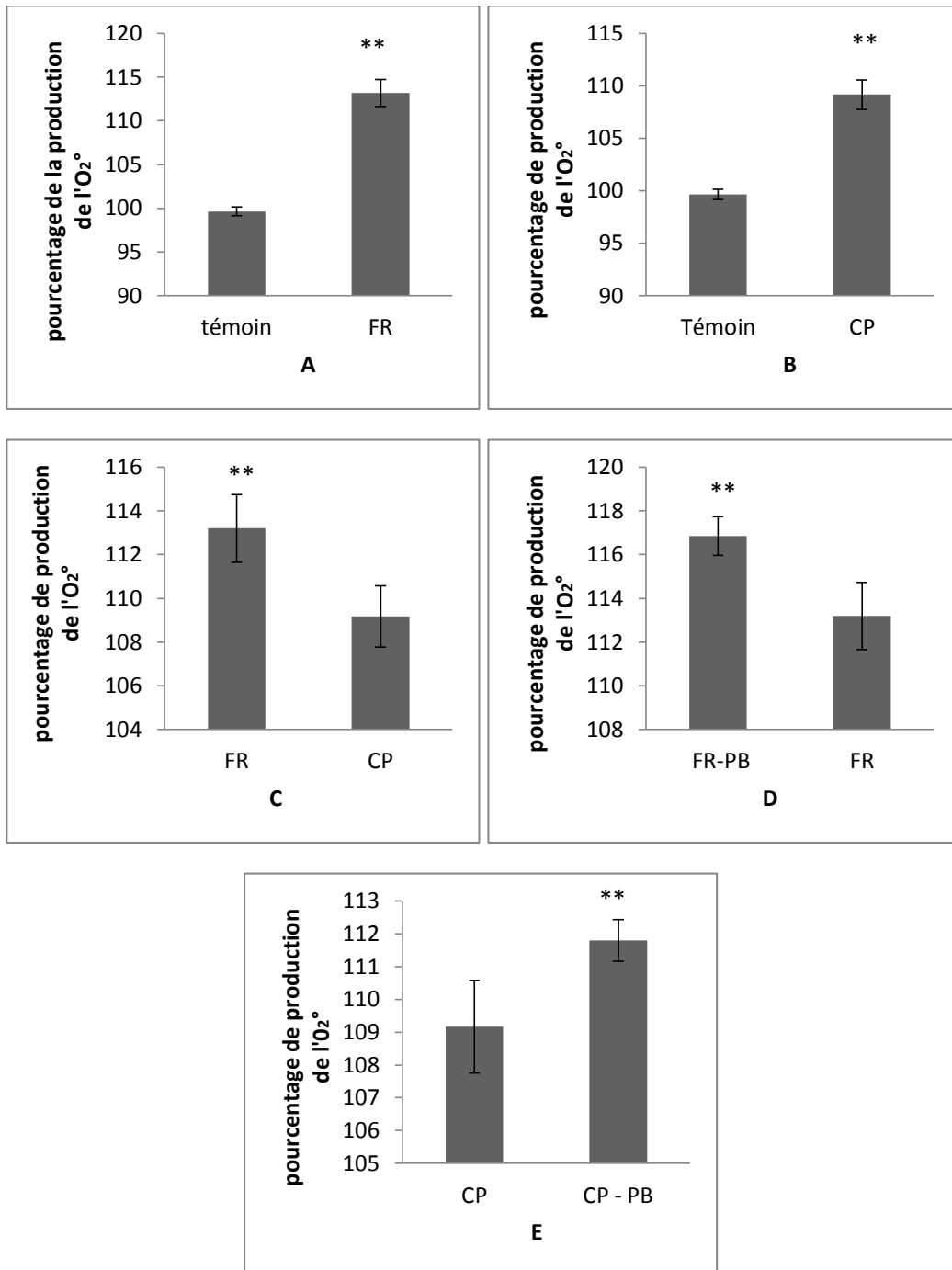


Figure 26 : taux de l'anion super oxyde dans la cellule saine du poumon

. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6). Test de Mann Whitney : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

L'administration du CP a été accompagnée par une augmentation de la production de l'O<sub>2</sub><sup>°</sup> et une élévation très significative ( $p < 0,01$ ) du taux de l'anion superoxyde a été observée en comparaison avec le groupe témoin (fig :26 B).

Les animaux traités par le Féculérol ont montré une augmentation très significative dans le taux de l'anion en comparaison avec les animaux du groupe témoin, nous avons remarqué le même résultat pour les animaux traité par le CP où le Féculérol a présenté une augmentation très significative du taux de l'anion superoxyde (fig :26 C).

Le groupe d'animaux recevant une chimiothérapie par le CP à une dose unique de 80 mg / kg par voie IV, présente un taux de l'O<sub>2</sub><sup>°</sup> inférieur en comparaison à celui observé chez le groupe d'animaux traité par la Féculérol à une dose de 50 mg / kg per os pendant 5 jours. C'est une diminution très significative.

Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) (fig : 26E) présentent une augmentation très significative dans le taux de l' O<sub>2</sub><sup>°</sup> ( $p < 0,01$ ) dans le tissu pulmonaire sain en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seulement. De même l'association du Féculérol au phénobarbital a montré une augmentation très significative de O<sub>2</sub><sup>°</sup> en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg de Féculérol seul (fig :26D).

### **III. 2.3.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase dans la cellule saine du poumon**

L'administration du CP a été accompagnée par une déplétion de l'activité enzymatique de la catalase et une diminution très significative ( $p < 0,01$ ) en comparaison avec le groupe témoin (fig :27 B).

Les animaux traités par le Féculérol ont montré une diminution non significative dans l'activité enzymatique de la catalase en comparaison avec les animaux du groupe témoin, en comparaison avec les animaux traité par le CP, nous avons remarqué que le Féculérol a présenté une augmentation significative de l'activité enzymatique de la catalase (fig :27 C).

Le groupe d'animaux recevant une chimiothérapie par le CP à une dose unique de 80 mg / kg par voie IV, présente une diminution significative de l'activité enzymatique de la catalase en comparaison avec le groupe d'animaux traité par la Féculérol à une dose de 50 mg / kg per os pendant 5 jours. C'est une diminution significative.



Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) (fig : 27 E) présentent une augmentation très significative de l'activité enzymatique de la catalase ( $p < 0,01$ ) dans le tissus pulmonaire sain en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seulement. De même l'association du Féruléol au phénobarbital a montré une augmentation significative de l'activité enzymatique de la catalase en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg de Féruléol seul (fig :27D).

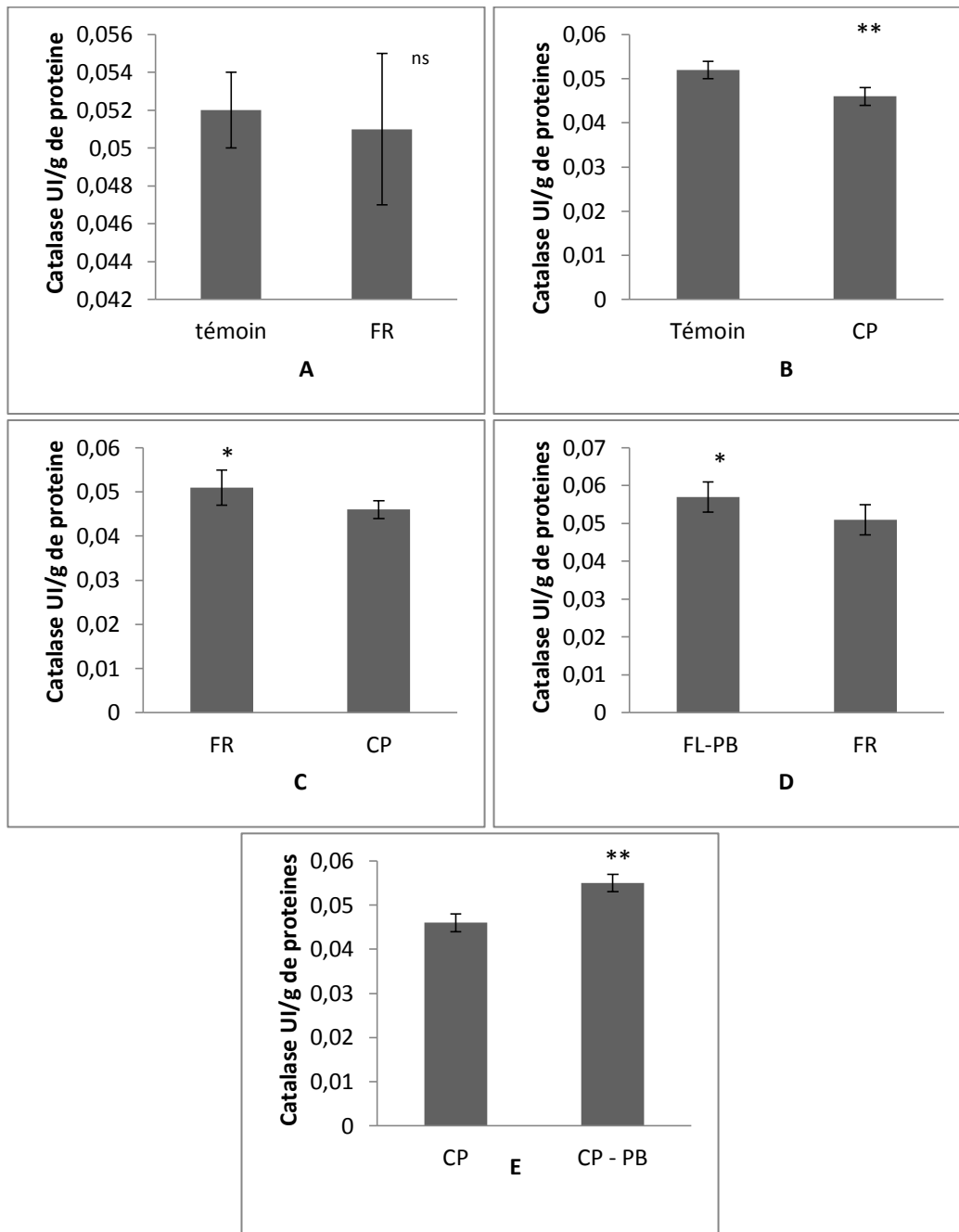
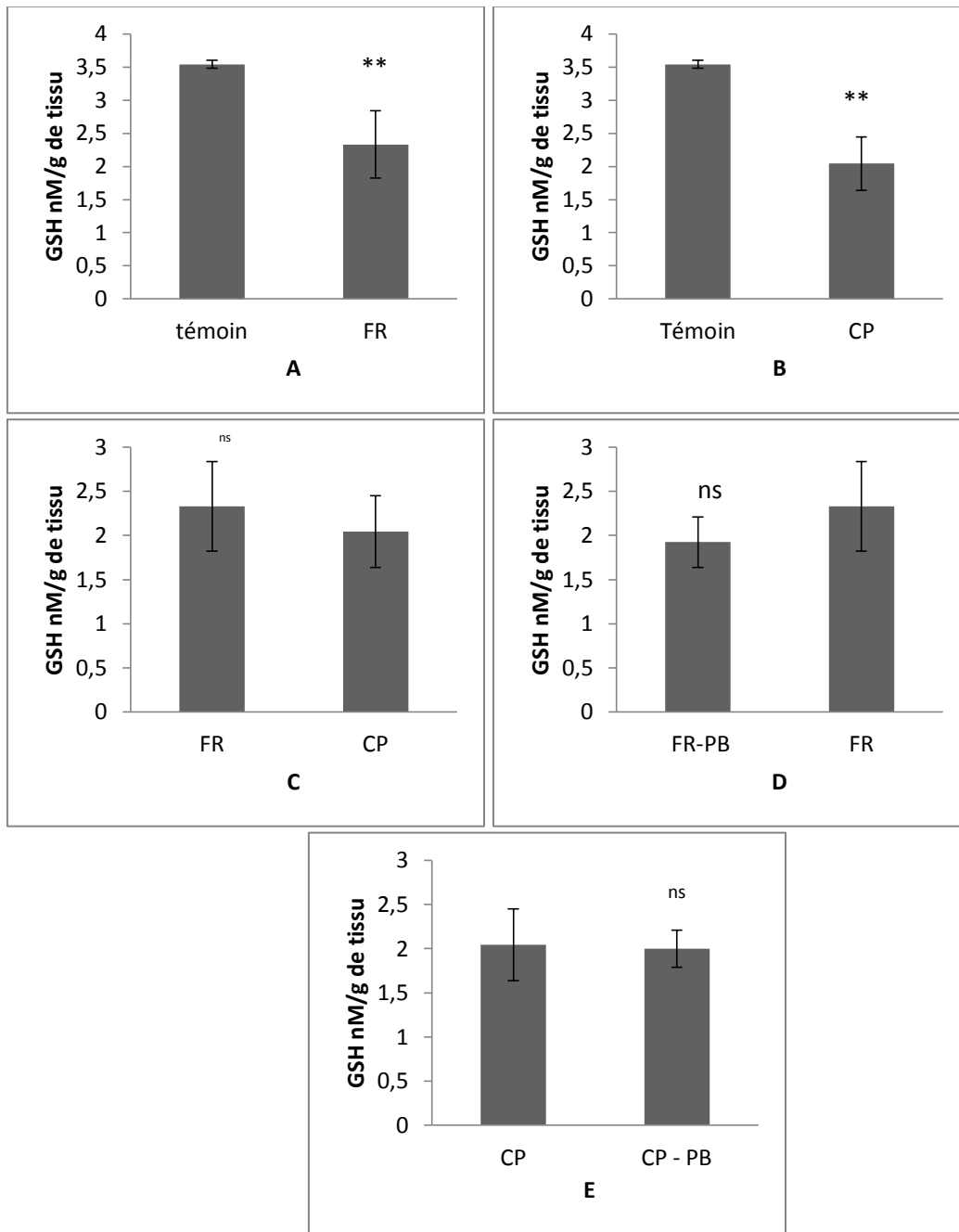


Figure 27 : variation de l'activité enzymatique de la catalase dans la cellule saine du poumon

III. 2.3.4. Mesure de la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) dans la cellule saine du poumon



**Figure 28** : évaluation la concentration du glutathion réduit cytosolique (GSH) dans la cellule saine du poumon

. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6). Test de Mann Whitney : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

L'administration du CP a été accompagnée par une diminution du taux de GSH, c'est une diminution très significative ( $p < 0,01$ ) en comparaison avec le groupe témoin (fig :28 B).

Les animaux traités par le Féruléol ont montré une diminution très significative dans le taux de la GSH en comparaison avec les animaux du groupe témoin, et en comparaison avec les animaux traité par le CP, nous avons remarqué que le Féruléol a présenté une augmentation non significative du taux de la GSH (fig :28 C).

Le groupe d'animaux recevant une chimiothérapie par le CP à une dose unique de 80 mg / kg par voie IV, présente une diminution non significative du taux de GSH en comparaison avec le groupe d'animaux traité par la Féruléol à une dose de 50 mg / kg per os pendant 5 jours.

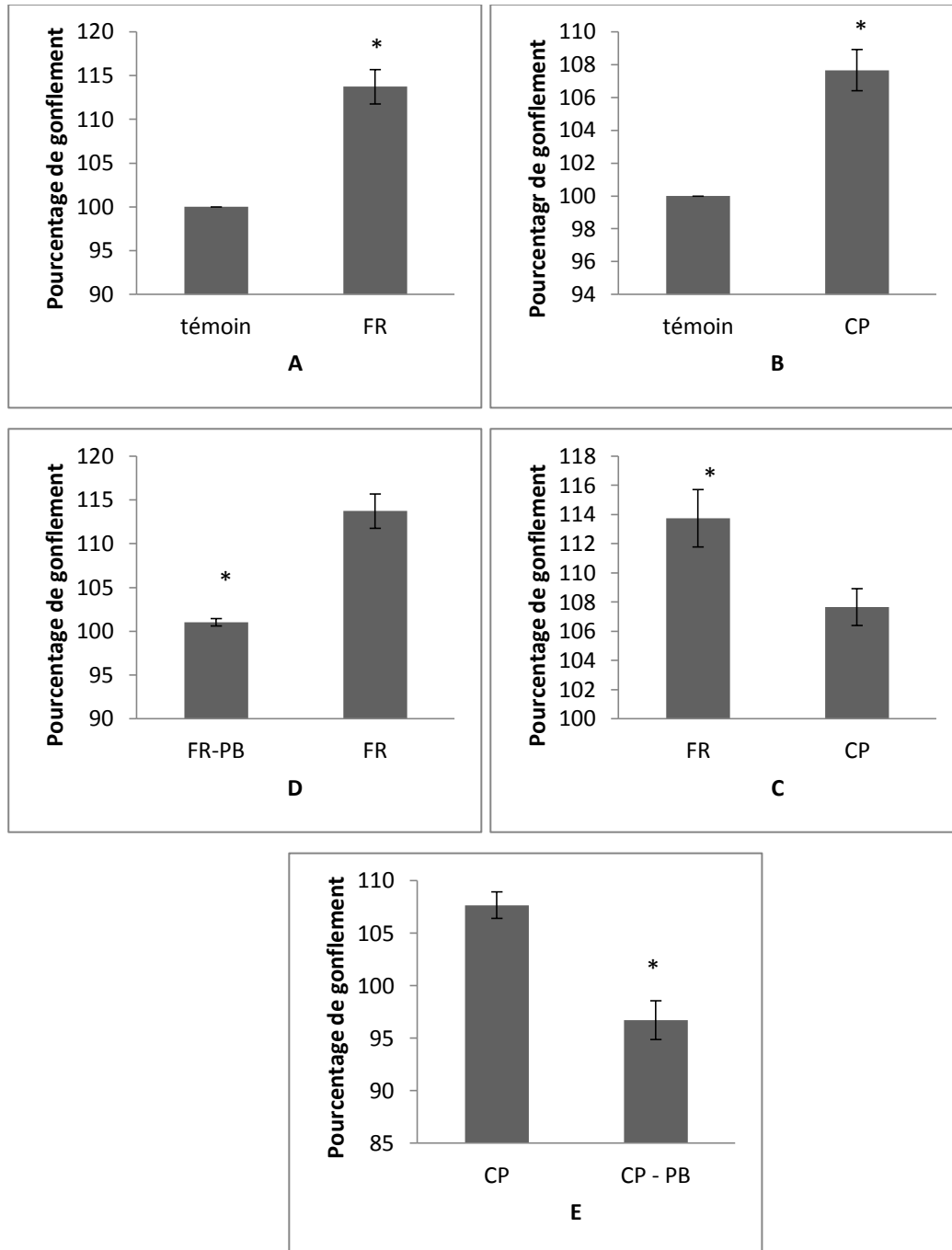
Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) (fig : 28 E) présentent une diminution non significative du taux de GSH ( $p > 0,05$ ) dans le tissu pulmonaire sain en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seulement. De même l'association du Féruléol au phénobarbital a montré une diminution non significative du taux de la GSH en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg de Féruléol seul (fig :28D).

### **III.2.3. 5. Evaluation du taux du gonflement (swelling) mitochondrial dans la cellule saine du poumon**

L'administration du CP a été accompagnée par une augmentation du gonflement mitochondrial, c'est une augmentation significative ( $p < 0,05$ ) en comparaison avec le groupe témoin (fig :29 B).

Les animaux traités par le Féruléol ont montré une augmentation significative du gonflement mitochondrial en comparaison avec les animaux du groupe témoin, de même, en comparaison avec les animaux traité par le CP, nous avons remarqué que le Féruléol a présenté une augmentation significative du taux de gonflement (fig :29 C).

Le groupe d'animaux recevant une chimiothérapie par le CP à une dose unique de 80 mg / kg par voie IV, présente une diminution significative du taux de gonflement mitochondrial en comparaison avec le groupe d'animaux traité par la Féruléol à une dose de 50 mg / kg per os pendant 5 jours.



**Figure 29:** taux du gonflement (swelling) mitochondrial dans la cellule cancéreuse du poumon

. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type (n=6). Test de Mann Whitney : (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) désigne un effet hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

Les animaux recevant la chimiothérapie par le CP en association avec le phénobarbital (50 mg / kg) (fig : 29 E) présentent une diminution significative du taux de gonflement mitochondrial ( $p < 0,05$ ) dans le tissu pulmonaire sain en comparaison avec le groupe d'animaux recevant la chimiothérapie seulement. De même l'association du Férulénol au phénobarbital a montré une diminution significative du taux de gonflement en comparaison avec le groupe recevant une dose de 50mg /kg de Férulénol seul (fig :29D).

# Discussion

### IV. 1. Etude I

Comme indiqué précédemment par de nombreuses études, la propolis possède de nombreuses propriétés anti-oxydantes et anti-apoptotiques. Les composés phénoliques (flavonoïdes et dérivés de l'acide phénolique) sont les principaux constituants pharmacologiquement actifs de la propolis.

Cependant, les constituants de la propolis varient considérablement en raison du climat, de la saison, de l'emplacement et, par conséquent, sa formule chimique n'est pas stable (Cheng, P. C., Wong, G. (1996). À la suite de cela, la composition chimique de la propolis de l'Algérie orientale (Jijel) a été étudiée afin de déterminer les composés majeurs en utilisant GC-MS. L'analyse chimique a indiqué que la propolis l'échantillon avait des concentrations élevées de flavonoïdes (37 mg de flavonoïdes par gramme de propolis) qui sont responsables des propriétés anti-oxydantes de la propolis telles que la pinostrombine, la galangine, la naringénine et la tectochrysin en plus des composés communs comme les terpénoïdes et les acides aromatiques.

Certaines études expérimentales sur des animaux ou des lignées cellulaires humaines ont démontré les propriétés antioxydantes des flavonoïdes et leur rôle central dans la prévention des maladies (Scalbert, A et al., 2005). Ces molécules ont la capacité de capturer et de désactiver le radicaux libres (Tolomeo. Met val., 2008 ; Han.X et al., 2008). Ils agissent par inhibition de l'interaction entre les radicaux libres et l'ADN, et par la protection des membranes cellulaires (Horakova. K., 2001). Lac cible mitochondriale était évoquée pour expliquer les effets protecteurs (Horakova. K., 2001 ; Marc, W. F et al.,2005).

On a signalé que les flavonoïdes de l'extrait de propolis protègent les tissus du foie et du cœur chez les rats traités avec des médicaments anticancéreux (Alyane, M et al., 2008 ; Benguedouar, L et al., 2008) , nous avons émis l'hypothèse que l'effet protecteur des flavonoïdes pourrait être due à une action directe sur les fonctions mitochondriales. Il est vrai que les mitochondries contrôlent le stress généré par une grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui jouent un rôle important dans l'évolution des lésions cellulaires (Ferrari. R., 1996 ; Sastre. J et al.,2000 ). Une relation étroite entre le potentiel de la membrane mitochondriale et la production de ROS a été démontré (de

## Discussion

---

Groot.H., Rauen. U.,1998 ; Galati.G., O'Brien., 2004 ; Korshunov.S et al., 1997). Cependant, une stratégie antioxydante mitochondriale protectrice peut empêcher la cascade d'oxydant soit par la prévention de la production de ROS ou la neutralisation des radicaux libres par un effet piègeur (de Groot. H., Rauen. U. 1998 ; Hanasaki, Y et al.,1994 ). Nos données indiquent que l'interaction des flavonoïdes de la propolis avec les mitochondries et la protection de l'ouverture de la PTP est probablement le mécanisme par lequel les cellules sont conservées du dommage oxydatif.

De plus, la diminution du potentiel membranaire est due à l'interaction de féruléol avec le PTP et avec d'autres récepteurs mitochondriaux. Une interaction de l'extrait de propolis avec PTP pendant son effet protecteur est possible en ce qui concerne l'action pour restaurer la chute du potentiel de la membrane mitochondriale.

L'ouverture du PTP est fortement liée à l'état redox des groupes thiols mitochondriaux et des nucléides pyridine et est directement modulée par le potentiel membranaire, en fonction des conditions expérimentales utilisées. Par conséquent, cette PTP dépendant du potentiel membranaire est directement modulée par le changement de potentiel membranaire (Appendino,.G et al., 2004 ; Crompton.M., 1999 ; Ligeret.H et al., 2004). Le gonflement induit par le feruléol et qui était dû à l'ouverture du PTP a été évité par 10 et 100  $\mu\text{M}$  d'extrait de propolis. En effet, dans nos expériences, nous avons exploité le protocole décrit par Bernardi et al. (Bernardi.P et al., 1993) qui induisait la PTP par l'addition d'un découpleur des mitochondries qui ont accumulé le  $\text{Ca}^{2+}$  en mesure d'induire l'ouverture du PTP en soi. Cet effet traduit le fait que le ouverture du PTP est fortement liée à l'état redox des groupes thiols. Le pore peut être ouvert par dépolarisation de la membrane mitochondriale. Dans ces conditions expérimentales, l'extrait de propolis était capable non seulement d'inhiber le gonflement mitochondrial à des concentrations moyennes, mais aussi pour favoriser le gonflement quand il a été ajouté aux concentrations de pro-oxydant (1 et 0.1  $\mu\text{M}$ ) (Crompton.M., 1999 ; Lahouel, M et al.,2006 ; Ligeret.H et al., 2004) confirmant l'interaction de l'extrait de propolis avec la PTP.

Les mitochondries jouent un rôle important dans l'induction du processus apoptotique. Pendant ce type de mort cellulaire, un certain nombre d'événements successifs ont lieu, en commençant par une perturbation de la respiration mitochondriale, un changement du



## Discussion

---

potentiel de la membrane mitochondriale où le pore de transition de perméabilité (PTP) est impliqué. En outre, une inhibition de la respiration, une inhibition de la synthèse de

l'ATP, un développement d'une asymétrie membranaire suivie d'une libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome C et espèces réactives de l'oxygène.

La forte concentration intra-mitochondriale de calcium empêche le transport d'électrons de la chaîne respiratoire et ensuite la phosphorylation oxydative, ou active les principales enzymes responsables de la génération de ROS (Horakova, K et al., 2001) Alternativement, les pro-oxydants induisent l'oxydation des groupes thiol du pore menant à leur ouverture. Enfin, il est également proposé que le stress oxydatif stimule la libération de calcium mitochondrial qui peut encore être absorbée par les mitochondries et quelle absorption excessive de calcium peut être responsable de la membrane mitochondriale transition de perméabilité (MMPT). Par conséquent, l'oxydation des groupes thiol a comme conséquence principale l'ouverture de PTP. On pense que le mécanisme d'action des flavonoïdes de la propolis sur le gonflement mitochondrial est similaire à celle proposée par Jian et Riyi (Jian.L, Riyi.S., 2005) pour l'acide salvianique; cette molécule extraite de *Salvia miltorrhiza*

Nous pouvons également proposer que l'extrait de propolis testé, rivalise les ions calcium, empêchant ensuite leur fixation sur leur site au niveau du pore de transition et par conséquent induire l'inhibition du gonflement et de l'apoptose.

Donc, nos résultats démontrent que l'extrait de propolis, riche en composants flavonoïdes, est capable de restaurer la perturbation du potentiel membranaire induite par le composé découplant naturel "ferulénol" , en interagissant avec la chaîne respiratoires mitochondriales, qui inhibe l'oxydation des pores thiols de transition de perméabilité et empêche son ouverture. En conclusion, l'extrait de propolis pourrait être un agent thérapeutique prometteur assurant une protection contre plusieurs agents chimiopharmaceutiques , en corrigeant la toxicité des agents actifs utilisés dans le traitement du cancer.

### IV. 2. Etude II

L'objectif principal de cette recherche est d'évaluer les mécanismes de toxicité induits par le Féruléol, utilisé, dans la présente étude, comme agent pro-oxydant *in vivo*, sur des rats cancéreux et sains. En premier lieu, on a voulu déterminer si le Féruléol induit un stress oxydant dans les cellules cancéreuses et saines, on le comparant à l'agents chimiothérapique, le cyclophosphamide. En second lieu, voir si leur association à l'inducteurs enzymatique, le phénobarbital, risque de potentialiser l'effet prooxydant .

Pour cela on a commencé d'abord par l'induction du cancer pulmonaire chez les rats wistar, on a réussi à avoir une tumeur expérimental , induite par le benzo(a)pyrène.

Le benzo(a)pyrène, constituant important de la fumée, a été identifié comme l'un des agents responsables du cancer de poumon. Cet hydrocarbure polycyclique n'est pas capable de réagir par lui-même avec l'ADN mais après trois cycles d'activation (CYP1A1, EH, CYP3A4) il se transforme en un diol époxyde très réactif et très mutagène. La formation de cet adduit est donc sous la dépendance de l'expression de ces trois enzymes et de celle de l' isoenzyme  $\mu$  du glutathione S-transferase (GST $\mu$ ) qui neutralise l'époxyde intermédiaire.

Il a été montré qu'un des génotype du CYP IAI induisait un risque plus élevé de développer un cancer du poumon (Kawajiri et coll. 1995, 1996). De même le déficit en GST $\mu$  est un facteur de risque. Le CYP 2D6 a été également étudié , mais les résultats sont très contradictoires et aucun précancérogène connu de la fumée de tabac, y compris le B(a)p, n'est métabolisé significativement par ce CYP (Bouchardy et coll. 1996).

De plus il a été trouvé plus d'adduits à l'ADN dans le poumon de fumeurs que dans ceux de non-fumeurs, en particulier des adduits à l'ADN. Enfin, plus récemment il a été montré que p53 était, comme dans les autres types de cancer, fréquemment mutée. Les mutations les plus souvent rencontrées correspondent bien à celles provoquées *in vitro* ou *in vivo* par le diol du benzo(a)pyrène (Denison et coll. 1995). En effet les adduits du benzo(a)pyrène à l'ADN ont une spécificité de base et de séquence et peuvent induire des mutations dans des sites spécifiques de gènes comme celui de la p53. Le poumon et les voies aérodigestives sont les cibles principales de ces toxiques puisque les toxiques sont inhalée et que les systèmes d'activation sont présents dans ces organes.

Chez le rat, après administration intrapéritonéale, la quantité la plus importante d'adduits à l'ADN se trouve dans les poumons ; elle est en corrélation avec la quantité d'adduits dans les

## Discussion

---

leucocytes. Les adduits à l'ADN sont encore détectables 56 jours après la fin de l'exposition au B(a)p (Qu SX et al 1996).

Le stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs et peut être de la plupart des voies pathologique. C'est un syndrome au cours duquel les éléments pro-oxydants dépassent la capacité antioxydant de l'organisme. Il en résulte un déséquilibre entre pro-oxydant et anti-oxydant (Temple, 2000).

Les origines du stress oxydant sont multiples et mènent à la formation des espèces réactives de l'oxygène. En effet, il est clairement démontré aujourd'hui que les radicaux libres sont responsables de processus toxiques, et sont impliqué dans les maladies neurodégénératives, inflammation, diabète, altersclérose, cancer, mais également dans les phénomènes de vieillissement (Szewczyk et Wojtczak 2002).

Le niveau de la peroxydation lipidique dans les poumons des animaux traités par le B(a)P à augmenter significativement en comparaison avec les animaux du groupe témoin Nos résultats sont en accord avec les données de Raja et *al* (2007) qui démontrent une augmentation de la LPO au cours du cancer pulmonaire induit par le B(a)P chez les souris. Comme le malondialdéhyde et d'autres aldéhydes (thiobarbituric réactive substances, TBARS) sont formées en raison de la peroxydation lipidique induite par les ERO générés au cours du métabolisme du B(a)P via les CYP 450 (Byczkowki. J et al 1990) . Il a été réclaté que le MDA agit comme un promoteur de tumeur et un agent co-cancérogène du fait de sa haute toxicité et de son action inhibitrice des enzymes protectrices (Marnett et *al.*, 1999).

Nos résultats confirme ceux d'autres études où les produits de LPO comprennent les aldéhydes comme le MDA, ont été trouvés avec des taux très élevés lors du traitement au B(a)P et ont également été trouvés impliqués dans la formation de tumeurs en interagissant avec l'ADN pour former des adduits MDA-ADN. Ces dernies induisent des altérations génétiques ainsi qu'une inhibition d'enzymes protectrices aboutissant à la carcinogènèse (Kasala et al., 2015). Une autre étude a montré que les B(a)P-quinones étaient les plus efficaces dans la production de MDA chez les rats lorsque ces derniers ont été traités avec le B(a)P ou avec l'un de ces métabolites, y compris les B(a)P-quinones. Les résultats de la même étude suggèrent que les ROS générés pendant le cycle redox des B(a)P-quinones peuvent interagir avec les lipides membranaires et par conséquent induire une peroxydation des lipides, qui est directement associée à la formation continue de B(a)P-quinones (Kim et al., 2000).

## Discussion

---

L'administration du B(a)P à une dose de 100 mg / kg a causé une diminution significative dans l'activité de la CAT pulmonaire en comparaison au groupe témoin Il a été clairement documenté que les antioxydants enzymatiques CAT, (Ho et *al.* , 2007) et la GST (Rajat et *al.* , 2006) présentent des taux faibles dans les cellules cancéreuses.

La catalase est une protéine de l'hème qui catalyse la dégradation directe de peroxyde d'hydrogène en eau. Elle protège les constituants cellulaires contre le dommage oxydatif (Peter .J et al ; 1968). La SOD, qui convertit le radical super oxyde vers le peroxyde d'hydrogène, est largement distribuée dans les cellules douées du métabolisme oxydatif et elle est reconnue de protéger les cellules contre l'effet toxique de l'anion superoxyde (fridovish. ,1975). la GST est un groupe de protéines multifonctionnel qui exécute des taches allons de la catalysassions de la détoxification des composés électrophiles jusqu'à la protection des dommages peroxydatives ( Sheehan . Det al 2001).

Dans les deux dernières décennies, les ERO ont été impliqué dans chaque étapes du développement d'un cancer ; initiation, promotion et progression (Geou-Yarh et al ; 2010) . En addition, les niveaux des enzymes antioxydantes telles la CAT, SOD, ont été démontrés d'être altérées dans les cellules cancéreuses (Renschler et al ., 2004) . Il a été longtemps documenté que les cellules tumorales sont sous un stress oxydatif persistant et que le système antioxydant dans les cellules cancéreuses est sous attaque constant comme il doit faire face à ces ERO étant produits. la baisse de l'activité de la catalase dans le cancer pourrait être attribuée à la consommation de cette enzyme suite à la production excessive de peroxyde d'hydrogène (Padmavathi et *al.* , 2006). Cette diminution peut être dûe à la surproduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui a été transformé par la SOD, ce qui a nécessité le recours à de grandes concentrations en catalase pour les éliminer (Gardès-Albert et al., 2003).

Ce résultat sont confirmés par une autre étude confirmé qui démontre la présence de faibles concentrations en SOD et en catalase dans les tissus atteints d'un cancer du poumon et qui pourrait être liée à l'augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN et aux protéines ou à l'accumulation d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène ce qui entraînerait la consommation de ces enzymes (Jaruga et al., 1994). Kim et Lee, (1997) ont rapporté que le traitement par le B(a)P entraîne une diminution de l'activité de la SOD et de la catalase dans plusieurs organes des animaux étudiés y compris le poumon. Cette diminution est due aux modifications oxydatives de ces deux enzymes par formation des

## Discussion

---

groupements carbonyle qui seront des excellents substrats pour le système protéolytique intracellulaire et les protéases.

Le traitement des animaux par le B(a)P a diminué de façon significative ( $p < 0,05$ ) le niveau du GSH dans les cellules pulmonaires. Alors que, le traitement des animaux par le CP a diminué le niveau de glutathion très significativement ( $p < 0,01$ ) en comparaison avec le groupe témoin, les animaux traités par le Férulénol ont montré également, une diminution très significative dans le taux du GSH.

Le GSH joue un rôle vital dans la désintoxication des composés xénobiotiques et dans l'antioxydation des ERO et des radicaux libres (Kosower et al., 1978), son accumulation est maximale dans les poumons (Moron et al., 1979).

La diminution du niveau de GSH signifie une augmentation du stress oxydatif. Dans notre étude, nous avons observés un déclin dans le niveau de GSH chez les animaux traités par le B(a)P qui peut être dû à l'utilisation excessive de cet antioxydant dans la cellule tumorale en prolifération (Anandakumar et al., 2008) ou à son utilisation intense pour scavenger les peroxydes lipidiques qui peuvent modifier le statut redox vers le stress oxydatif (Kalpana et al., 2010).

Navaro et al., (1999) a admis que la cellule cancéreuse montre une déplétion dans le taux de GSH, ou il a expliqué cette déplétion par les changements de l'activité des antioxydants enzymatiques reliés au GSH. Aussi bien, il est admis que la formation de métabolites réactifs consomme du GSH quand elle est importante et que cela aboutit à une diminution de ce dernier (Settaf et al., 2000). D'autres études, ont montré que la fumée de cigarette qui contient de nombreux composés électrophiles comme le B(a)P, épuise également les niveaux de GSH dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaire (Rahman et Macnee, 1999)..

Le traitement des animaux par la B(a)P (groupe B(a)P) a causé une production excessive de  $O_2^\circ$  menant à l'inactivation du GPx ce qui entraîne l'accumulation de  $H_2O_2$ , inactivant de ce fait la SOD comme il a été rapporté par Kakkar et al. (1997).

Le cyclophosphamide (CP) est employé intensivement comme un agent antinéoplasique pour le traitement de divers cancers incluant le cancer du poumon (Cooper et White, 1986). La chimiothérapie par les drogues cytotoxiques comme le CP a été associée à la considérable toxicité des poumons chez les animaux (Patel et Block, 1984) aussi bien que chez les humains (Cooper et White, 1986).

## Discussion

---

Plusieurs études ont démontré que le CP est métabolisé au niveau du poumon. L'expression des protéines CYP3A dans le poumon humain, notamment dans les bronches et les cellules épithéliales alvéolaires, les ganglions bronchiques et les macrophages alvéolaires. Le CYP 3A4 est la principale enzyme CYP 3A pulmonaire (Lepers . C ; 2010).

Oyama *et al.* (2007) a trouvé l'expression des CYP 3A dans seulement 40% des adénocarcinomes. Comme ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme de nombreux médicaments anticancéreux (Michael et Doherty, 2005), cela pourrait influencer la réponse à la chimiothérapie ultérieure (Miyoshi *et al.*, 2002). Chez les rats, il a été montré que l'administration d'une dose unique du CP a entraîné une augmentation des niveaux d'ARNm de CYP 3A (Xie *et al.*, 2005).

Dans notre étude, l'administration du CP a été accompagnée par une augmentation de la LPO et une élévation significative ( $p < 0,05$ ) du taux de produit de LPO, le malondialdéhyde (MDA) a été observée en comparaison avec le groupe témoin.

Nos résultats, confirment ceux obtenus par (Patel *et al.*, 1990 ; 1993), ils ont conclu que la peroxydation lipidique induite par le CP dans le poumon, est due à son métabolite réactif l'acroléine. De même Adams et Claidman (1993) ont confirmé que l'acroléine a la capacité d'initier la LPO.

L'acroléine est formée pendant le métabolisme du cyclophosphamide, l'agent chimiothérapeutique utilisé dans la présente étude, (Cox, 1979; Ghilarducci et Tjeerdema, 1995; Ramu *et al.*, 1996). L'acroléine est aussi produite lors de la peroxydation des lipides membranaires générée par un stress oxydatif, qui est impliqué dans plusieurs désordres pulmonaires (Nath *et al.*, 1997; World Health Organization, 2002).

Il a été rapporté dans la littérature chez le rat que l'acroléine est métabolisée par différentes enzymes, telles que l'époxydase et le cytochrome P450 des microsomes du foie et du poumon. (Patel *et al.*, 1980).

La peroxydation lipidique induite par l'acroléine a été suggérée d'altérer la structure et la fonction membranaire causant des anomalies cellulaires telles les mutations et l'apoptose. L'augmentation de la production des radicaux libres stimule la peroxydation lipidique et elle est la source de la dégradation de l'ADN, les lipides et les carbohydrates (Subramanian *et al.*, 2006). La peroxydation lipidique induite par le CP dans les poumons peut être due à une production élevée des ERO ou à une diminution du statut antioxydant (Subramanian *et al.*, 2006).

## Discussion

---

Il a été suggéré également qu'un stress oxydatif intense peut aider les cellules cancéreuses à résister aux agents chimiothérapeutiques. En effet, un tel stress peut provoquer la peroxydation des lipides membranaires, ce qui amène une génération d'aldéhydes capables d'inhiber l'apoptose (Conklin *et al.*, 2004). Certains agents chimiothérapeutiques agissent en induisant l'apoptose chez les cellules cancéreuses. Ce type de chimiothérapie pourrait donc tirer avantages d'un usage parallèle d'antioxydant (Philippe –aubert, 2006).

L'antioxydant enzymatique CAT dans les poumons des rats, et après administration du CP, a augmenté d'une manière significative ( $p < 0,01$ ).

Dans l'étude de Marika *et al.* (2009), il a été prouvé que la concentration de la plupart des antioxydants montre une augmentation, au cours de la chimiothérapie, où cette augmentation peut être due à l'activation des mécanismes de défense antioxydant pour combattre l'assaut des ERO produits au cours de la chimiothérapie. Ceci est bien marqué dans notre étude où le traitement avec l'agent chimiothérapeutique CP a activé le système antioxydant enzymatique CAT préexistant chez les animaux traités par le B(a)P.

Dans cette étude, le traitement des rats atteints de cancer pulmonaire par le CP seul, a montré une diminution hautement significative ( $p < 0,01$ ) du taux de GSH,

Nos résultats sont en accord avec l'étude de Anna *et al.* (2002), qui a expliqué cette déplétion par la réaction de conjugaison du GSH avec l'acroléine, d'une part, et d'autre part par l'inactivation du glutathion-réductase, enzyme catalysant la conversion du GSSG en GSH, causé par les radicaux libres et les aldéhydes. Ceux-ci sont la cause de la déficience en GSH pulmonaire durant l'administration du CP. Ceci est très nuisible, car le GSH joue un rôle important dans la protection de la surface pulmonaire contre les attaques oxydatives (Kelly, 1999).

Il est bien clair que le métabolisme pulmonaire du CP génère des métabolites réactifs. (Lee *et al.*, 1996), L'acroléine lie et épuise rapidement les nucléophiles cellulaires particulièrement ceux contenant un groupement thiol tels que le glutathion (Kehrer et Biswal, 2000). En participant à la réaction d'oxydoréduction via l'oxydation réversible de sa fonction thiol active, le glutathion (GSH) maintient l'équilibre entre les forces oxydantes et réduites de la cellule (Dickinson et Forman, 2002), la protégeant ainsi contre les molécules oxydantes et les électrophiles (Kehrer et Biswal, 2000). En plus, le glutathion est impliqué dans la régulation des signaux de transduction d'oxydoréduction de plusieurs fonctions biologiques

## Discussion

---

dont la prolifération cellulaire, l'inflammation et l'apoptose (Sen, 2000; Biswal *et al.*, 2002; Filomeni *et al.*, 2002).

Le taux de l' $O_2^-$  a augmenté d'une façon hautement significative chez les rats traités par le CP, en comparaison avec le témoin.

Il a été signalé que l'acroléine induit la formation de ROS (Luo *et al.*, 2005). Ceci est une nouvelle contribution à la connaissance de la toxicité de l'acroléine, qui peut augmenter la production de ROS en réduisant rapidement la quantité de ses antioxydants, tels que le glutathion, qui inhibe la détoxification de  $H_2O_2$ . La chaîne de transport d'électrons est responsable des effets toxiques de l'exposition à l'acroléine (Luo *et al.*, 2005), qui altèrent de manière significative les fonctions mitochondriales, telles que la respiration cellulaire et la production d'ATP (Kim, B *et al.*, 2016).

L'administration du CP, a provoqué un gonflement mitochondrial accru dans les cellules cancéreuses, ce qui a abouti probablement un état apoptotique des cellules néoplasiques.

Plusieurs travaux ont expliqué le rôle des ROS, produits par l'acroléine, dans l'induction de l'apoptose.

Un taux très élevé de ROS est associé à l'induction de la mort de la cellule dans la plupart des cas par apoptose. Cette induction peut être directe, car les ROS sont capables de provoquer l'oxydation des résidus cystéines de la protéine ANT qui fait partie des pores mitochondriaux, permettant la libération du cytochrome C et la formation de l'apoptosome (Costantini P. *et al.*, 2000). Elle peut aussi être indirecte, lors de dommages trop importants, par exemple lors de l'accumulation de dommages de l'ADN qui vont déclencher l'apoptose dans la cellule (De Zio D. *et al.*, 2013).

l'acroléine cause généralement une inhibition de la prolifération cellulaire (Agostinelli *et al.*, 1994; Agostinelli *et al.*, 1996; Biswal *et al.*, 2002) qui induit la mort par nécrose (Rudra et Krokan, 1999), par oncose (Kem et Kehrer, 2002) ou par apoptose (Li *et al.*, 1997a; Nardini *et al.*, 2002; Tanel et Averill-Bates, 2005; Tanel et Averill-Bates, 2007).

L'apoptose induite par l'acroléine dépend clairement du type de cellule (Kern et Kehrer, 2002). Une étude a été réalisée dans des cellules A549 en prolifération d'un adénocarcinome pulmonaire humain, afin de déterminer si l'acroléine induit l'apoptose par la voie des récepteurs de la mort. Cela a été partiellement confirmé dans les cellules A549 exposées à



## Discussion

---

l'acroléine par une expression accrue de FasL (Tanel et Averill-Bates, 2007a), et une expression réduite de FasR due à l'acroléine au niveau de la membrane.

La diminution de FasR au niveau de la membrane extra-cellulaire pourrait également s'expliquer par l'internalisation du cluster FasL-FasR suite à l'activation du récepteur (Henkler et al., 2005). Ces résultats suggèrent que l'aéroléine induit la liaison de FasL et de FasR qui déclenche la voie du récepteur de la mort. En outre, l'activation de la voie du récepteur de la mort a été confirmée par l'activation de la caspase 8.

On sait que la caspase-8 est activée après le recrutement de FADD et du récepteur de la mort. La caspase-8 semble être la principale caspase initiatrice lors de l'apoptose médiée par les récepteurs de la mort (Curtin et Cotter, 2003).

Des travaux plus récents ont montré que les ROS peuvent induire l'expression de FasL (Wang et al., 2008) et sont impliqués dans l'activation de la caspase-8 lors de l'apoptose (Perez-Cruz et al., 2007). La récupération de ROS par la PEG-catalase a empêché la régulation positive de l'expression de FasL et augmenté l'activité enzymatique de la caspase-8. Ces résultats indiquent que les ROS sont un facteur en amont requis pour l'apoptose médiée par Fas induite par l'acroléine chez les cellules A549 pulmonaire.

L'acroléine peut aussi exercer ses effets antiprolifératifs en se liant à l'ARN polymérase, causant ainsi une restriction sur la transcription (Moulé *et al.*, 1971; Horton *et al.*, 1997).

L'acroléine a aussi la capacité d'initier la peroxydation lipidique (Patel, 1993; Adams et Klaidman, 1993).

L'une des caractéristiques du cancer étant le développement d'un défaut des voies de signalisation apoptotiques (Hanahan et Weinberg 2000), de nombreuses thérapies ont pour but d'induire l'apoptose pour éliminer les cellules cancéreuses (Galluzzi, Larochette et al. 2006; Fulda, Galluzzi et al. 2010). La majorité des voies de signalisation converge vers la mitochondrie pour déclencher une perméabilisation de ses membranes, faisant de la mitochondrie une cible de choix dans les traitements anti-cancéreux, une stratégie qui permet d'amener à l'apoptose des cellules tumorales (Galluzzi, Larochette et al. 2006; Ralph and Neuzil 2009).

## Discussion

---

L'apoptose est considérée comme une stratégie de choix pour éliminer les cellules tumorales. Cependant, une des caractéristiques du cancer est l'acquisition de la résistance à la mort cellulaire. Cette résistance peut, entre autre, être expliquée par le développement d'une tolérance à différents stress cellulaires. Ces stress peuvent entraîner des altérations responsables de l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques et de l'activation de voies de survie. Il est donc important d'identifier de nouvelles approches pour sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort cellulaire (Solary .E ; 1993) .

Ces nouvelles stratégies seront capables de cibler certaines spécificités des cellules tumorales comme les stress cellulaires, les protéines anti-apoptotiques ou les voies de survie. Elles pourraient être utilisées en combinaison avec des molécules existantes pour sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose voire même à la nécrose (Ghobrial I et al ; 2005).

Dans la présente étude, on a testé l'effet pro-oxydant du féruléol ( un coumarine extrait de la plante *ferulla vescuritensis*) dans les cellules cancéreuse de poumon, cherchant ainsi son effet antiprolifératif, comme composé pur naturel.

Les Coumarines ont suscité un vif intérêt au cours des dernières décennies en raison de leurs différences propriétés pharmacologiques et biologiques. Parmi ces caractéristiques, leur effets cytotoxiques et anticancéreux qui ont été mis en évidence (Kostova.,2005). Selon des études antérieures, Les coumarines ont le potentiel d'inhiber la croissance dynamique de la tumeur à partir des lymphocytes, de l'estomac, les tissus du côlon et du foie, de manière dose-dépendante (U. Weber.,1998).

L'administration du feruléol, a provoqué une augmentation hautement significatif du taux du MDA, du taux de l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> et du gonflement mitochondrial et une augmentation significatif de l'activité enzymatique de la catalase,, alors qu'il a provoqué une diminution du taux de GSH. dans les cellules cancéreuses chez le rat, en comparaison avec le témoin, et une différence d'effet remarquable par apport aux CP et aux B(a)P.

Nos résultats , montrent que le feruléol provoque un stress sérieux dans les cellules cancéreuse de poumon, ces résultats son en accord avec ceux de Hasanzadeh .D et al (2017),

## Discussion

---

qui ont montré que le Farnesiferol C ( une coumarine isolée de *ferula asafoetida*) augmente significativement des taux de MDA dans les cellules tumorale, ainsi que l'activité de la catalase. Ils ont démontré que le Farnesiferol C pourrait être un candidat approprié pour le traitement du cancer pour induire un stress oxydatif dans les cellules tumorales .

Il a été récemment rapporté des propriétés antiprolifératives et pro-apoptotiques de Farnesiferol , avec une augmentation du rapport Bax / Bcl-2 en tant que puissant indicateur de l'apoptose sur les cellules cancéreuses gastriques (Z. Aas et al.,2015)

De même l'étude de (M. Unnikrishnan et al.,1990), a démontré que l'acide galbanique (GBA), composé majeur de *Ferula asafoetida*, était connu pour ses effets cytotoxiques : anti-angiogéniques et pro- apoptotiques dans le cancer de la prostate. En outre, GBA a activé de manière significative la caspase-9 et Bax et réduit l'expression de Bcl-2, Bcl-xL dans les cellules cancéreuse .

Ainsi, Qun Wei et al (2018) ont synthétisée la HCP1, une coumarine, qui a induit l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires..

Pour comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels on inhibe la croissance cellulaire et on induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses du poumon, Guoying Zhang et al ont étudié les effets des protéines TFC et TNC sur la croissance cellulaire et l'apoptose. Ils ont montré que TFC et TNC nettement réduit les taux de protéine Bcl-2 dans des cellules cancéreuse de). En outre, TFC et TNC ont régulé de manière remarquable les taux d'expression de Bax , cytochrome c, caspase-3 dans les cellules cancéreuse. ( Guoying et al 2014).

Récement, (Wang. et al, 2018) ont remarqué que le composé 8b, un nouveau dérivé de coumarine avec un groupe phénylsulfonylfuroxane , présente une activité antiproliférative significative contre les cellules d'adénocarcinome du poumon, en induisant une apoptose caspase dépendante, tout en augmentant le niveau de Bcl-2 . L'apoptose est déclenchée et exécutée via les caspases 3 qui sont l'une des caspases effectrices importantes.

Ces résultats ont montré que le composé 8b régule la baisse le taux de protéines de Bcl-2, ce qui suggère que l'autophagie pourrait être induite par la libération de Beclin-1, le clivage de Beclin 1 induit par la caspase favorise la diaphonie entre l'apoptose et l'autophagie.

## Discussion

---

En effet, la même étude de Wang. Q et al , confirment que ce même composé déclenche l'autophagie dans l'adénocarcinome du poumon et que l'inhibition de cette autophagie renforce l'apoptose.

Dans le même contexte, (Liu et al ; 2014) ont synthétisé un oxyde nitrique à base de furoxane (NO) libérant le composé 8b, dérivé de la coumarine, qui présente une forte Activité anti-tumorale dans le poumon par induction de l'apoptose et de l'autophagie.

(Goel et al., 2007) ont synthétisé un Dérivé de la coumarine : le 7, de 8-dihydroxy-4-méthyle (DHMC) qui provoque l'apoptose dans les cellules d'adénocarcinome du poumon par voie dépendante de la caspase par suppression partielle de signalisation Erk / MAPK..

Les caspases et les protéines de la famille Bcl-2, les deux jouent un rôle important dans l'apoptose cellulaire (Ashkenazi et Salvesen, 2014). En général, les stimuli cytotoxiques inhibent la molécule de protéine prosclvival Bcl-2, puis activent l'effecteur proapoptotique Bax qui déclenche à son tour une activation en cascade de l'effecteur caspases telles que les caspases 3 (Czabotar et al., 2014).

Puisque les cellules cancéreuses ont des niveaux accrus de ROS qui jouent un rôle important dans la cancérogenèse, et que les agents pro-oxydants augmentent les niveaux cellulaires de ROS, il est reconnu que ces agents peuvent induire une carcino- effets génétiques. Mais lorsque les agents pro-oxydants augmentent le niveau de ROS à des niveaux cytotoxiques, ces agents peuvent induire la destruction sélective des cellules cancéreuses et être thérapeutiquement utile. Il est important de mentionner que tous ces effets peuvent être réalisé par des agents ayant des propriétés à la fois antioxydant et pro-oxydant (par exemple la curcumine), qui peuvent agir comme chimio- agents préventifs, cancérigènes et chimiothérapeutiques principalement en fonction de la concentration utilisé (Lopez-L et al 2007, 2008).

Le rôle des ROS dans le traitement du cancer est de plus en plus reconnu et induit le stress oxydatif par des agents oxydants apparaissent comme une stratégie anticancéreuse attrayante. (Lopez-L et al 2007- Pelicano H., et al 2004, Fang J et al., 2007 -43 Engel RH., 2006). Des données récentes suggèrent que ROS participe dans l'activité anticancéreuse de nombreux agents chimiothérapeutiques couramment utilisé dans la clinique, y compris le paclitaxel,

## Discussion

---

docetaxel, le cisplatine, la doxorubicine, le trioxyde d'arsenic, le bortézomib, la bazine et l'étoposide (Alexandre J et al., 2006a, Alexandre J et al., 2007, Renschler MF., 2004, Fang Jet al 2007, Alexandre J et al 2006b- Geng CX et al., 2003). Des expériences récentes ont montré que l'accumulation de  $H_2O_2$  est une étape cruciale qui induit par la mort cellulaire des cellules cancéreuse à la fois in vitro et in vivo (Alexandre J et al., 2006a, Alexandre J et al., 2007).

Pour l'effet pro oxydant du Ferulénol, on peut émettre plusieurs hypothèse :

Le Férulénol a peut être engendré L'activation de la mitochondrie qui est considérée comme un point de « non retour » lors du déclenchement de l'apoptose (Green & Amarante-Mendes, 1998), ce qui en fait une cible particulièrement intéressante. L'activation de la mitochondrie peut passer par l'intermédiaire des protéines de la famille Bcl-2 qui agit sur les pores membranaires, notamment par des stratégies, antisens visant à réprimer l'expression de Bcl-2 (Nicholson, 2000; Yuen & Sikic, 2000) ou de la thérapie génique pour sur exprimer les Bax.

Il est probable que le Ferulénol, était capable d'induire la production de ROS Dans les cellules tumorales, processus qui a récemment attiré l'attention dans le traitement du cancer. Une Partie du mécanisme du Ferulénol reposerait sur la régulation de la GST-P1, Une enzyme qui participe dans le métabolisme du glutathion (Raj L. Et al., 2011). Cependant, l'efficacité de la férulénol dans les cellules cancéreuse de poumon dépendrait du taux d'expression de la proteine PGC1--alpha. En effet, l'expression de PGC1---alpha Conduit a une augmentation des défenses antioxydantes, provoquant ainsi la diminution de l'effet du ferulénol (Vazquez F. Et al., 2013).

D'autre part, notre molécule a probablement ciblé spécifiquement le stress oxydant dans les cellules tumorales. C'est Le cas du stress oxydant d'origine mitochondriale. Cette molécule est capable de perturber le flux d'électrons au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale et d'induire la production de ROS Mitochondriaux (Blackman . Et al., 2012).De plus, le stress oxydant induit par Férulénol, provoque une chute du potentiel, de membrane mitochondriale et la mort de la cellule par apoptose (Kirshner J. Et al., 2008).

Il est probable ,aussi, que L'efficacité du Férulénol dépend ,donc, de l'état d'activité de la chaine respiratoire mitochondriale. Ceci Limite donc son utilisation en clinique, car la plupart

## Discussion

---

des patients atteints d'un cancer présentent un phénotype métabolique plutôt glycolytique. Ces résultats révèlent l'importance de l'état du métabolisme mitochondrial dans l'effet de ces types d'agents pro-oxydants dans le traitement du cancer.

L'Activation des récepteurs de mort, peut être une autre hypothèse, pour expliquer l'effet pro-apoptotique du Féruléol, les récepteurs TnfRI et Fas sont une des cibles privilégiées du fait de leur importante capacité d'induction de l'apoptose par l'intermédiaire de leur Death Domain activateur de la cascade des caspases (Kischkel et al., 1995). Malheureusement, l'induction de ces récepteurs in vivo n'a conduit qu'à un faible effet sur les cellules cancéreuses, et a engendré d'importants effets secondaires sur les tissus sains (Debs et al., 1990; Ogasawara et al., 1993; Tracey & Cerami, 1990).

Il est possible que Le Féruléol Active les caspases, ces dernier étant à l'état naturel sous forme inactive, la recherche a mis au point des molécules nommées « artificial death switch » capables de les activer. Ces molécules sont notamment capables d'activer les caspases 1 et 3 responsables du déclenchement de l'apoptose chez les cellules cancéreuses (MacCorkle et al., 1998). Cette stratégie a récemment été testée sur une lignée de cellules de cancer de la prostate et a engendré une importante augmentation du nombre d'apoptoses (Shariat et al., 2001).

Le Féruléol a probablement inactivé les IAP. Des études récentes sur le NSCLC ont montré que l'oligodésoxynucléotide (ODN) permet d'inhiber 70% de l'expression de l'ARNm de la survivin, inhibiteur naturel des caspases 3, 7 et 9 (Sasaki et al., 2000). La régulation négative par stratégie antisens de XIAP permet aussi l'induction de l'apoptose chez les cellules de cancer ovarien (Olie et al., 2000).

L'inhibition de l'activité de NFκB (nuclear factor-kappa B) peut être la dernière hypothèse pour l'activité proapoptotique du férulenol. L'inactivation NFκB a montré son effet inducteur de l'apoptose chez les cellules cancéreuses (Cross et al., 2000; Wang et al., 1998). Cette cible paraît particulièrement intéressante du fait que la plupart des cellules saines séquestrent NFκB, dans le cytoplasme, qui est du fait l'inactive.

On peut donc dire que la mort cellulaire programmée est au centre de nombreuses stratégies thérapeutiques anticancéreuses. Il reste malgré tout dans de nombreux cas des problèmes de toxicité envers les cellules saines. C'est pourquoi la poursuite des études

## Discussion

---

visant à comprendre les mécanismes particuliers mis en place par les cellules cancéreuses pour échapper à l'apoptose, est une des priorités de la recherche pharmacologique.

Les mitochondries peuvent montrer une excitabilité anormale aux effets des ROS exogènes, répondant aux élévations anormales de leur concentration par un accroissement de leur production en ROS (Zorov *et al.*, 2000 ; Brady *et al.*, 2006).

La prolifération cellulaire non contrôlée a été communément associée à une activité dérégulée des oncogènes puisque la transformation cellulaire est le phénotype observé dans les tumeurs. Cependant ce type de prolifération cellulaire doit être nécessaire mais pas toujours suffisant pour induire l'apparition de tumeur. En effet, dans certaines proliférations malignes la diminution de l'apoptose est un des événements importants qui détermine une prolifération cellulaire incontrôlée. Les voies induisant l'apoptose ainsi que les protéines impliquées dans la survie cellulaire, sont donc fréquemment dérégulées dans de nombreux cancers (Reed, 2001).

La recherche de nouveaux traitements anti-cancéreux s'intéresse donc tout naturellement à ce phénomène (Brown & Attardi, 2005; Fesik, 2005; Ghobrial *et al.*, 2005; Mita & Tolcher, 2005). La connaissance actuelle de l'apoptose permet d'en connaître les différents acteurs, et les cibles thérapeutiques sont donc diverses.

L'administration du phénobarbital, l'inducteur enzymatique utilisé dans la présente étude, en association avec le cyclophosphamide et le Ferulénol, présente une augmentation significatif du MDA, de l'anion super oxyde, et une augmentation de l'activité enzymatique de la catalase, une diminution du taux de GSH avec une diminution du taux de gonflement.

Il est désormais largement admis que l'induction d'enzymes antioxydantes est une majeure stratégie pour la protection des cellules contre une grande variété de composés toxiques endogènes et exogènes telles que les produits chimiques cancérigènes et les espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, ces enzymes anti-oxydantes réduisent l'interaction carcinogène-ADN en fournissant un grand pool nucléophile pour le B(a)P qui est un carcinogène électrophile (Paul *et al.*, 2011). Dans le même contexte, des études ont démontré que l'apport en SOD et en CAT peut inhiber la mutagenèse induite par le métabolite du B(a)P qui est le BaP-3,6-quinone, suggérant que la réduction d'un électron

## Discussion

---

des quinones en semiquinones est mutagène par la formation d'un radical anion superoxyde et la production subséquente de peroxyde d'hydrogène (Kim et al., 2000).

Nos résultats montrent que le phénobarbital a renforcé partiellement l'effet prooxydant dans les cellules tuomral du poumon. Le phénobarbital est reconnu pour induire les cytochromes P450. La majorité des CYPs sont exprimés dans les poumons humains (Nerbert et Dalton, 2006) en particulier le CYP 2B6 de la famille 2 qui a été détecté dans les cellules épithéliales bronchiques (Willey et al., 1997), les pneumocytes de types II (Mori et al., 1996) et les macrophages alvéolaires (Raunio et al., 1999).

(Persson.J.O et al) confirme qu'il existe différents produits chimiques, y compris certains médicaments, induisent sélectivement les P450 et les sous-familles de P450, ces derniers ont été proposées pour avoir un rôle dans la génération de ROS.

Plusieurs travaux ont étudié la relation des CYP et la production des ROS. les CYP ont été suggérés pour être une excellente source de ROS (Dostalek, M et al, 2007 ; Al- Omar et al., 2004; Halliwell, 2006; Hryc. Bandiera, 2012; Lewis, 2002; Zangar et al., 2004). Ils ont expliqué que le CYP, a la capacité d'activer les molécules de dioxygène en des entités hautement réactives (ROS) et d'insérer ensuite l'oxygène moléculaire dans un nombre important et varié de substrats tant au niveau d'un atome de carbone, que d'azote ou de soufre. Cette activation du dioxygène est rendue possible par la présence d'un atome de fer inclus dans l'hème qu'il porte primitifs (Hrycay .E, 2015).

(Miroslav Dostalek et al (2007 ; 2008) ont confirmé L'augmentation de la peroxydation lipidique et de l'activité des enzymes antioxydantes , après induction des CYP.

Les réactions de biotransformation des xénobiotiques catalysées par les CYPs s'inscrivent en effet dans un processus de détoxification évitant l'accumulation de substances potentiellement toxiques dans l'organisme. Ce sont d'ailleurs ces mêmes substrats qui auto induisent leurs propres réactions de détoxification.

Paradoxalement, les CYPs peuvent parfois catalyser l'activation chimique de certains composés (procarcinogènes...) et produire des métabolites toxiques, c'est le cas de l'induction du métabolisme du cyclophosphamide, en augmentant la production du métabolite pharmacologiquement actif, Le CYP2B6 est plus efficace pour activer le cyclophosphamide



## Discussion

---

et l'ifosfamide (Chang, Weber, Crespi et Waxman, 1993).cette particularité pouvant être exploitée dans certains protocoles thérapeutiques (Rooney PH., 2004).

Rodriguez-Antona et Ingelman-Sundberg (2006), confirment que les CYP participent à l'activation de plusieurs agents antinéoplasiques, dont le cyclophosphamide, l'ifosfamide, le docétaxel, le paclitaxel, l'irinotécan et le tamoxifène. Le polymorphisme du CYP et la variabilité interindividuelle de l'expression du CYP influent sur l'efficacité du traitement par ces agents chimiothérapeutiques, réduisant ainsi l'efficacité de ces composés chez les personnes présentant des formes faiblement actives ou inactives ou exprimant de faibles taux d'enzymes CYP individuelles qui activent le cyclophosphamide, l'ifosfamide, le docétaxel, le paclitaxel, l'irinotécan et le tamoxifène .

Jolie et *al.* (2009) a signalée que la baisse de l'expression intratumorale du CYP 2B6 est probablement associée à la conversion intratumorale réduite du cyclophosphamide à des métabolites pharmacologiquement actifs.

Il faut noter que plusieurs études ont montré que la surexpression du CYP1B1 entraînait une résistance des cellules tumorales à la chimiothérapie (Cui J et al.,2015; Horley NJ et al.,2017). Sa surexpression aussi s'associe aux lésions de l'ADN mitochondrial (ADNmt) et à la dysfonction mitochondriale (Bansal S et ai., 2014).

Les mitochondries jouent un rôle central dans la reprogrammation métabolique du cancer, ce qui favorise les cellules cancéreuses pour adapter le microenvironnement en constante évolution pendant sa croissance (Iommarini L et al., 2017), et initier également l'apoptose (Roos WP et al., 2016). L'apoptose du cancer à médiation par les mitochondries est considérée cible biologique de plusieurs substances naturelles (Rodriguez C et al.,2013). Plusieurs auteurs ont montré que ces substanses ,dont les coumarines, sont accumulé dans les mitochondries des cellules cancéreuses par transport actif (Huo X et al.,2017 ); cet accumulation a provoqué l'apoptose du cancer. Par exemple, chez le rat, le niveau d'un phényl coumarine mélatonine dans la mitochondrie était 100 fois plus élevé que dans les autres compartiments cellulaires après son administration (Tan DX et al.,2013).

L'apoptose médiée par les mitochondries est régulée par Famille Bcl-2 (Bcl-2, un anti-apoptotique les protéines; Bax, l'un des pro-apoptotiques protéines). La diminution de Bcl-2 ou l'augmentation de Bax se traduit généralement par perméabilité de la membrane externe mitochondriale (MOMP) qui favorise la libération de cytochrome c de l'espace membranaire

## Discussion

---

interne mitochondrial. Ensuite, le cytochrome c déclenche la formation de l'apoptosome et favorise la protéase caspase (comme l'activation de la caspase 9) dans le cytosol, provoque finalement l'apoptose et la mort des cellules cancéreuses.

Dans les cellules cancéreuses, le métabolisme intrinsèque est généralement supérieur à celui des cellules normales. Cela permet aux cellules tumorales d'obtenir plus d'énergie et de matériaux pour adapter les cellules aux conditions stressantes, y compris la privation de nutriments, le traitement médicamenteux et l'hypoxie pour leur survie (Tang L et al., 2018). Le métabolisme des substances endogènes et exogènes dans les cellules cancéreuses déterminent les bioactivités de ces substances (Michael M et al., 2005), et ce processus conduit généralement les tumeurs à développer une résistance aux médicaments et à échapper à l'apoptose.

# **Conclusion**

Notre étude menée chez les rats souche Wistar et qui consiste à chercher le risque de potentialisation de l'effet prooxydant du Ferulénol et du cyclophosphamide après association à l'inducteurs enzymatique sur tumeurs expérimentale et tissus sains, nous a permis de lancer plusieurs expériences, chacune d'elle, nous a rapporté des résultats non négligeables :

L'administration d'une dose unique de 100 mg/kg de benzo(a)pyrène induit le cancer pulmonaire chez les rats. Le cancer pulmonaire est associé au stress oxydatif, par une synthèse énorme de ROS conduisant à une inflammation et une transformation maligne du tissu pulmonaire.

le Ferulénol a un effet pro-oxydant à la dose 50 mg/kg. Il engendre une surproduction de l'O<sub>2</sub><sup>°</sup>, du MDA, et décroît l'activité des enzymes antioxydante.

le Ferulénol, en le comparant aux cyclophosphamide, est plus toxique aussi bien sur les cellules tumorales, ce qui est bénéfique en thérapie anticancéreuse, que sur les cellules saines, il a perturbé le potentiel membranaire de la mitochondrie, chose qui aboutit sans doute à une mort cellulaire programmée.

l'extrait de propolis, riche en composants flavonoïdes, est capable de restaurer la perturbation du potentiel membranaire induite par le composé découplant naturel Ferulénol, en interagissant avec la chaîne respiratoire mitochondriale, qui inhibe l'oxydation des pores thiols de transition de perméabilité et empêche son ouverture. Donc, l'extrait de propolis pourrait être un agent thérapeutique prometteur assurant une protection des cellules saines contre plusieurs agents chimiothérapeutiques, en corrigeant la toxicité des agents actifs utilisés dans le traitement du cancer.

L'activateur enzymatique (phénobarbital), lors de son administration chez le rat en association au Ferulénol ou au cyclophosphamide a encore accru la production de l'anion superoxyde et du MDA, mais paradoxalement, diminue le taux du gonflement mitochondrial, et augmente l'activité enzymatique de la catalase.

Pour conclure, nous pouvons donc dire que la mort cellulaire programmée est au centre de nombreuses stratégies thérapeutiques anticancéreuses. Il reste malgré tout dans de nombreux cas des problèmes de toxicité envers les cellules saines. C'est pourquoi la poursuite des études visant à comprendre les mécanismes particuliers mis en place par

## Conclusion

---

les cellules cancéreuses pour échapper à l'apoptose, est une des priorités de la recherche pharmacologique. On peut conclure que le phénobarbital, inducteur enzymatique peut participer à l'induction des enzymes antioxydantes, comme il peut augmenter la production des ROS par l'activation des CYPs mitochondriaux.

Ces résultats sont très encourageants et permettent non seulement de déterminer de nouvelles cibles thérapeutiques mais ils mettent également en évidence l'importance de l'état de l'activité mitochondriale dans l'efficacité des agents anti tumoraux en association aux inducteurs enzymatiques ciblant la production de ROS mitochondriaux.

# REFERENCES

# A

- Aas.Z., Babaei.E., Hosseinpour Feizi.M., Dehghan.G. 2015. Anti-proliferative and apoptotic Abdellah.M.A., Ohta.S., Hirata.T. 2007. Ferulsinaic acid, a sesquiterpene coumarin with a rare carbon skeleton from *Ferula* species. *Phytochemistry*. Vol: 68. pp: 680–686.
- Adams.I.D., Klaidman.L.K. 1993. Acrolein-induced oxygen radical formation. *Free Radic Biol Med* 15: 187-193. Nardini, M., E.I. Finkelstein, S. Reddy, G. Valacchi, M. Traber, C. E. Cross et A. van der Vliet (2002). Acrolein-induced cytotoxicity in cultured human bronchial epithelial cells. Modulation by alpha-tocopherol and ascorbic acid. *Toxicology*. Vol: 170. pp: 173-185.
- Agostinelli.E., Przybytkowski.E., Averill-Bates.D.A. 1996. Glucose, glutathione, and cellular response to spermine oxidation products. *Free Radic Biol Med*. Vol: 20. pp: 649-656.
- Agostinelli.E., Przybytkowski.E., Mondovi.B., Averill-Bates.D.A. 1994. Heat enhancement of cytotoxicity induced by oxidation products of spermine in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Pharmacol*. Vol: 48. pp: 1181-1186.
- Ahmed A. A., Hegazy M.-E. F., Zellaguui A., Rhouati S., Mohamed, T. A., Sayed, A. A., Albert.R.E., Miller.ML., Cody.T., Andringa.A., Shukla.R., Baxter.CS. 1991. Benzo[a]pyrene-induced skin damage and tumor promotion in the mouse. *Carcinogenesis*. Vol: 7. pp: 1273-80.
- Alexandre.J., Batteux.F., Nicco.C., et al. 2006a. Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. Vol: 119. pp: 41-8.
- Alexandre.J., Hu.Y., Lu.W., Pelicano.H., Huang.P. 2007. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer Res*. Vol: 67. pp: 3512-7.
- Alexandre.J., Nicco.C., Chereau.C., et al. 2006 b. Improvement of the therapeutic index of anticancer drugs by the superoxide dismutase mimic mangafodipir. *J Natl Cancer Inst*. Vol: 98. pp: 236-44.
- Al-Omar.M.A., Beedham.C., Alsarra.I.A. 2004. Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanisms. *Saudi Pharmaceutical Journal*. Vol: 12. pp : 1-18.
- Alyane.M., Benguedouar.L., Kebsa.W., Boussenane.H. N., Rouibah.H., Lahouel.M. 2008. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak. J. Pharm. Sci*. Vol: 21. pp: 201-209.
- Amira.M.Gamal-Eldeen., Hegazyb.M.-E.F. 2010. A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Natural Product Research*. Vol: 24. No. 3. pp: 246–257.

Anandakumar.P.Kamaraj., Jagan.S., Ramakrishnan.S.G., et al. 2008. Capsaicin modulates pulmonary antioxidant defense system during benzo(a)pyrene-induced lung cancer in swiss albino mice. *Phytotherapy research*.vol : 22(4). pp:529-533.

Antitumor activity and preliminary phytochemical examination of *Tagetes minuta* (Compositae). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol: 62. no. 6. pp: 1009–1011.

Appendino.G., Cravotto.G.C., Sterner.O., Ballero.M., 2001. Oxygenated sesquiterpenoids from a non poisonous sardinian chemotype of giant fennel (*Ferula communis*). *J. Nat. Prod.* Vol : 64. pp: 393–395.

Appendino.G., Mercalli.E., Fuzzati.N., Arnoldi.L., Stavri.M., Gibbons.S., Ballero.M., Maxia. A. 2004. Antimycobacterial coumarins from the sardinian giant fennel (*Ferula communis*). *J. Nat.Prod.* Vol: 67. pp: 2108-2110.

Appendino.G., Spagliardi.P., Cravotto.G., Pocock.V., Milligan.S. 2002. Daucane phytoestrogens:a structure-activity study. *J. Nat. Prod.* Vol: 65. pp: 1612-1615.

Arnoldi.L., Ballero.M., Fuzzati.N., Maxia.A., Mercalli.E., Pagni.L. 2004. HPLC-DADMS identification of bioactive secondary metabolites from *Ferula communis* roots. *Fitoterapia*. Vol: 75. pp: 342–354.

Ashkenazi.A., Salvesen.G. 2014. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* Vol: 30. pp: 337-356.

## **B**

Bahekar.S.S., Shinde.Tetrahedron.Lett.D.B. 2004. Samarium(III) catalyzed one-pot construction of coumarins. *Tetrahedron Letters*. Vol: 45. pp: 7999-8001.

Balaban.RS., Nemoto.S., Finkel.T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. Vol: 120. pp: 483-495.

Baldi Isabelle ., Denis Bard., Robert Barouki., Simone Benhamou., Jacques Bénichou,Marie-Odile Bernier., Olivier Bouchot., Pierre Carayon., Jocelyn Ceraline., Emmanuelle Charafe., Jauffret Jacqueline Clavel Françoise Clavel-Chapelon Florent De Vathaire <sup>14</sup>, Mariette Gerber Anabelle Gilg., Soit Ilg., Pascal Guenel., André Guillouzo., Pierre Hainaut., Marie-Claude., Jaurand Eric., Jouglà Guy., Launoy Dominique., Laurier Yves., Lévi Marc., Maynadie Jean., Claude Pairon., Isabelle Momas., Christophe Paris., Claude Parmentier., Marc Sanson., Jean-François Savouret., Isabelle Stücker., Patrick Thonneau., Marie Walschaerts. 2008. Cancer et environnement : expertise collective Rapport de recherche : Institut national de la santé et de la recherche médicale(INSERM). Vol : XVII. pp : 889.

Bankova.V., Marcucci.M.C. 2000. Standardization of propolis: present status and perspectives.*Bee World*. Vol: 81. pp: 182-188.



Bansal.S., Leu.AN., Gonzalez.FJ., al. 2014. Mitochondrial targeting of cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon-induced mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem*. Vol: 289. pp: 9936-51.

Barchi.J.J.Jr., Moore.R.E., Patterson.G.M.L. 1984. Acutiphycin and 20,21-didehydroacutiphycin, new antineoplastic agents from the cyanophyte *Oscillatoria acutissima*, *Journal of the American Chemical Society*. Vol: 106. no. 26. pp: 8193.

Barry.M., Mulcahy.F., Merry.C., Gibbons.S., Back.D. 1999. Pharmacokinetics and potential interactions amongst antiretroviral agents used to treat patients with HIV infection. *Clin Pharmacokin*. Vol : 36 (4). pp: 289-304.

Baulig.A., Garlatti.M., Bonvallet.V., Alexandre Marchand., Robert Barouki., Francelyne Marano., Armelle Baeza-Squiban. 2003. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *American journal of physiology*. Vol: 285 issu 3. pp: L671-L679.

Beasley.M.B., Brambilla.E., Travis.W.D. 2005. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors, *journal ISSN*. Vol: 0037-198X

Behrend.L., Henderson.G., Zwacka.RM. 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation; *Biochem Soc Trans. (Pt 6)*. pp: 1441- 4.

Benguedouar.L., Boussenane.H.N., Kbsa.W., Alyane.M., Rouibah.H., Lahouel.M. 2008. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. Vol: *IJEB* 21. pp: 112-119.

Benkhalti.F., Lamnaouer.D. 1994. Activité anticoagulante de quelques principes isolés de *Ferula communis* L. Actes du 1<sup>er</sup> colloque international «La pharmacopée Arabo-islamique, Hier et Aujourd'hui ». pp: 215–220.

Bernardi.P., Veronese.P., Petronilli.V. 1993. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me<sup>2+</sup> binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J. Biol. Chem*. Vol: 268. pp: 1005-1010.

Biswal.S., Acquah-Mensah.G., Datta.K., Wu.X., Kehrer.J.P. 2002. Inhibition of cell proliferation and AP-1 activity by acrolein in human A549 lung adenocarcinoma cells due to thiol imbalance and covalent modifications. *Chem Res Toxicol*. Vol: 15. pp: 180-186.

Blackman,K., Cheung-Ong.K., Gebbia.M., Proia.D.a., He.S., Kepros.J., Jonneaux.A., Marchetti.P., Kluza.J., Rao.P.E., al. 2012. Mitochondrial electron transport is the cellular target of the oncology drug elesclomol. *PLoS One* 7, e29798.

Bocca.C., Gabriel.L., Bozzo.F., Miglietta.A. 2002. Microtubule-interacting activity and cytotoxicity of the prenylated coumarin ferulenol. *Planta. Med*. Vol : 68. pp : 1135-1137.

Boddy.AV., Yule.SM . 2000. Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines *Clin Pharmacokin*. Vol: 38(4) pp: 291-304.

Bohr.V.A. 2002. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med*. Vol: 32. pp: 804-812.

Bouchardy.C., Benhamou.S., Dayer.P. 1996. The effects of tobacco on lung cancer risk depends on CYP2D6 activity. *Cancer Res.* Vol: 56. pp: 251-253.

Boutabet.K. 2007. Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatifrénal induit par la doxorubicine, Magister de pharmacochimie, université de Jijel

Boveris.A., Chance.B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem.J.* Vol:134. pp: 707-716.

Boveris.A., Oshino.N., Chance.B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem.J.* Vol: 128. pp: 617- 630.

Bradley.G.W., Clover.A. 1989. Apparent response of small cell lung cancer to an extract of mistletoe and homoeopathic treatment. *Thorax.* Vol: 44. no. 12. pp: 1047.

Brady.NR., Hamacher-Brady.A., Westerhoff.HV., Gottlieb.RA. 2006. A wave of reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release in a sea of excitable mitochondria. *Antioxid Redox Signal?* Vol: 8. pp: 1651-65.

Brambilla E., Travis.W.D., Colby.T.V., Corrin.B., Shimosato.Y. 2001. The new World Health Organization classification of lung tumours, *European Respiratory Journal.*Vol: 18. pp: 1059-1068.

Brock .N. 1983. The oxazaphosphorines. *Cancer treatment*,Asta-Werke AG Degussa Pharma Gruppe, Postfach 140120, D-4800 Bielefeld 14, F.R.

Broker.L.E., Giaccone.G. 2002. The role of new agents in the treatment of non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer.* Vol: 38. no. 18. pp: 2347–2361.

Brookes.P., Lawley.PD. 1961. The reaction of mono- and di-functional alkylating agents with nucleic acids. *Biochem.J.* Vol: 80(3). pp: 496-503.

Brown.J.M., Attardi.L.D. 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer.* Vol: 5. pp: 231-237.

Brown.M.D. 1999. Green tea (*Camellia sinensis*) extract and its possible role in the prevention of cancer. *Alternative Medicine Review.* Vol: 4. no. 5. pp: 360.

Bruce .W. R., Meeker.B.E., Valeriote.F.A. 1966. Comparison of the Sensitivity of Normal Hematopoietic and Transplanted Lymphoma Colony-Forming Cells to Chemotherapeutic Agents Administered In Vivo. *journal of the National Cancer Institute.* Vol : 37(2). pp: 233-245.

Bruneton.J. 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes médicinales*, 3<sup>ème</sup> Edition, Tec et Doc, Paris.

Bunn.P.A. Jr., Corney.D.N. 1997. Overview of chemotherapy for small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* Vol: 24. pp: 69–72.

Burger.A.M., Mengs.U., Sch'uler.J.B., Fiebig.H. 2001. Anticancer activity of an aqueous mistletoe extract (AME) in syngeneic murine tumor models. *Anticancer Research*. Vol: 21. no. 3B. pp: 1965.

Byczkowki.J.Z., Kulkarni.A.P. 1990. Lipid peroxidation and benzo(a)pyrene derivative co-oxygenation by environmental pollutants. *Bull Environ Contam Toxicol*. Vol: 45. pp:633-640.

## C

Calvez Le Florence., Anush Mukeria., Jay.D.Hunt., Olaf Kelm., Rayjean.J., Hung., Philippe Tanière., Paul Brennan., Paolo Boffetta., David.G., Zaridze., Pierre Hainaut. 2005. TP53 and KRAS Mutation Load and Types in Lung Cancers in Relation to Tobacco Smoke: Distinct Patterns in Never, Former, and Current Smokers. *Molecular Biology, Pathobiology, and Genetics*. Vol: 65. issue 12.

Carboni.S., Malaguzi.V., Marsili.,A. 1964. Ferulenol, a new coumarin derivative from *Ferula communis*. *Tetrahedron Lett*. Vol: 38. pp: 2783–2786.

Carmeliet Peter., Rakesh.K.Jain. 2000. Angiogenesis in cancer and other disease , international journal of science,Nature, vol: 407. pp: 249–257.

Century: A critical review. *Epilepsia*. Vol: 45. pp: 1141-1149.

Chang.T.K.H., Weber.G.F., Crespi.C.L., Waxman.D.J. 1993. Differential activation of cyclophosphamide and ifosphamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Research*. Vol : 53. pp : 5629–5637.

Charlson.A.J. 1980. Antineoplastic constituents of some Southern African plants. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol: 2. no. 4. pp: 323

Chehma.A. 2006. Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. *Chemistry and Physics of Lipids* . Vol: 129 (2) . pp: 133-160 .

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

Chen.X., Hao.A., Li .X et al. 2016. Melatonin inhibits tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells via the AKT-EZH2-STAT3 signaling axis. *J Pineal Res*. Vol: 61. pp: 208-17.

Cheng.P. C., Wong.G. 1996. Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee. World*. Vol: 77. pp: 8-15.

Cheng.Y., Lee.S., Harn.H., Huang.H., Chang.W. 2008. The extract of *Hibiscus syriacus* inducing apoptosis by activating p53 and AIF in human lung cancer cells, *The American Journal of Chinese Medicine*. Vol: 36. No.1. pp : 171.

Cheraghi.O., Dehghan.G., Mahdavi.M., Rahbarghazi.R., Rezabakhsh.A., Charoudeh.H.N., Iranshahi.M., Montazersaheb.S. 2016. Potent anti-angiogenic and cytotoxic effect of conferone on human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells. *Phytomedicine*. Vol: 23. pp: 398-405.

Chitnis.M.P., Bhatia.K.G., Phatak.M. K. 1979. Anti-tumour activity of the methanol extract *Ervatamia heyneana* (NSC B668619), *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol: 17. no. 2. pp: 212.

Chitnis.M.P., Bhatia.K.G., Phatak.M.K., Rao.K.V.K. 1980. Anti-tumour activity of the extract of *Semecarpus anacardium* L. nuts in experimental tumour models, *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol: 18. no. 1. pp: 6.

*Clinical Pharmacology*. 2009. Phenobarbital.Retrieved from <http://www.clinicalpharmacology-ip.com/Forms/Monograph/monograph.aspx?cpnum =479&sec=monmech>.

Cohen.SM., Ellwein.LB. 1990. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* (New York, N.Y.) 249(4972). pp:1007-1011.

Colvin.M., Hilton.J.Pharmacology of cyclophosphamide and métabolites. 1981. *cancer Treat Rep*. Vol: 65.Suppl.3. pp:89-95.

Conklin.K.A. 2004. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *ntegr Cancer Ther*. Vol: 3(4). pp: 294-300.

Connors.TA., Cox.PJ., Farmer.PB., Foster.AB., Jarman.M. 1974. Some studies of the active intermediates formed in the microsomal metabolism of cyclophosphamide and isophosphamide. *Biochem Pharmacol*. Vol: 23.(1). pp: 115-29.

Cooper.J.A., White.J.r., Matthay.R.A. 1986. Drug-induced pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. Vol:133(3). pp: 488-505.

Costantini.P., Belzacq.a.S., Vieira.H.L., Larochette.N., de Pablo.M. a., Zamzami.N., Susin.S. a., Brenner.C., Kroemer.G. 2000. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocatorenforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene*. Vol: 19. pp: 307-314.

Cox.P. 1979. Cyclophosphamide cystitis-Identification of acrolein as the causative agent. *Biochem. Pharmacol*. Vol: 28. pp: 2045-2049.

Cozza.K.L., ARMSTRONG.S.C. 2001. The cytochrome P450 system: drug interaction principales for medicalpractice. *American Psychiatric Publishing*. pp: 272.

Cristea.I., leana.M., Mauro Degli Esposti. 2004. Membrane lipids and cell death: an overview

Croce,C.M., Sozzi.G., Huebner.K. 1999. Role of FHIT in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*. Vol: 17. pp: 1618-1624.

Crompton.M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J*. Vol: 341. pp: 233-249.

Cross.T.G., Scheel-Toellner.D., Henriquez.N.V., Deacon.E., Salmon.M., Lord.J.M. 2000. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Experimental Cell Research*, Vol: 256. pp: 34-41.

Cui.J., Meng.Q., Zhang.X et al. 2015. Design and Synthesis of New alpha-Naphthoflavones as Cytochrome P450 (CYP) 1B1 Inhibitors To Overcome Docetaxel-Resistance Associated with CYP1B1 Overexpression. *J Med Chem*. Vol: 58. pp: 35-34-47.

Curini.M., Epifano.F., Maltese.F., Marcotullio.M.C., Prieto-González.S., Rodríguez.J.C., Aust.J. 2004. Activité de synthèse et anti-inflammatoire des géranyloxy coumarines naturelles et semi-synthétiques *Chem*. Vol : 56. pp: 59-60.

Curtin.J.F., Cotter.T.G. 2003. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*. Vol: 15. pp: 983-992.

Czabotar.P.E., Lessene.G., Strasser.A., Adams.J.M. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. Vol: 15. pp: 49-63.

Czekaj.P. 2000. Phenobarbital -induced expression of cytochrome P450 genes. *Acta Biochim Pol*. Vol: 47(4). pp: 1093-105.

## D

Danen-Van Oorschot.A.M., Klein.B., Zhuang.S.M., Van Der Eb.A.J., Noteborn, M.H.M., Fischer.D.F., Backendorf.C., Grimbergen.J.M., Quax.P.H.A., Falkenburg.J.H.F. 1997. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol: 94. pp: 5843-5847.

Danen-Van Oorschot.A.M., Van Der Eb.A.J., Noteborn.M.H.M. 2000. The chicken anemia virus-derived protein Apoptin requires activation of caspases for induction of apoptosis in human tumor cells. *Journal of Virology*. Vol: 74. pp: 7072-7078.

Danen-Van Oorschot.A.M., Van Der Eb.A.J., Noteborn.M.H.M. 1999. BCL-2 stimulates apoptin®-induced apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol: 457. pp: 245-249.

De Groot.H., Rauen.U. 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of.

De Zio.D., Cianfanelli.V., Cecconi.F. 2013. New insights into the link between DNA damage and apoptosis. *Antioxid. Redox Signal*. Vol: 19. pp: 559–571.

Debs.R.J., Fuchs.H.J., Philip.R., Brunette.E.N., Duzgunes.N., Shellito.J.E., Liggitt.D. Patton. J.R. 1990. Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor in rats. *Cancer Research*. Vol: 50. pp: 375-380.

DeMarini David M., Stefano Landi., Defa Tian, Nancy.M.Hanley., Xueming.Li., Fuding.Hu., Barbara.C.Roop., Marc.J.Mass., Phouthone Keohavong., Weimin Gao., Magali Olivier., Pierre Hainaut., Judy.L.Mumford. 2001. Lung Tumor KRAS and TP53 Mutations in Nonsmokers Reflect Exposure to PAH-Rich Coal Combustion Emissions. *Cancer research*. Vol: 61. pp: 6679 – 6681.

Denison.M.S., Whitlock.J.P. 1995. Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J. Biol. Chem*. Vol: 31. pp: 18175-18178.

Derivatives from *Chelidonium majus* L. (Ukrain), *Drugs under Experimental and Clinical Research*. Vol: 18. no. 63. pp: 63.

Dhar.M.L., Dhar.M.M., Dhawan.B.N., Mehrotra.B.N., Ray.C. 1968. Screening of Indian plants for biological activity: I. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol: 6. no. 4. pp: 232- 247.

Dickinson.D.A., Forman.H.J. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*. Vol: 164. pp: 1019-1026.

Domeyer.B.E., Sladek.N.E., 1980. Kinetics of Cyclophosphamide Biotransformation In vivo. *American Association for Cancer Research*. Vol :40 (1).

Dostalek.M., Brooks.J.D., Hardy.K.D., Milne.,G.L., Moore.M M., Sharma.S., Morrow. J. D., Guengerich.F.P. 2007. *Mol. Pharmacol*.Vol: 72. pp: 1419–1424.

Dostalek.M., Brooks.J.D., Hardy.K.D., Milne.G.L., Moore.M.M., Sharma.S., Morrow.J. D., Guengerich.F.P. 2007. In vivo oxidative damage in rats is associated with barbiturate response but not other cytochrome P450 inducers.*Mol. Pharmacol*. Vol: 72. pp: 1419-1424.

Douglas Hanahan., Robert.A.Weinberg. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. Vol: 100.

Dreves.J., Medinger.M., Schmidt-Gersbach.C., Weber.R., Unger.C. 2003. *Receptor*. Vol: 4. Number 2. pp: 113-121.

Du.C., Fang.M.Li.Y., Li.L., Wang.X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. Vol : 102. pp: 33-42.

Dupont.F., Guignrd.J.L. 2007. *Botanique systématique moléculaire*. 14<sup>ème</sup> édition, *Elsevier Masson*. 285p. E. Furusawa and S. Furusawa, 1985. Anticancer activity of a natural product, viva-natural, extracted from *Undaria pinnatifida* on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma,*Oncology*. Vol: 42. no. 6. pp: 364.

Dzhioev.F.K. 1965. Eviter les effets indésirables par interactions médicamenteuses, comprendre et décider. Influence of extract of eleutherococcus on urethane-induced lung adenomas in mice. *Voprosy Onkologii*. Vol: 11. no. 9. pp: 51–54. pp: 57-70.

## E

Emaus.R. K., Grunwald.R., Lemasters.J. J. 1986. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane.

Emedecin. [En ligne]. Adresse URL :<http://www.emedecine.com/neuro/topic692.htm>.

Engel.RH., Evens.AM. 2006. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci*. Vol : 11. pp: 300-12.

Erickson.LC., Laurent.G., Sharkey.NA., Kohn.KW. DNA cross-linking and monoadduct repair in nitrosourea-treated human tumour cells. *Nature*. Vol:288(5792). pp:727-9.

## F

Facchinetti.F., Amadei.F., Geppetti.P., Tarantini.F., Di Serio.C., Dragotto.A., Gigli.P.M. S., Civelli.M., Patacchini.R. 2007. Alpha, beta-unsaturated aldehydes in cigarette smoke release inflammatory mediators from human macrophages. *American Journal of Respiratory Cell And Molecular Biology*. Vol: 37. pp: 617-623.

Fang.J., Nakamura.H., Iyer.AK. 2007. Tumor-targeted induction of ox- ystress for cancer therapy. *J Drug Target*. Vol:15. pp: 475-86.

Favier.A. 1997. *Annales de Biologie Clinique* Le stress oxydant: intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. Vol :55. (1).

Fei.Li.,Andrew.D. Patterson., Constance.C. Höfer Kristopher., Krausz.W., Frank.J. Gonzalez., Jeffrey.R.Idle. 2010. Metabolism of Cyclophosphamide and Ifosfamide in the Mouse Using UPLC-ESI-QTOFMS-Based Metabolomics; *Biochemical Pharmacology*, Elsevier. Vol:80 (7). pp: 1063.

Fenselau Catherine., Man-Na.N.Kan., Subba Rao.S., Arthur Myles, Orrie.M., Friedman., Michael CoIvin. 1977. Identification of Aldophosphamide as a Metabolite of Cyclophosphamide in Vitro and in Vivo in Humans. *cancer research*. Vol: 37. pp: 2538-2543.

Ferrari.R. 1996. The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* Vol: 28. pp: S1-S10.

Fesik.S.W. 2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer.* Vol: 5. pp: 876-885.

Filomeni.G., Rotilio.G., Ciriolo.M.R. 2002. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol.* Vol: 64. pp: 1057-1064.

Fink.S.P., Reddy.G.R., Marnett.L.J. 1997. Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol: 94. pp: 8652-8657.

Finkel.T., Holbrook. N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* Vol: 408. pp: 239-247.

Fiorucci.F., lucantoni.g., paone.g., zotti.m., li bianchi.e., serpilli.m., regimenti.p., cammarella.i., Puglisi.g., schmid.g. 2008. Colchicine, cyclophosphamide and prednisone in the treatment of mild-moderate idiopathic pulmonary fibrosis: comparison of three currently available therapeutic regimens. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* Vol: 12. pp: 105-111.

Flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* Vol: 12. pp: 249-255.

Flux in A549 lung cancer cells, *Eur J Med Chem.* Vol: 145. pp: 551-558.

For the Toxicity of Acrolein Mercapturates. *Toxicology and Applied Pharmacology.*

Foster.B.A., Coffey.H.A., Morin.M.J., Rastinejad.F. 1999. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science.* Vol: 286. pp: 2507-2510.

Fox., Margaret., Scott., David. 1980. Genetic toxicology of nitrogen and sulfur mustard. *Mutation Research.* Vol: 75(2). pp: 131-168.

Fraigui.O., Lamnaouer.D., Faouzi.M.Y. 2002. Acute toxicity of ferulenol, a 4-hydroxycoumarin isolated from *Ferula communis* L. *Vet. Hum. Toxicol.* Vol: 44. Vol: 5-7.

Fraigui.O., Lamnaouer.D., Faouzi.M.Y. 2002. Toxicité aiguë du ferulénol . une 4-hydroxycoumarine isolée à partir de *Ferula communis* L. *Vet Hum Toxicol.* Vol: 44(1). pp: 5-7.

Fred.R.Hirsch., Roy.S.Herbst., Christine Olsen., Kari Chansky., John Crowley., Karen Kelly., Wilbur.A.Franklin., Paul A. Bunn, Jr, Marileila Varella-Garcia, and David R. Gandara ; 2008. Increased *EGFR* Gene Copy Number Detected by Fluorescent In Situ Hybridization Predicts Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Cetuximab and Chemotherap, *J Clin Oncol.* Vol: 26(20). pp: 3351-3357.

Fridovich.I. 1975. Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry.* Vol: 44. pp:147-159.



Friedman.HS., Mahaley.MS.Jr., Schold.SC.Jr., Vick.NA., Falletta.JM., Bullard.DE., D'Souza.BJ., Khandekar.JD., Lew.S., Oakes.WJ. 1986. Efficacy of vincristine and cyclophosphamide in the therapy of recurrent medulloblastoma. *Neurosurgery*. Vol : (3). pp: 335-40.

Fulda Simone., Galluzzi Lorenzo., Guido Kroemer. 2010. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. Vol: 9. pp: 447–464.

Furuhata.A., Nakamura.M., Osawa.T., Uchida .K. 2002. Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols. *J Biol Chem*. Vol: 277(31). pp: 279-26.

Furusawa.E., Chou.S.C., Furusawa.S., Hirazumi.A., Dang.Y. 1992. Antitumour activity of *Ganoderma lucidum*, an edible mushroom, on intraperitoneally implanted Lewis lung carcinoma in syngenic mice, *Phytotherapy Research*. Vol: 6. no. 6. pp: 300.

Furusawa.E., Furusawa.S., 1989. Anticancer potential of Viva- Natural, a dietary seaweed extract, on Lewis lung carcinoma in comparison with chemical immunomodulators and on cyclosporine-accelerated AKR leukemia, *Oncology*. Vol: 46. no. 5. pp: 343.

Furusawa.E., Furusawa.S., 1990. Antitumor potential of low-dose chemotherapy manifested in combination with immunotherapy of viva-natural, a dietary seaweed extract, on Lewis lung carcinoma, *Cancer Letters*. Vol: 50. no. 1. pp: 71.

## G

Gaffney.E., et al. 1994. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 120 Suppl, S32-34.

Galati.G., O'Brien.P. J. 2004. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anti-cancer properties. *Free Radic. Biol. Med*. Vol: 37. pp: 287-303.

Galluzzi.L., Larochette.N., Zamzami.N., Kroeme.G. 2006. Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Oncogene* . Vol: 25. pp:4812-4830.

Garcia-Ruiz .C., Colell A, Mari M. 1997.Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* . vol: 272. pp : 11369-77

Geng.CX., Zeng.ZC., Wang.JY. 2003. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. *World J Gastroenterol*. Vol: 9. pp: 696-700.

Geou-Yarh Liou., Peter Storz. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. Vol : 44(5).

Ghilarducci.D.P., Tjeerdema.R., 1995. Fate and effects of acrolein. Rev Environ Contam Toxicol. Vol: 144. pp: 95-146.

Ghobrial.I.M., Witzig.T.E, Adjei .A.A. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancertherapy. CA Cancer J Clin. Vol: (55). pp: 178-94.

Ghobrial.I.M., Witzig.T.E., Adjei.A.A., 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. Ca-A Cancer Journal for Clinicians. Vol: 55. pp: 178-194.

Goel.A., Prasad.A.K., Parmar.V.S., Ghosh.B., Saini.N. 2007. 7,8-Dihydroxy-4-methylcoumarin induces apoptosis of human lung adenocarcinoma cells by ROS-independent mitochondrial pathway through partial inhibition of ERK/MAPK signaling. FEBS Lett. Vol: 581. pp: 2447-2454.

Green.D.R., Amarante-Mendes.G.P. 1998. The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. Results and problems in cell differentiation. Vol: 24. pp: 45-61.

Guéguen.Y., Mouzat.K., Ferrari.L., Tissandie.E., Lobaccaro.J.M.A., Batt.A. M., Paquet.F., Voisin.P., Aigueperse.J., Gourmelon.P., Souidi.M. 2006. Les cytochromes P450 : métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance.” Ann Biol Clin. Vol: 64. n° 6.

Guoying Zhang., Xinshan Ye., Dexin Ji., Huarong Zhang, Fujia Sun., Chunqing Shang., Ying Zhang., Erxi Wu., Fengfei Wang., Fei Wu., Huihui Tian., Xin Liu., Linlin Chen., Kun Liu., Yishan Wang., Hanchen Liu., Wenhua Zhang., Yukun Guan., Qinwen Wang., Xiaohang Zhao., Xiaochun Wan. 2014. Inhibition de la croissance tumorale pulmonaire en ciblant les voies EGFR / VEGFR-Akt / NF-κB avec de nouveaux dérivés de la théanine Oncotarget .Vol : 5 (18). pp: 8528-8543.

## **H**

Hainaut Pierre., Gerd P.Pfeifer. 2001. Patterns of p53 G→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. Carcinogenesis Vol:22 no.3. pp: 367-374.

HAKKOLA.J., PASANEN.M., HUKKANEN.J., PELKONEN.O., MAENPAA.J., EDWARDS.R.J., BOOBIS.A.R., RAUNIO.H. 1996. Expression of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 forms in human full-term placenta. Biochem Pharmacol. Vol: 51(4). pp: 403-11.

HAKKOLA.J., PELKONEN.O., PASANEN.M., RAUNIO.H. 1998. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in the human feto-placental unit: role in intrauterine toxicity. Crit Rev Toxicol. Vol: 28(1). pp: 35-72.

Halliwell.B. 2006b. Oxidative stress and neurodegeneration:Where are we now? Journal of Neurochemistry. Vol: 97. pp: 1634–1658.

- Han.D., Antunes.F., Canali.R., Rettori.D., Cadenas.E. 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J Biol Chem*. Vol: 278. pp: 5557-5563.
- Han.S.B., Lee.C.W., Jeon.Y.J., et al. 1999. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis," *Immunopharmacology*. Vol: 41. no. 2. pp: 157.
- Han.X., Pan.J., Ren.D., Cheng.Y., Fan.P., Lou.H. 2008. Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food Chem. Toxicol*. pp: 3140–3146.
- Hanasaki.Y., Ogawa, S., Fukui.S. 1994. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical. Biol. Med*. Vol: 16. pp: 845-850.
- Hannemann Frank., Andreas Bichet., Kerstin.M.Ewen., Rita Bernhardt. 2007. Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains, *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol: 1770. pp: 330-344.
- Harding.BW., Wong.SH., Nelson.DH. 1964. Substances combinant le monoxyde de carbone dans les surrénales de rat. *Biochim Biophys Acta*. Vol: 92. pp: 415-417.
- Hasanzadeh .D., Mahdavi.M., Dehghan.G, Charoudeh.HN. 2017. Farnesiferol C induces cell cycle arrest and apoptosis mediated by oxidative stress in MCF-7 cell line. *Toxicol Rep*. Vol: 4. pp: 420-426.
- Hasanzadeh., Majid Mahdavi., Gholamreza Dehghan., Hojjatollah Nozad Charoudeh ., .....annéFarnesiferol C induces cell cycle arrest and apoptosis mediated by oxidative stress in MCF-7 cell line. *toxicologie report*. pp: 420-426.
- Hatcher.H., Planalp.R., Cho.J., Torti.FM., Torti.SV. 2008. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *CellMol Life Sci*. Vol: 65(11). pp: 1631-52.
- Hellmold.H., Rylander.T., Magnusson.M., Reihner.E., Warner.M., Gustafsson.J.A. 1998. Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammaplasties. *J Clin Endocrinol Metab*. Vol: 83(3). pp: 886-95.
- Henkler.F., Behrle E., Dennehy.K.M., Wicovsky.A., Peters.N., Warnke.E., Pfizenmaier.K., Wajant.H. 2005. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol*. Vol: 168. pp: 1087-1098.
- Hepatic ischemia-reperfusion injury in rat livers, *Free Radical Research*. Vol: 44(4). pp: 441-453.
- Hirazumi.A., Furusawa.E., Chou.S.C., Hokama.Y. 1996. Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit juice. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. Vol: 39. pp: 7.

Horakova.K., Sovcikova.A., Seemannova.Z., Syrova.D., Busanyova.K., Drobna.Z., Ferencik.M. 2001. Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* Vol: 30. pp:650-664.

Horley.NJ., Beresford.KJ., Chawla.T., et al. 2017. Discovery and characterization of novel CYP1B1 inhibitors based on heterocyclic chalcones: Overcoming cisplatin resistance in CYP1B1-overexpressing lines. *Eur J Med Chem.*Vol: 129. pp:159-174.

Horton.N.D., Mamiya.B.M., Kehrer.J.P. 1997. Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein. *Toxicology.* Vol: 122. pp: 111-122.

Hrycay.E.G., Bandiera.S.M. 2012. The monooxygenase, peroxidase, and peroxxygenase properties of cytochrome P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* Vol: 522. pp: 71-89.

Hu.B., Yang.N., Liu.W., Sha.H., D. Yu. 1991. Estimation of integrations of various functional groups of *Brucea javanica* L.Merr. Oil, *Bopuxue Zazhi.* Vol: 8. pp: 433.

Huo.X., Wang.C., Yu.Z., et al. 2017. Human transporters, PEPT1/2, facilitate melatonin transportation into mitochondria of cancer cells: An implication of the therapeutic potential. *J Pineal Res.* Vol: 62. pp:e12390.

Hwang .C., Sinskey.AJ., Lodish .HF. 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science.*Vol: 257(5076). pp: 1496-502.

## I

Ichiki.K., Mitani.N., Doki.Y., Hara.H., Misaki.T., Saiki.I. 2000. Regulation of activator protein-1 activity in the mediastinal lymph node metastasis of lung cancer.*ClinExpMetastasis.* Vol: 18(7). pp: 539-45.

Ickes.G.R., Fong.H.H., Schiff Jr.P.L., Perdue Jr.R. E., Farnsworth.N.R. 1973. hepatic ischemia-reperfusion injury in rat livers. *Free Radical Research.* Vol: 44(4). pp: 441–453.

Iommarini.L., Ghelli.A., Gasparre.G., et al. 2017. Mitochondrial metabolism and energy sensing in tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* Vol: 1858. pp: 582-590.

Ishii.H., Dumon.K.R., Vecchione.A., Fong.L.Y.Y., Baffa.R., Huebner.K., Croce.C.M. 2001. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: Review of the preclinical studies. *Journal of the American Medical Association.* Vol:286. pp: 2441-2449.

Ito.M., Takeda.Y., Kodzhimatov.O.K., Ashurmetov.O. 2001. Sesquiterpenoids from the fruits of *Ferula kuhistanica* and antibacterial activity of the constituents of *F. kuhistanica*. *Phytochemistry.* Vol: 58. pp: 763-767.

## J

Jagetia.G., Krishnan.SK., Aggarwal.BB. 2008 [cited 28 Nov 2011]. Natural Agents That Can Sensitize Tumor Cells to Chemotherapy and Radiation Therapy, In: Bonavida B, (ed.) Sensitization of Cancer Cells for Chemo/Immuno/Radio-therapy [Internet].Totowa,NJ: Humana Press. p.211-40. Available from: <http://www.springerlink.com/content/j70uq642n4777733/>.

Jian.L., Riyi.S. 2005. Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochem. Intern.* Vol: 46. pp: 243-252.

Ji.Li.Li. 1999. Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. *Experimental Biology and Medicine.* Vol: 222.issue.3. pp: 1373-1525.

José Navarro., Elena Obrador., Julian Carretero., Ignacio Petschen., José Aviñó., Pilar Perez., José.M.Estrela. 1999. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth . *Free Radical Biology and Medicine.* Vol: 26 (3-4). pp: 410-418.

Ju.J., Lu.G., Lambert.JD., Yang.CS. 2007. Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin Cancer Biol.* Vol: Oct 17(5). pp: 395-402

## K

Kawajiri.K., Watanabe.J., Eguchi.H., Hayashi.S.I. 1995. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and lung cancer susceptibility. *Pharmacogenetics.* Vol: 5. pp: S70-S73.

Kawajiri.K., Eguchi.H., Nakashi.K., Sekoya.T., Yamamoto.M. 1996. Association of CYP 1A1 germ line polymorphism with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res.* Vol: 56. pp: 72-76.

Kehrer.J., Biswal.S. 2000. The Molecular Effects of Acrolein. *Toxicological Sciences.* Vol: 57. pp: 6-15.

Kern.J., Kehrer.J. 2002. Acrolein-induced cell death: a caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chem Biol Interact.* Vol: 139. pp: 79-95.

Khan.N., Mukhtar.H. 2008. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett .Oct8.* Vol: 269 (2). pp: 269-80.

Khan.N., Mukhtar.H. 2010. Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. *Cancer Metastasis Rev Sep.* Vo: 29(3). pp: 435-45-36.

- Kerr JF., Gobé GC., Winterford CM., Harmon BV. 1995. Anatomical methods in cell death Methods .Cell Biol. Vol:46. pp:1-27.
- Kim.KJ., Choi.JS., Kang.I., et al. 2013. Melatonin suppresses tumor progression by reducing.
- Kirshner.J.R., He.S., Balasubramanyam.V., Kepros.J., Yang.C.Y., Zhang.M., Du.Z., Barsoum.J., Bertin.J. 2008. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. Mol. Cancer Ther 7.
- Kischkel.F.C., Hellbardt.S., Behrmann.I., Germer.M., Pawlita.M., Krammer.P.H., Peter.M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. EMBO Journal. Vol: 14. pp: 5579-5588.
- Klingenberg.M. 1958. Pigments of rat liver microsomes. Arch Biochem Bio. Phys.Vol: 75. pp: 376-86.
- Kokron.O., Maca.S., Gasser.G., Schmidt.P.R. 1991. Cimetidine And Coumarin Therapy Of Renal-Cell Carcinoma - a Pilot-Study. Oncology. Vol: 48. pp: 102-106.
- Kostova. 2005. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents, Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents. Vol: 5. pp: 29-46.
- Kumbier.E., Haack.K. 2004. Alfred Hauptmann (1881-1948). Journal of Neurology.
- Kunnum akkara.AB., Anand.P., Aggarwal.BB. 2008. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer. Vol: 269(2). pp: 199-225.
- Kwan.P., Brodie.M. J. 2004. Phenobarbital for the treatment of epilepsy in the 21<sup>st</sup>.
- Klaunig James.E., Lisa.M.Kamendulis. 2004. The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis, Annual Review of Pharmacology and Toxicology. Vol: 44. pp: 239-267.
- Kalyanaraman.B., Hakim Karoui., Ravinder Jit Singh., Christopher.C. Felix Detection of Thiyl Radical Adducts Formed during Hydroxyl Radical- and Peroxynitrite-Mediated Oxidation of Thiols-A High Resolution ESR Spin-Trapping Study at Q-band (35 GHz). Analytical biochemistry. Vol: 241. pp: 75-81.
- Kehrer.JP., Kacew.,S. 1985. Systematically applied chemicals that damage lung tissue. Toxicology. Vol: 28.35(4). pp: 251-93.
- Katzung.BG. 2001. Basic and Clinical Pharmacology, 8th ed. Philadelphia .
- Korkmaz.A., Topal.T., Ote.S. 2007. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. Cell Biology and Toxicology. Vol: 23. ( 5). pp: 303-312.

- Kirkham Paul., Rahman Irfan. 2006. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy . *Pharmacology and Therapeutics*. Vol: 111 ( 2 ). pp: 476-494 .
- Kosower.N.S., Kosower.E.M. 1978. The glutathione status of cells. *nt Rev Cytol*. Vol: 54. pp: 109-60.
- Kakkar Rakesh., Subrahmanyam.V., Mantha., Jasim Radhi., Kailash Prasad., Jawahar Kalra. 1997. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sciences*. Vol: 60 ( 9 ). pp: 667-679.
- Kelly Frank.J., Ian Mudway., Anders Blomberg., Anthony Frew., Thomas Sandström. 1999. Altered..lung antioxidant status in patients with mild asthma. *The Lancet*. Vol: 354 ( 9177 ). pp: 482-483 .
- Kyo.E., Suzuki.N.U.A. et al. 1998. Immunomodulation and antitumor activities of aged garlic extract, *Phytomedicine*. Vol: 5. no. 4. pp: 259.
- Kyo.E., Kasuga.N.U.S., Itakura.Y., Sumiyoshi.H. 1999. Garlic as an immunostimulant, in *Immunomodulatory Agents from Plants*, H.Wagner, Ed., p. 273, Birkh'auser, Basel, Switzerland. Echtay, K. S.; Esteves, T. C.; Pakay, J. L.; Jekabsons, M. B.; Lambert, A. J.; Portero-Otin, M.; Pam Editions Dar El Houda, Ain Mlila.
- Keiko Miyoshi., Andrea Rosner., Masahiro Nozawa., Christopher Byrd., Fanta Morgan., Esther Landesman-Bollag., Xin Xu., David C Seldin., Emmett.V.Schmidt., Makato.M Taketo., Gertraud.W.Robinson., Robert.D.Cardiff . Lothar Hennighausen Activation of different Wnt/ $\beta$ -catenin signaling components in mammary epithelium induces transdifferentiation and the formation of pilar tumors. *Oncogene*. Vol: 21. pp: 5548-5556 .
- Kumara.S.S.M., Huat.B.T.K. 2001. Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle,  $\alpha$ -hederin, from the seeds of *Nigella sativa*,” *Planta Medica*. Vol: 67. no. 1. pp: 29.
- Kupchan.S.M., Sigel.C.W., Matz.M. J., Renauld.J.A.S., Haltiwanger.R.C., Bryan.R.F. 1970. Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor from *Jatropha gossypifolia* [16], *Journal of the American Chemical Society*. Vol: 92. no. 14. pp: 4476.
- Kupchan.S.M., Uchida.I., Branfman.A.R., Dailey Jr.R.G., Fei.B.Y. 1976. Antileukemic principles isolated from Euphorbiaceae plants, *Science*. Vol: 191. no. 4227. pp: 571-572.
- Kupchan.S.M., Komoda.Y., Court.W.A et al. 1972. Tumor inhibitors. LXXIII. Maytansine, a novel antileukemic ansa macralide from *Maytenus ovatus*, *Journal of the American Chemical Society*. Vol: 94. no. 4. pp: 1354-1356.
- Kupchan.S.M., Kopperman.H.L. 1975. 1-Ustnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens,” *Experientia*. Vol: 31.no. 6. pp: 625.
- Kupchan.S.M., Hemingway.R.J., Coggon.P., McPhail.A.T., Sim.G.A. 1968. Crotepoxide, a novel cyclohexane diepoxide tumor inhibitor from *Croton macrostachys*, *Journal of the American Chemical Society*. Vol: 90. no. 11. pp: 2982-2983.
- Khwaja.T. A., Dias.C. B., Pentecost.S. 1986. Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids, *Oncology*. Vol: 43. no. 1. pp: 42.

Kimura.Y., Taniguchi.M., Baba.K., 2002. Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance,” *Anticancer Research*. Vol: 22. no. 6A. pp: 330.

Kimura.Y., Baba.K., Okuda.H. 2000. Inhibitory effects of active substances isolated from *Cassia garrettiana* heartwood on tumor growth and lung metastasis in lewis lung carcinomabearing mice (Part 1). *Anticancer Research*. Vol: 20. no. 5. pp: 2899.

Korshunov.S.S., Skulachev.V.P., Starkov.A. A. 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett*. Vol: 416. pp: 15–18.

Kim.B., Song.Y.S. 2016. Mitochondrial dynamics altered by oxidative stress in cancer. Free Radic Res. Vol: 50(10). pp: 1065-1070.

Krüger.S., Buck.A.K., Mottaghy.F.M., Hasenkamp.E.S., Pauls.C., Schumann.T., Wibmer.T., Merk.V., Hombach Reske.S.N. 2009. Détection de métastases osseuses chez les patients atteints d'un cancer du poumon: scintigraphie osseuse plane <sup>99m</sup>Tc-MDP, PET <sup>18</sup>F-fluorure ou TEP / TDM <sup>18</sup>F-FDG . *Eur J Nucl Med Mol Imag*. Vol : 36. pp : 1807-12.

## **L**

Lahouel.M., Zini.R., Zellagui.A., Rhouati.S., Carrupt.PA., Morin.D. 2007. Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol : 355 (1). pp: 252-7.

LAMOTTE., Géraldine. 2002. Thèse d'exercice: Interactions médicamenteuses: le rôle des CYP P450". LYON. S.N.

Le Guide 2011. Prescrire, Dec 2010 n°326 (supplément)

Levy René H, Richard H, Mattson BS. *Antiepileptic Drugs*, 4e ed. New York. Meldrum.

Lewis.D.F.V. 2002. Oxidative stress: The role of cytochromes P450 in oxygen activation.*Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol: 77. pp: 1095–1100.

Li.L., Hamilton.R.F., Jr., Taylor.D.E., Holian.A. 1997. Acrolein-induced cell death in human alveolar macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. Vol: 145. pp: 331-339.

Liu.M.M., Chen.X.Y., Huang.Y.Q., Feng.P., Guo.Y.L., Yang.G., Chen.Y. 2014. Hybrids of Phenylsulfonylfuroxan and Coumarin as Potent Antitumor Agents. *J. Med. Chem*. Vol: 57. pp: 9343-9356.

Lopez.A., Garcia.JA., Escames.G., et al. 2009. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res*. Vol: 46. pp: 188-98.



Lopez-Lazaro.M. 2008. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol Nutr Food Res*. Vol: 52 Suppl 1. pp: S103-27.

Lopez-Lazaro.M.Dual. 2007. role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. *Cancer Lett*. Vol: 252. pp: 1-8.

Luo.J., Robinson.J.P., Shi.R. 2005. Acrolein-induced cell death in PC 12 cells: Role of mitochondria-mediated oxidative stress. *Neurochemistry International*. Vol:47. pp: 449-457.

Loft.S., Poulsen H.E. 1996. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine*. Vol: 74. Issue 6. pp: 297–312.

Le,page florence margot angele, grollman arthur p., sarasin alain, gentil alain. 1995. mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis*, Vol 16, Issue 11, pp 2779–2784.

Lindley celeste., Geraldine Hamilton., Jeannine.s.mccune., Stephanie faucette., stacy.s.shord., Roy.l.hawke., Hongbing wang., Darryl gilbert., Summer jolly., Bingfang yan., andedward.l.lecluyse. 2002. The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome p450 3a4 and 2b6 in human hepatocytes. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol: 30. No. 7. pp: 814-821.

Little Sally.A., Philip.E.Mirkes. 1987. DNA Cross-Linking and Single-Strand Breaks Induced by Teratogenic Concentrations of 4-Hydroperoxycyclophosphamide and Phosphoramidate Mustard in Postimplantation Rat Embryos. Vol: 47. ( 20).

Liang.H.L.M., Xue.C.C.L., Zhou.D.H., Li.C.G. 2011. Chinese herbal medicine for lung cancer: a critical literature review. *Chinese Journal of Integrated Medicine*. Vol: 9. pp: 157-160.

Liu.J., Huang.M., Tao.Y. 1988. Anwuweizonic acid and manwuweizic acid, the putative anticancer active principle of *Schisandra propinqua*, *Canadian Journal of Chemistry*. Vol: 66. no. 3. pp: 414.

Loder., Russell.G. 1969. Tumor inhibitory plants. The alkaloids of *Bruguiera sexangula* and *Bruguiera exaristata* (Rhizophoraceae), *Australian Journal of Chemistry*. Vol: 22. no.6. pp: 1271.

Louvet.M.S., Gilbert Gault., Sébastien Lefebvre., Florence Popowycz., Manon Boulven., Stéphane Besse., Etienne Benoit., Virginie Lattard., Denis Grancher. 2015. Comparative inhibitory effect of prenylated coumarins, ferulenol and ferprenin, contained in the poisonous chemotype of *Ferula communis* on mammal liver microsomal VKORC1 activity, *Phytochemistry journal*.

Lee.S., Wei.Y., Chen.C., Wang.S., Chen.K. 1995. Antitumor effects of *Ganoderma lucidum*, *The Journal of Chinese Medicine*. Vol: 6. no. 4. pp: 1.

Li.T.S., Zhang.Z., Yang.F., Fu.J.C. 1998. Montmorillonite clay catalysis an efficient and facile procedure the synthesis of coumarine via pechmann condensation of phenols with ethyl acetoacetate, Chem. Research (s). pp: 38-39.

Lahouel.M., Amedah.S., Zellagui.A., Touil.A., Rhouati.S., Benyache.F., Leghouchi.E., Bousseboua.H. 2006. The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxidant effect and flavonoids concentration. *Thérapie*. Vol: 61. pp: 347-352.

Lahouel.M., Zini.R., Zellagui.A., Rhouati.S., Carrupt.P. A., Morin.D. 2007. Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol: 35. pp: 252–259.

Lemasters.J.J., Nieminen.A.L., Qian.T., Trost.L.C., Elmore.S.P., Nishimura.Y. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta* Vol : 1366. pp : 177-196.

Lepers.C., leclerc.J.Billet.S.J.M., Guidice.L.O.P., Gosset., Shiral.P., Garçon.G. 2010. Expression génique de protéines de la métabolisation des xénobiotiques dans des cellules épithéliales bronchiques humaines en primo-culture exposées à un aérosol particulaire. 6<sup>ème</sup> édition des Journées Interdisciplinaires de la Qualité de l'Air.

Ligeret.H., Barthelemy.S., Zini.R., Tillement.J.P., Labidalle.S., Morin.D. 2004. Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radic. Biol.Med.* Vol: 36. pp: 919-929.

Liu Y., Fiskum G., Schubert D. 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* Vol:80 pp: 780-7

Liu.C.F., Lin.C.H., Lin.C.C., Lin.Y. H., Chen.C.F., Lin.C.K., Lin.S.C. 2004. Antioxidant natural products protect against Econazole-induced liver injuries. *Toxicology.* Vol: 196. pp: 87-93.

Lowry.O., Rosebrough.J., Farr.A. L., Randall.R. J. 1951. Protein measurement with folin phenol.

Likhachev.a. J., Beniashvili. S. D., Bykov, V. J., Dikun. P. P., Tyndyk, M. L., Savochkina. I. V., Yermilov. V. B. and Zabezhinski. M. a. 1992. Biomarkers for individual susceptibility to carcinogenic agents: Excretion and carcinogenic risk of benzo[a]pyrene metabolites, *Environmental Health Perspectives.* vol 98. pp. 211–214.

## *M*

Monti.M., Mirko Pinotti., Giovanni Appendino., Franco Dallochio., Tiziana Bellini., Fabiana Antognoni., Ferruccio Poli., Francesco Bernardi. 2007. Characterization of anti-coagulant

properties of prenylated coumarin ferulenol ; *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol:1770. pp: 1437-1440.

Michael.M., Doherty.M.M. 2005. Tumoral Drug Metabolism: Overview and Its Implications for Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology*. Vol: 23(1). pp: 205-229.

Mac Corkle.R.A., Freeman.K.W., Spencer.D.M. 1998. Synthetic activation of caspases: Artificial death switches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol: 95. pp: 3655-3660.

Mannering.G.J. 1971. Microsomal enzyme systems which catalyze drug metabolism. In : *Fundamental of drug metabolism and drug disposition*. La Du B.N., Mandel H.G., Way E.L. Editions Williams and Wilkins, Baltimore : 206-52.

Marnett.LJ. 1999. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*. Vol: 424. pp: 83-95.

Marshall.M.E., Butler.K., Hermansen.D., 1990.. Treatment Of Hormone-Refractory Stage-D Carcinoma Of Prostate with Coumarin (1,2-Benzopyrone) And Cimetidine - a Pilot-Study. *Prostate*. Vol: 17. pp: 95-99.

Mateen.S., Tyagi.A., Agarwal.C., Singh.RP., Agarwal.R. 2010. Silibinin inhibits human non small cell lung cancer cell growth through cell-cycle arrest by modulating expression and function of key cell-cycle regulators. *Mol Carcinog Mar*. Vol: 49(3). pp: 247-58.

Michael.M., Doherty.MM., 2005. Tumoral drug metabolism: overview and its implications for cancer therapy. *J Clin Oncol*. Vol: 23. pp: 205-29.

Miroslav Dostalek., Klarissa.D.Hardy., Ginger L.Milne., Jason.D.Morrow.,Chi Chen., Frank.J.Gonzalez., Jun Gu., Xinxin Ding., Delinda.A.Johnson., Jeffrey.A.Johnson., Martha.V.Martin., Peter Guengerich.F. 2008. Development of Oxidative Stress by Cytochrome P450Induction in Rodents Is Selective for Barbiturates and Related to Loss of Pyridine Nucleotide-dependent Protective Systems, *the journal of biological chemistry*. Vol: 283. no. 25. pp: 17147-17157.

Mita.M., Tolcher.A.W. 2005. Novel apoptosis inducing agents in cancer therapy. *Current Problems in Cancer*. Vol: 29. pp: 8-32.

Mitani.F., Shimizu.T., Ueno.R., Ishimura.Y., Izumi.S., Komatsu.N., Watanabe.K. 1982. Cytochrome P-45011 $\beta$  et P-450SCC dans le cortex surrénal: distribution zonale et localisation intramitochondriale par la méthode des anticorps marqués à la peroxydase de raifort. *J Histochem Cytochem*. Vol: 30. pp: 1066-1074.

Mitchell.P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. Vol: 191. pp: 144-148.

Morin.Y.Paris. 2003. Larousse médical. pp :1248.

Murphy.A.L. 1999. Apoptin: Nuclear switch triggers cancer cell death. *Gene Therapy*. Vol: 6. pp: 713-714.

Murugesan,V. 2008. Single-step synthesis of coumarin derivatives over Al-MCM-41 and its Farnsworth.N.R., Wagner H., orrhammer.H.P.H., Fong.H.H.S. 1968. *Euphorbia esula L. Euphorbiaceae I. Preliminary phytochemical and biological evaluation. Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol: 5. no. 6. pp: 933-939.

Mate Jose.M.S., Cristina Perez-Gome., Ignacio nunez de Castro. 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, Vol: 32. No. 8. pp: 595– 603.

McCall Mark.R., Balz Frei. 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biology and Medicine*. Vol: 26. 1034-1053.

Masella Roberta., Roberta Di Benedetto., Rosaria Vari., Carmela Filesi., Claudio Giovannini. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. pp: 577-586.

Maccubbin Alexander.E., Lida Caballes., James.M.Riordan., Dee.H.Huang., Hira.L.Gurtoo. 1991. A Cyclophosphamide /DNA Phosphoester Adduct Formed in Vitro and in Vivo. *American Association for Cancer Research*.Vol: 51. ( 3).

Min.B., Lee.H., Bae.K., Gao.J., Nakamura.N., Hattori.M. 2002. Antitumor activity of culture dmycelia of *Ganoderma lucidum*, *Natural Product Sciences*. Vol: 8. no. 2. pp: 52.

Mishra.L., Singh.B.B., Dagenais.S. 2000. Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): areview, *Alternative Medicine Review*. Vol: 5. no. 4. pp: 334.

Miyake.Y., Murakami.A., Sugiyama.Y., Isobe.M., Koshimizu.K., Ohigashi.J.Agric.H. 1999. Identification of Coumarins from Lemon Fruit (*Citrus limon*) as Inhibitors of in Vitro Tumor Promotion and Superoxide and Nitric Oxide Generation *Food Chem*.Vol: 47. pp: 3151-3157.

Marc.W. F., Catherine.B. C., Manisha.P., Bennett.V.H., Sten.O. 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol. Interven*. Vol: 5. pp: 94-111.

Morin.D., Barthelemy.S., Zini.R., Labidalle.S. 2001. Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Letters* Vol: 495. pp: 131-136.

## N

Nakayama.T., Kimura.T., Kodama.T., Nagata.C. 1983. Generation of hydrogen peroxide and superoxide anion from active metabolites of naphthylamines and aminoazodyes. *Carcinogenesis*4. pp: 765–769.

Nanba.H., Mori.K., Toyomasu.T., Kuroda.H. 1987. Antitumoraction of shiitake (*Lentinus edodes*) fruit bodies orally administered to mice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. Vol: 35.no. 6. pp: 2453.

Nath.R., Ocando.J.Richie., Chung.F. 1997. Effects of L-butathionine-[S,R]sulfoximine on I,N2-propanodeoxyguanosine adduct levels in tissue DNA of F344 rats. *Proceedings of the Annual Meeting of the American Association on Cancer Research*. Vol: 38. pp: A848.

Nelson.D.R., Koymans.L., Kamataki.T., Stageman.J.J., Feyereisen.R., Waxman.D.J., Waterman.M.R., Gotoh.O., Coon.M.J., Estabrook.R.W., Gunsalus.I.C., Nebert.D.W. 1996. P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. Vol: 6. pp: 1-42.

Nemunaitis.J., Swisher.S.G., Timmons.T., Connors.D., Mack.M., Doerksen.L., Weill.D., Wait.J., Lawrence.D.D., Kemp.B.L., Fossella.F., Glisson.B.S., Hong.W.K., Khuri.F.R., Kurie.J.M., Lee.J.J., Lee.J.S., Nguyen.D.M., Nesbitt.J.C., Perez-Soler.R., Pisters.K.M.W., Putnam.J.B., Richli.W.R., Shin.D.M., Walsh.G.L., Roth.J. 2000. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. Vol: 18. pp: 609-622.

Nicholson.D.W. 2000. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*. Vol: 407. pp: 810-816.

Noda.K., Ohno.N., Tanaka.K., et al. 1998. A new type of biological response modifier from *Chlorella vulgaris* which needs protein moiety to show an antitumour activity, *Phytotherapy Research*. Vol: 12. no. 5. pp: 309-319.

Nunoshiba.T., Yamamoto.K. 1999. Role of glutathione on acrolein-induced cytotoxicity and mutagenicity in *Escherichia coli*. *Mutat Res*. Vol: 442(1). pp: 1-8.

## O

Ochoa.JG., Riche.W. Page consulté le 29 juin (2004. Antiepileptic drugs : an overview. of the mitochondrial pathway." *Biochim Biophys Acta*. Vol: 1743. pp: 255-267.

Ogasawara.J., Watanabe-Fukunaga.R., Adachi.M., Matsuzawa.A., Kasugai.T., Kitamura.Y., Itoh.N., Suda.T., Nagata.S. 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. Vol: 364. pp: 806-809.

Oghlissi-Dehak.K., Lawton.P., Michalet.S., Bayet.C., Darbour.N., Hadj Mohammed.M., Badjah-Hadj-Ahmed., Dijoux-Franca.M-G., Guilet.D. 2008. Sesquiterpenes from aerial parts of *Ferula vesceritensi* s. *Phytochemistry*. Vol: 69. pp: 1933-1938.

Olie.R.A., Simões-Wust.A.P., Leech.S.H., Stahel.R.A., Zangemeister-Wittke.U., Baumann. B., Fabbro.D. 2000. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression

induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Research*. Vol: 60. pp: 2805-2809.

OMS. 2014. Mode opératoire normalisé pour la détermination des nitrosamines spécifiques au tabac dans la fumée de cigarette traditionnelle dans des conditions ISO et de tabagisme intense .

Omura.T., Sato.R. 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*. Vol: 237. pp: 1375-6.

Oyama Tsunehiro., Kenji Sugio., Hidetaka Uramoto., Toshihiro Kawamoto., Norio Kagawa., Sorena Nadaf., David Carbone., Kosei Yasumoto. 2007. Cytochrome P450 expression (CYP) in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Bioscience*. Vol: 12. pp: 2299-2308.

Ozenda.P. 1958. La flore de Sahara septentrional et central. Ed. C.N.R.S. Paris. P 486.

Paine, M.F. (2006). The human intestinal cytochrome P450 "PIE." *Drug Metab. Dispos*. Vol: 34.

## P

Padmavathi Radhakrishnan ., Palaniyandi Senthilnathan., Dechen Chodon., Dhanapal Sakthisekaran. 2006. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats *Life Sciences* . Vol:78 (24). pp: 2820-2825 .

Park.Y K., Ikegaki.M., Matias of Alencar.S. 2000. Classificação das propolis Brasileiro suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem. Doce*. Vol: 58. pp: 158-163.

Patel.J., Wood.J.C., Leibman.K.C. 1980. The biotransformation of allyl alcohol and acrolein in rat liver and lung preparations." *Drug Metab. Dispos*. Vol: 8. pp: 305-308.

Patel.J.M. 1987. Stimulation of cyclophosphamide-induced pulmonary microsomal lipid peroxidation by oxygen. *Toxicology*. Vol: 45(1). pp: 79-91.

Patel.J.M. 1990. Metabolism and pulmonary toxicity of cyclophosphamide. *Pharmacol Ther*. Vol: 47(1). pp: 137-46.

Patel.J.M., Block.E.R. 1985. Cyclophosphamide- induced depression of the antioxidant defense mechanisms of the lung. *Exp Lung Res*. Vol: 8(2-3). pp: 153-65.

Patel.J.M., Block.E.R. 1993. Acrolein-induced injury to cultured pulmonary artery endothelial ceUs. *Toxicol Appl Pharmacol*. Vol: 122. pp: 46-53.

Patel.J.M., Block.ER., Hood.CI. 1984. Biochemical indices of cyclophosphamide-induced lung toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. Vol: 76(1). pp: 128-38.

Pelicano.H., Carney.D., Huang.P. 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*. Vol : 7 (2). pp: 97-110.

Pelicano.H., Carney.D., Huang.P., 2004. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat.* Vol: 7. pp: 97-110.

Penning Trevor.M., Tsuyoshi.S.Ohnishi, Tomoki Ohnishi., Ronald.G.Harvey. 1996 Generation of Reactive Oxygen Species during the Enzymatic Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon *trans*-Dihydrodiols Catalyzed by Dihydrodiol Dehydrogenase. *Chem. Res. Toxicol.* Vol: 9 (1). pp: 84-92.

Perdue Jr.R., Smith.R., Wall.M., Hartwell.J., Abbott.B. 1970. *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). Source of camptothecin, an antileukemic alkaloid, *Technical Bulletin 1415*, ARS, USDA, Washington, DC, USA.

Perdue Jr.R.E. 1982. KB cell culture: I. Role in discovery of antitumor agents from higher plants, *Journal of Natural Products*, Vol: 45. no. 4. pp: 418.

Perez-Cruz,L., Carcamo.L.M., Golde.D.W. 2007. Caspase-8 dependent TRAIL-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase. *Apoptosis.* Vol: 12. pp: 225-234.

Persinos.G.J., Quimby.M.W., Mott.A.R., et al. 1967. Studies on Nigerian plants: III. Biological and phytochemical screening of *Lophira lanceolata*, and the isolation of benzamide. *Planta Medica.* Vol: 15. no. 4. pp: 361.

Persson.J.O., Terelius.Y., Ingelman-Sundberg.M. 1990. *Xenobi-otica.* Vol : 20. pp : 887-900.

Peter Jones., Suggett.A.1968. The catalase–hydrogen peroxide system. A theoretical appraisal of the mechanism of catalase action *Biochem J.* Vol:110(4). pp: 621-629.

Pharmacocinétique clinique. 1998. Modification de l'exposition plasmatique aux médicaments: mécanismes et conséquences cliniques.. *pharmapk.* [En ligne] 2010. [Citation : 01 07 2012.] <http://pharmapk.pharmacie.univmrs.fr/Cours%20PK/Joseph/interactions-2010.pdf>. *Pharmacology.* Vol: 99. pp: 193-206.

Philippe-Aubert. 2006. Cytotoxicité de l'isocaryophyllène sur les cellules L-929 : caractérisation du mécanisme d'action. Thèse ou mémoire de l'UQAC (Mémoire de maîtrise).

Pietersen.A., Noteborn.M.H.M. 2000. Apoptin®. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol: 465. pp: 153-161.

Pietersen.A.M., Van Der Eb.M.M., Rademaker.H.J., Van Den Wollenberg.D.J.M., Rabelink.M.J.W.E., Van Ormondt.H., Van Der Eb.A.J., Hoeben.R.C., Noteborn.M.H.M., Masman.D., Kuppen.P.J.K., Van Dierendonck J.H., Van. 1999.

Plona.R., Vidal-Puig.A.J., Wang.S., Roebuck.S. J., Brand.M. D. 2003. A signalling role for 4-hydroxy-2 nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J.*Vol: 22. pp: 4103-4110.

Potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochem. Biophys.Acta* Vol: 850. pp: 436-448.

Price.Charles., Gaucher.G.M., Koneru.P., Shibakawa.R., Sowa.J R., yamaguchi.M. 1969. Mechanism of action of alkylating agents. Vol: 163(2). pp: 593-598 .

## Q

Qu SX. 1996. Stacey NH – Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo[a]pyrene. Carcinogenesis. Vol : 17( 1). pp : 53-59.

Quezel.P., Santa.S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I, CNRS Paris.

Qun Wei., Jun-Ya Ning., Xi Dai., Yuan-Di Gao., Le Su., Bao-Xiang Zhao., Jun-Ying Miao. 2018. Discovery of novel HSP90 inhibitors that induced apoptosis and impaired autophagic.

## R

Rahman Irfan., William MacNee. 1999. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease.lung cellular and molecure physiology. Vol: 277, issue 6. pp: L1067- L1088.

Raj,L., Ide.T., Gurkar.A.U., Foley.M., Schenone.M., Li.X., Tolliday.N.J., Golub.T.R., Carr.S.A.Shamji.A.F., et al. 2011. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress responseto ROS. Nature. Vol: 475. pp: 231-234.

Ralph Stephen .J., Neuzil Jiri . 2009. Mitochondria as Targets for Cancer Therapy. Mitochondria and Cancer . pp: 211-249.

Ramu.K., Perry.C.S., Ahmed.T., Pakenham.G., Kehrer.J.P. 1996. Studies on the Basis Raven Press:1995.

Reagent. J. Biol.Chem. Vol: 193. pp: 265-275.

Reed. J.C. 2001. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. Trends in Molecular Medicine. Vol: 7. pp: 314-319.

Reiter RJ., Mayo JC., Tan DX., et al. 2016. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. J Pineal Res. Vol: 61. pp: 253-78.

Renschler Markus.F. 2004. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy . European Journal of Cancer . Vol :40 (13 ). pp: 1934-1940.

Renschler MF. 2004. The emerging role of reactive oxygen species in cancer therapy. Eur J Cancer. Vol: 40. pp: 1934-40.



Rodriguez C., Martin V., Herrera F., et al. 2013. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. *Int J Mol Sci*. Vol: 14. pp: 6597-613.

Rodriguez-Antona.C., Ingelman-Sundberg.M., 2006. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene*.Vol:25. pp: 1679–1691.

Rooney.PH., Telfer.C., McFadyen.MC., Melvin.WT., Murray.GI. 2004. Therole of cytochrome P450 in cytotoxic bioactivation : future therapeuticdirections. *Curr Cancer Drug Targets*. Vol: 4. pp: 257-65.

Roos WP., Thomas AD., Kaina B. 2016. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer*. Vol: 16. pp: 20-33.

Ross.WC. 1953. The chemistry of cytotoxic alkylating agents.Vol: 1. pp: 397-449.

Roth.J.A., Grammer.S.F., Swisher.S.G., Nemunaitis.J., Merritt.J., Meyn.R.E.Jr. (2000). Gene replacement strategies for treating non-small cell lung cancer. *Seminars in Radiation Oncology*. Vol: 10. pp: 333-342.

Rothe.M., Pan.M.G., Henzel.W.J., Ayres.T.M., Goeddel.D.V. 1995. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*. Vol: 83. pp:1243-1252.

Roy.P., Yu.LJ., Crespi.CL., Waxman.DJ. 1999. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalyts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P 450 profiles. *Drug Metab Dispos*.Vol: 27(6). pp: 655-66.

Rudra.P.K., Krokan.H.E. 1999. Acrolein cytotoxicity and glutathione depletion in n-3 fatty acid sensitive-and resistant human tumor cells. *Anticancer Res*. Vol: 19. pp: 461-469.

Rustin.P., Chrétien.D., Bourgeron.T., Gerard.B., Rotig.A., Saudubray.J.M., Munnich.A. 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta*. Vol: 228. pp: 35-51.

## S

Staniszewski.A., Slesak.B., Kolodziej.J., Harlozinska-Szmyrka.A., Nowicky.J.W. 1992. Lymphocyte subsets in patients with lung cancer treated with thiophosphoric acid alkaloid.

Singh.S., Singh.D., Gupta.M., Singh.N., Kohli R. 1979. An experimental evaluation of antitumor activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha) and Geriforte, *Indian Journal of Pharmacology*. Vol: 11. no. 65b.

Su.S.Y. 1985. Treatment of lung cancer with brain metastasis using an intravenous drip of a 10% emulsion of *Brucea javanica* seminal oil.*Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*. Vol: 5. no. 2. pp: 86.

Szewczyk Adam ., Wojtczak lech. 2002. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacol Rev.* Vol: 54. pp: 101-127.

Settaf Abdellatif., Mouna Zahidy., Aziz Elimadi., Rosa Sapena., Issam Abd Alsamad., Jean-Paul Tillement., Didier Morin. 2000. S-15176 reduces the hepatic injury in rats subjected to experimental ischemia and reperfusion. *European Journal of Pharmacology.* Vol : 406 ( 2 ). pp: 281-292.

Sacchetti.G., Appendino.G., Ballero.M., Loy.C., Poli.F. 2003. Vitae fluorescence as a tool to differentiate between poisonous and non poisonous populations of giant fennel (*Ferula communis*) of the island Sardinia (Italy). *Biochem. Syst. Ecol.* Vol: 31. pp: 527-534.

Sard.L., Accornero.P., Tornielli.S., Delia.D., Bunone.G., Campiglio.M., Colombo.M.P., Gramegna.M., Pierotti.M.A., Sozzi.G., Croce.C.M. 1999. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* Vol: 96. pp: 8489-8492.

Sasaki.H., Sheng.Y.L., Kotsuji.F., Tsang.B.K. 2000. Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Research.* Vol: 60. pp: 5659-5666.

Schenkman.J.B., Greim.H. 1993. Cytochrome P450. *Handbook of experimental pharmacology.* Cytochrome P450. Berlin, Springer-Verlag.

Sen.C.K. 2000. Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cel! Regul.* Vol: 36. pp: 1-30.

Shaik.IH., Mehvar.R. 2010. Cytochrome P450 induction by phenobarbital exacerbates warm

Shariat.S.F., Desai.S., Song.W., Khan.T., Zhao.J., Nguyen.C., Foster.B.A., Greenberg.N., Spencer.D.M., Slawin.K.M. 2001. Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: A novel "Death Switch" gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Research.* Vol: 61. pp: 2562-2571.

Shiva.S., Crawford.J.H., Ramachandran.A., Ceaser.E.K., Hillson.T., Brookes.P.S., Patel.R.P., Darley-Usmar.V.M. 2004. Mechanisms of the interaction of nitroxyl with mitochondria. *Biochem J.*

Sozzi.G., Moiraghi.L., Tagliabue.E., Ghirelli.C., Tornielli.S., Sard.L., Pierotti.M.A., Pilotti.S., Pastorino.U., Pezzella.F., Huebner.K., Croce.C.M. 1998. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Research.* Vol: 58. pp: 5032-5037.

Sozzi.G., Tornielli.S., Sard.L., Minoletti.F., Pierotti.M.A., Tagliabue.E., Pilotti.S., Pastorino.U., Ratcliffe.C., Goldstraw.P., Pezzella.F., Veronese.M.L., Huebner.K., Croce.C.M. 1997. Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with FHIT gene abnormalities. *Cancer Research.* Vol: 57. pp: 5207-5212.

St-Pierre.J., Buckingham JA., Roebuck SJ., Brand MD. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem.* Vol: 277. pp: 44784-44790.

Sudha.S., Venkatachalam.K., Vishnu Priya.S., Herbert Mabel.J., Palanichamy.M., supported catalysts under solvent-free condition. *J. Mol. Catal. A: Chem.* Vol: 291. pp: 22-29.

Sekido.Y., Kwun.M.Fong., John.D.Minna. 2003. Molecular Genetics of Lung Cancer. *Annual Review of Medicine.* Vol: 54. pp: 73-87.

Siems Werner G., Tilman Grune., Esterbauer.H. 1995. 4-hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small intestine. *Mol Aspects Med.* Vol: 24(4-5). pp: 167-75.

Stadtman Earl .R. 2004. Role of Oxidant Species in Aging, *Current Medicinal Chemistry.* Vol: 11 .pp: 1105-1112.

Seidegard Janeric.,William.R.vorachekt., Ronald.W.perot., William.R.pearsont. 1988. hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc.Nati.Acad.Sci.USA.* Vol: 85. pp: 7293-7297.

Sensenbrenner Lyle.L., John.J.Marini., Michael Colvin. 1979. Comparative Effects of Cyclophosphamide, Isophosphamide, 4-Methylcyclophosphamide, and Phosphoramidate Mustard on Murine Hematopoietic and Immunocompetent Cells .*Journal of the National Cancer Institute.* Vol: 62. Issue 4. pp: 975-981.

Sladek NE. 1988. Metabolism of oxazaphosphorines. *Pharmacol Ther.* vol: 37(3). pp: 301-55.

Subramanian.S., Rajendiran.G., Sekhar.P., Gowri.C., Govindarajulu.P., Aruldas.MM. 2006. Reproductive toxicity of chromium in adult bonnet monkeys (*Macaca radiata* Geoffrey). Reversible oxidative stress in the semen. *Toxicol Appl Pharmacol.* Vol: 215(3). pp: 237-49.

Solary.E., Bertrand.R., Pommier.Y. 1993. Le rôle de l'apoptose dans la genèse et le traitement du cancer. *Revue médecine sciences.* pp: 06-07.

Sokoloff.B. 1968. The oncostatic and oncolytic factors present in certain plants. *Oncology.* Vol: 22. no. 1. pp: 49.

Saitoh.H., Feng.W., Matsuzawa.T., Ikekawa.T. 1997. Antitumor activity of *Hypsizigus marmoreus*. II. preventive effect against lung metastasis of Lewis lung carcinoma, *Yakugaku Zasshi.* Vol: 117. no. 12. pp: 1006.

Shentu.J., Wei.P., Wang.A., et al. 1984. A study of the antitumor effect of *Euphorbia fischeriana* steud on mice with induced tumor, *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine.* Vol: 4. pp: 46-47.

Sashidhara.K.V., Kumar.A., Kumar.M., Srivastava.A., Puri.A., Bioorg.Med. 2010. Synthèse et activité hypolipémiant de nouveaux dérivés de bisindoliques coumarine, *Chem. Lett.* Vol: 20. pp: 6504-6507.

Sashidhara.K.V., Kumar.A., Kumar.M., Sarkar.J., Sinha.S., Bioorg.Med. 2010. Synthesis and in vitro evaluation of novel coumarin–chalcone hybrids as potential anticancer agents Chem. Lett. Vol: 20. pp: 7205-7211.

Sastre.J., Pallardo.F.V., Garcia de la Asuncion.J., Vina.J. 2000. Mitochondria, oxidative stress and aging. Free radic. Res. Vol: 32. pp: 189-198.

Scalbert.A., Manach.C., Morand.C., Remesy.C., Jimenez.L. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. Vol: 45. pp: 287-306.

Sheehan.D., Meade.G., Foley.V.M., Dowd.C.A. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochem J. Vol: 360(1). pp: 1-16.

Singh.M.M., Agnihotri.A., Garg.S.N., Agarwa.S.K., Gupta.D.N., Keshri.G., Kamboj.V.P. 1988. Antifertility and hormonal properties of certain carotane sesquiterpenes of *Ferulajaeschkeana*. Planta. Med. Vol: 54. pp: 492-494.

Siegel.R., Ma.J., Zou.Z. 2014. Statistiques Jemal A. Cancer, . CA Cancer J Clin . Vol : 64. pp: 9-29.

## *T*

Tyagi.A., Singh.RP., Ramasamy.K., Raina.K., Redente.EF., Dwyer-Nield.LD. 2009. Growth inhibition and regression of lung tumors by silibinin: modulation of angiogenesis by macrophage-associated cytokines and nuclear factor-kappaB and signal transducers and activators of transcription 3. Cancer Prev Res (Phila). Vol: Jan,2(1). pp: 74-83.

Turrens.JF. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. Vol: 552. pp: 335- 344.

Travis.WD., Brambilla.E., Muller–Hermelink.HK., Harris.C. 2004. Tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Pathology and genetics. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer Press.

Tracey.K.J., Cerami.A. 1990. Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol: 587. pp: 325-331.

Tolomeo.M., Grimaudo.S., Di Cristina.A., Pipitone.R. M., Dusonchet.L., Meli.M., Crosta.L., Gebbia.N., Invidiata.F.P., Titone.L., Simoni.D. 2008. Galangin increases the cytotoxic activity of imatinib mesylate in imatinib-sensitive and imatinib-resistant Bcr-Abl expressing leukemia cells. Cancer Lett. Vol: 265. pp: 289-297.

Thornes.R.D., Dal.L., Lynch.G., Breslin.B., Browne.H., Browne.H.Y., Corrigan.T., Daly.P., Edwards.G., Tian.X., Huo.X., Dong.P., et al. 2015. Sulfation of melatonin: enzymatic characterization, differences of organs, species and genders, and bioactivity variation. Biochem Pharmacol. Vol: 94. pp: 282-96.

Temple.N.J. 2000. Antioxidants and disease: more questions than answers. Nutrition Research. Vol: 20. pp: 449-459.

Tang.L., Zeng.J., Geng.P., et al. 2018. Global Metabolic Profiling Identifies a Pivotal Role of Proline and Hydroxyproline Metabolism in Supporting Hypoxic Response in Hepatocellular Carcinoma. Clin Cancer Res. Vol: 24. pp: 474-485.

Tanel.A., Averill-Bates.D. 2007a. Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein. Free Radic Biol Med. Vol: 42. pp: 798-810.

Tanel.A., Averill-Bates.D. 2005. The aldehyde acrolein induces apoptosis via activation.

Tan.DX., Manchester.LC., Liu.X., et al. 2013. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. J Pineal Res. Vol: 54. pp: 127-38.

Tamemoto.K., Takaishi.Y., Chen.B., Kawazoe.K., Shibata.H., Higuti.T., Honda.G., Tagliapietra.S., Aragno.M., Ugazio.G., Nano.GM . 1989. Études expérimentales sur la toxicité de certains composés isolés à partir de *Ferula communis* chez le rat. Chem Pathol Pharmacol. Vol : nov, 66 (2). pp: 333-6.

Tachibana Issei., Smith S Justin., Kazunari Sato., Sandra.M.Hosek., David.W.Kimmel., Robert.B.Jenkins. 2000. Investigation of germline PTEN, p53, p16<sup>INK4A</sup>/p14<sup>ARF</sup>, and CDK4 alterations in familial glioma. American journal of medical genetics. Vol: 92. issue 2. pp: 136-141.

## U

Ulubelen.A., Cole.J.R. 1966. Proteinaceous antitumor substances from plants *Mirabilis multiflora*. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol: 55. no. 12. pp: 1368.

Unnikrishnan.M., Kuttan.R. 1990. Tumour reducing and anticarcinogenic activity of selected spices, Cancer letters. Vol: 51. pp: 85-89.

## V

Vachtenhiem.J. 1997. Occurrence of ras mutations in human lung cancer Minireview, Neoplasma. Vol: 44(3). pp: 145-9.

Valeriote.F., van Putten.L. 1975. Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review. Cancer Res. Vol:35(10). pp: 2619-30.

Valko.M., Rhodes.C.J., Moncol.J., Izakovic.M., Mazur.M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. Vol: 160 (1) ISSN 0009-2797. pp: 1-40.

Valko.M., Izakovic.M., Mazur.M., Christopher.J.Rhodes., Joshua Telser. 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol: 266. pp: 37-56.

Vazquez.F., Lim.J.-H., Chim.H., Bhalla.K., Girnun.G., Pierce.K., Clish.C.B., Granter.S.R., Widlund.H.R., Spiegelman.B.M. et al. 2013. PGC1 $\alpha$  Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell* 23, Springer-Verlag, Berlin 1993. Vol: 105. pp: 287-301.

Velikova.M., Bankova.V., Sorkun.K., Houcine.S., Tsetkova.I., Kujemgiev.A. 2000. Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z. Naturforsch.* Vol: 55. pp: 790-803.



Wang Qian., Yalan Guo., Shanshan Jiang., Mengxue Dong., Kudelaidi Kuerban., Jiyang Li., Meiqing Feng., Ying Chen., Li Ye. 2018. A hybrid of coumarin and phenylsulfonylfuroxan induces caspase-dependent apoptosis and cytoprotective autophagy in lung adenocarcinoma cells, *La phytomédecine*. Vol: 39. pp: 160-167.

Wang.L., Azad.N., Kongkaneramt.L., Chen.F., Lu.Y., JiangB.H., Rojanasakul.Y. 2008b. The Fas Death Signaling Pathway Connecting Reactive Oxygen Species Generation and FLICE Inhibitory Protein Down-Regulation. *J Immunol*. Vol: 180. pp: 3072- 3080.

Wang.S.S., Esplin.E.D., Li.J.L., Huang.L., Evans.G.A., Gazdar.A., Minna.J. 1998. Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science*. pp: 282,284-287.

Wang.Z.Q., Chen.Y.M., Jin.G.W., Lin.S.S. 1995. "Combined therapy of brain metastasis in lung cancer," *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*. Vol: 1. pp: 36.

WATERMAN.M.R. 1992. Cytochrome P450: cellular distribution and structural considerations." *Current Opinion in Structural Biology*. Vol: 2. pp: 384-387.

Weber.U., Steffen.B., Siegers.C. Antitumor-activities of coumarin, 7-hydroxy-coumarin and its in several human tumor cell lines, *Research communications in molecular pathology*.

Weiss.JN., Korge.P., Honda.HM., Ping.P. 2003. Rôle de la transition de perméabilité mitochondriale dans les maladies du myocarde. *Circ Res*. Vol: 93 (4). pp: 292-301.

Welling.D.P.G. Dec.2012. Interactions Affecting Drug Absorption. *Clin. Pharmacokinet*. Vol: 9. no. 5. pp: 404-434.

Willet. K., Detry, O. and Sluse, F. E. 2000. Resistance of isolated pulmonary mitochondria

during in vitro anoxia/reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*.vol: 1460. pp. 346–352.

WILLIAMS.J.A., MARTIN.F. L., MUIR, G. H., HEWER, A., GROVER. P. L., PHILLIPS.D.H. 2000a. Metabolic activation of carcinogens and expression of various cytochromes P450 in human prostate tissue. *Carcinogenesis*. World Health Organization (2002). "Acrolein". Vol:21(9). pp: 1683-9

Wu.S.C. 1991. Preoperative intravenous drip of an anti-tumor Chinese herb preparation, *Brucea javanica* oil emulsion (YaDan Zi Emulsion) for lung cancer, *Shang-Hai I Hsueh*. Vol: 14. pp: 273.

## X

Xie.H., Afsharian.P., Terelius.Y., Mirghani.R.A.U., Yasar.A-L., Hagbjo.rk.S., Lundgren.Y.Hu., Rane.A., Hassan.M. 2005. Cyclophosphamide induces mRNA, protein and enzyme activity of cytochrome P450 in rat. *Xenobiotica*. Vol:35(3). pp: 239-251.

Xu.L.H., Owens.L.V., Sturge.G.C., Yang.X., Craven.R.J., Cance.W.G., Liu.E.T. 1996b. Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth and Differentiation*. Vol: 7. pp: 413-418.

## Y

Yan.Y., Wang.Y., Tan.Q., Lubet.RA., You.M. 2005. Efficacy of deguelin and silibinin on benzo(a)pyrene-induced lungtumorigenesis in A/J mice. *Neoplasia*. Vol: Dec,7(12). pp: 1053-7.

Yang.C., Lu.W., Niu.J. 1983. Studies on the antitumor action of xiangshenboheyu(a mixture composed of *Pelargonium graveolens* and *Sophora flavescens* and other herbs). *Chung Ts'ao Yao*. Vol: 14.no.9. pp: 409–410.

Yang.G., Wang.Z., Kim.S., et al. 1997. Characterization of early pulmonary hyperproliferation and tumor progression and their inhibition by black tea in a 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis model with A/J mice, *Cancer Research*. Vol: 57. no. 10. pp: 1889.

Yang.J., Mani.S.A., Donaher.J.L., Ramaswamy.S., Itzykson.R.A., Come.C., Savagner.P., Gitelman.I., Richardson.A., Weinberg.R.A. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. Vol: 117. pp: 927-939.

Younes.A. 2004. New treatment strategies for aggressive lymphoma. Research Support, Non-U.S. Gov't, Review, Journal Article. Vol: 31. pp: 10-13.

Yu.X., Li.Z., Zheng.H., et al. 2017. Protective roles of melatonin in central nervous system diseases by regulation of neural stem cells. *Cell Prolif.* Vol: 50. pp: e12323.

Yuen.A.R., Sikic.B.I. 2000. Clinical studies of antisense therapy in cancer. Vol: 5.

Yun.T. K., Yun.Y.S., Han.I.W. 1980. An experimental study on tumor inhibitory effect of red ginseng in mice and rats exposed to various chemical carcinogens, in Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Ginseng Symposium, Seoul, Republic of Korea. pp: 87-113.

Yun.Y.S., Lee.Y.S., S.K.O., Jung.I.S. 1993. Inhibition of autochthonous tumor by ethanol insoluble fraction from *Panax ginseng* as an immunomodulator, *Planta Medica*. Vol: 59. no. 6. pp: 521-524.

## Z

Zangar.R.C., Davydov.D.R., Verma.S. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol: 199. pp: 316-331.

Zellagui.A., Gherraf.N., Rhouati.S. 2012. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Ferula vesceritensis* Coss et Dur. Leaves, endemic in Algeria. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. Vol: 2. pp: 31.

Zhuang.S.M., Shvarts.A., Jochemsen.A.G., Van Oorschot.A.A.A.M., Van Der Eb.A.J., Noteborn.M.H.M. 1995. Differential sensitivity to Ad5 E1B-21kD and Bcl-2 proteins of apoptin-induced versus p53-induced apoptosis. *Carcinogenesis*. Vol: 16. pp: 2939-2944.

Zorov.DB., Filburn.CR., Klotz.LO., Zweier.JL., Sollott.SJ. 2000. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med*. Vol: 192. pp: 1001-14.

Zuo.G.Y., Wang.C.J., Han.J., LiY.Q., Wang.G.C. 2016. Synergism of coumarins from the Chinese drug *Zanthoxylum nitidum* with antibacterial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*. Vol: 23. pp: 1814-1820.



## DISRUPTION OF MITOCHONDRIAL MEMBRANE POTENTIAL BY FERULENOL AND RESTORATION BY PROPOLIS EXTRACT: ANTIAPOPTOTIC ROLE OF PROPOLIS

BOUSSENANE H. NADIA,<sup>1</sup> KEBSA WIDED,<sup>1</sup> BOUTABET KHEIRA,<sup>1</sup> ROUIBAH HASSIBA,<sup>1</sup>  
BENGUEDOUAR LAMIA,<sup>1</sup> S. RHOUATI,<sup>2</sup> M. ALYANE,<sup>1</sup>  
A. ZELLAGUI<sup>2</sup> and M. LAHOUEL<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Laboratoire de Toxicologie Moléculaire,  
Université de Jijel, 18000 Jijel, Algérie

<sup>2</sup>Département de Chimie, Université de Constantine, Laboratoire de Chimie des Produits Naturels,  
25000 Constantine, Algérie

<sup>3</sup>Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Laboratoire de Pharmacologie et Phytochimie,  
Université de Jijel, 18000 Jijel, Algérie

(Received: June 13, 2008; accepted: November 17, 2008)

This paper reports an investigation of the ability of propolis extract (a resinous substance collected by honeybees from various plant sources) to restore the collapse of mitochondrial membrane potential induced by ferulenol, a sesquiterpene prenylated coumarin derivative isolated from the plant *Ferula vesceritensis*. We show that ferulenol was able to induce the permeability transition pore (PTP) opening. This effect is caused by the interaction of the compound with the mitochondrial respiratory chain, more particularly by the fall of membrane potential and the inhibition of complex II. We have previously demonstrated that this inhibition results from a limitation of electron transfers involved in the respiratory chain and initiated by the reduction of ubiquinone. We hypothesized that the protective effect of propolis could be due to a direct action on mitochondrial functions. So we have investigated *in vitro* the mitochondrial effects of Algerian propolis using rat liver mitochondria, by analysing their effects on membrane potential, mitochondrial respiration and mitochondrial swelling. We show that propolis extract was able to restore the fall of mitochondrial membrane potential. Taken together these data reveal that propolis extract may be an interesting inhibitor of PTP and provide an additional mechanism by which the natural product propolis extract may restore the mitochondrial membrane potential and to prevent apoptotic process.

**Keywords:** Propolis extract – *Ferula vesceritensis* – membrane potential – mitochondria – apoptosis

### INTRODUCTION

Propolis, a natural product, is a kind of crude medicine long used as a folk remedy. It contains various chemical components and exhibits a broad spectrum of biological activities [24, 30]. The most important pharmacologically active constituents in propolis are flavanoids (flavones, flavonols, and flavonones), phenolics, and aromat-

\* Corresponding author; e-mail: lahouelmesbah@yahoo.fr

ics [4, 36]. By their antioxidant activity, they are able to attenuate the development of cancer and inflammatory diseases [16, 17, 36]. Indeed, one of the most exciting recent findings on propolis is its efficacy in cancer prevention and treatment. Propolis inhibits cancer cell growth by increasing the process of apoptosis (by prooxidant effect inducing apoptosis in human melanoma cells [26] or by reactive oxygen species production [14, 28, 29]. In addition, propolis can prevent drug side-effects, and reduce drug resistance. Many studies have reported that propolis extract can significantly decrease the toxicity of chemotherapeutic agents used in cancer treatment such as doxorubicin, cyclophosphamid and vinblastin.

On the other hand, plants from the *Ferula* have been used in traditional medicine and their toxicity has been related to presence of the sesquiterpene prenylated coumarin derivative, ferulenol, which has been shown to induce a lethal hemorrhagic disease known as 'ferulosis' [2, 15, 34]. However, ferulenol has been shown to possess interesting dose-dependent cytotoxic activity against various human tumor cell lines [3, 7] and suggested that mitochondria may be involved in ferulenol cytotoxicity and apoptosis. We have recently demonstrated [23] that ferulenol was able to induce the mitochondrial permeability transition pore opening and that this effect was due to a fall of membrane potential, a steep in apoptosis process, and to an interaction with the mitochondrial respiratory chain at the level of the ubiquinone oxidoreductase.

In the present study, we hypothesized that mitochondrial permeability transition pore (MPTP) could be a relevant target by which propolis extract restored the membrane potential and to prevent apoptosis. We isolated and purified propolis extract and ferulenol from Algerian propolis and an Algerian species of *Ferula*, *Ferula vesceritensis*, and investigated the effects of this compound on the functions of mitochondria isolated from rat liver. We demonstrated that propolis extract was able to restore the mitochondrial membrane potential and to play a major role in the prevention of apoptosis process. This effect may be due to an interaction the active ingredients in Algerian propolis (galangin, pinostrobin, techochrysin and naringenin) with mitochondrial respiratory chain and with the mitochondrial permeability transition pore especially.

## MATERIALS AND METHODS

### *Extraction and isolation of ferulenol and propolis*

Roots of *Ferula vesceritensis* Boiss et Dur. were collected from M'Zab-ghardaya, Algeria in March 2003, and were identified by Prof. Dr. M. Kaabache from the Department of Biology, Faculty of Science, University of Ferhat Abbass, Setif, Algeria. A voucher specimen (RS/80) was preserved for reference in the Department of Chemistry of the University of Mentouri-Constantine (Algeria).

About 1.5 kg of the air-dried powdered roots was dissolved in a mixing dichloromethane-methanol at room temperature for 48 h and gave 30 g of viscous oil. This

extract was prefractionated over a silica gel column eluted with *n*-hexane containing increasing amounts of dichloromethane. The fraction (*n*-hexane-methylene chloride, 1 : 1) included several compounds which were further separated by repeated column chromatography over a silica gel column (*n*-hexane-methylene chloride-methanol, 7 : 4 : 1). Ferulenol (70 mg) was then purified by thin layer chromatography developed in *n*-hexane-diethylether (1 : 2) on a 0.2 mm aluminum sheets silica gel 60F<sub>254</sub>. The structure of ferulenol was confirmed by <sup>1</sup>H NMR spectrum (250 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and HRCI mass spectrum analysis. <sup>1</sup>H NMR spectrum showed four aromatic protons at δ 7.93 and 7.56 which could be assigned to protons from an ortho-disubstituted benzene. Three triplets signals at δ 5.14, 4.96 and 5.01, characteristic for olfenic protons, could be attributed to H-2', H-6', and H-10', respectively. Four sharp singlet at δ 1.45, 1.70, 1.58 and 1.49 could be assigned to four methyl groups of H-12', H-13', H-14' and H-15', respectively. One doublet signals at δ 3.22 could be assigned to H-1' and multiple signals at δ 1.85–2.15 could be related to four methylene groups of H-4', H-5', H-8' and H-9'. These proton signals were in agreement with those reported in the literature.

Crude propolis (beeswax and resins collected by the honeybee from plants, particularly from flowers and leaf buds) was obtained from beekeepers of "Cooperative Apical of Kaous, Jijel (Eastern of Algeria)" in May–April, 2006. Samples, once received, were stored at 4 °C in airtight/dark plastic containers until analysis. Propolis extract was achieved by using ethanol and methanol. The propolis, is cut into small pieces; dived in alcohol 95° for 15 days, filtered and then evaporated to 80 °C using a rotary evaporator (Evaporator E100). The residual was retaken using methanol 70° and was let for steeping for one night. After evaporation of the solvent, the produced extract is called: raw extract or ethanolic propolis extract (EEP). Flavonoids rate was determined by reactivity with AlCl<sub>3</sub> method as described by Bankova and Marcucci [4]. Then, concentrations of propolis extract are given as concentration quercetin equivalent (10<sup>-4</sup>M...). HPLC analyses of flavonoids and other phenolic acids in ethanolic extract of propolis (EEP) were carried out using reversed phase high performance liquid chromatography–diode array detection (RP-HPLC-DAD). The HPLC system was purchased from Varian; DAD was a Varian Prostar, monitoring from 200 to 700 nm wavelengths (Middelburg, The Netherlands). The phenolic compounds in EEP at a concentration of 10 mg/mL were separated on a Nucleodur analytical column, 250 mm × 4.6 mm i.d. (Machery-Nagel, Duren, Germany) packed with C<sub>18</sub> stationary phase, with a particle size of 5 mm. A linear binary gradient was used. The time of HPLC run was over 70 min. Binary mobile phase consisted of solvent A (trifluoroacetic acid 0.01%) and solvent B (acetonitrile). The separation was obtained by using a gradient starting at 10% of B till 10 min; 10–50 min B increased to 50% and kept constant till 15 min; 65–70 min B increased at 100% and kept constant till 10 min; successively, the solvent B reached back 10% to reequilibrated the column (washing).

Analysis of ethanolic extract of propolis (EEP) sample was performed by capillary GC-MS (GCMS-QP 2010, Shimadzu, Japan). The compounds were characterized by comparison with library searches. Flavonoids rate was determined by reactivity with

aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) method as described by Bankova and Marcucci [4]. Then, the concentration of total flavonoid in propolis extract was expressed as milligrams of quercetin equivalents (QE) per gram dry weight of propolis extract (DWPE), using the following linear equation:

$$\text{Flavonoid concentration (QE/g DWPE)} = \frac{\text{Absorbance}}{\varepsilon} \times M \times V \times \left( \frac{d}{w} \right)$$

$\varepsilon$ : Molar extinction coefficient of quercetin; M: Molar mass of quercetin; d: dilution factor; w: weight of propolis extract.

### *Isolation of rat liver mitochondria*

The research was conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the United States National Institute of Health.

Mitochondria were extracted from a homogenate of rat liver by differential centrifugation [31]. Briefly, rats (male Wistar, weighing 280–300 g) were killed by decapitation and the liver removed and placed quickly in an ice-bath. The liver was then homogenized (6 mL/g of tissue) in ice-cold isolation medium (Tris 20 mM, Sucrose 250 mM, EGTA 2 mM and MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7.2 at 4 °C) using a Potter-Elvehjem homogenizer. Mitochondria isolation was performed at 4 °C without delay using differential centrifugations. The homogenate was centrifuged at 2000 g for 10 min to remove cell debris and nuclei, then mitochondria were separated from the supernatant by centrifugation at 12,000 g for 5 min. The pellet (mitochondria) was washed and resuspended in a respiratory buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, Sucrose 200 mM, pH 7.2 at 25 °C) for measuring mitochondrial activities. Protein concentration was determined by the method of Lowry [27].

### *Measurement of mitochondrial respiration and swelling*

O<sub>2</sub> consumption was measured by a Clark type oxygen microelectrode (Eurosep Instruments) in a thermostat controlled chamber. Mitochondria (1 mg) were added to 1 mL of phosphate buffer (250 mM sucrose, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2 at 25 °C) including 2 μM rotenone. Mitochondrial respiration was initiated by addition of succinate (6 mM final concentration), and oxidative phosphorylation was initiated by addition of adenosine di-phosphate (ADP) to a final concentration of 0.2 mM. O<sub>2</sub> consumption recordings allowed the calculation of V<sub>2</sub>, the rate of state 2 (basal respiration), V<sub>3</sub>, the rate of state 3 (ADP-stimulated) respiration, V<sub>4</sub>, the rate of state 4 (non-ADP-stimulated) respiration and of the respiratory control ratio (RCR = V<sub>3</sub>/V<sub>4</sub>).

Mitochondrial swelling was assessed by measuring the decrease in absorbance at 520 nm by using a Jasco model V-530 spectrophotometer of a suspension of energized mitochondria according to Bernardi et al. [6].

### *Optical monitoring of mitochondrial membrane potential*

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) was evaluated by the uptake of rhodamine 123, which accumulates electrophoretically into energized mitochondria in response to their negative-inside membrane potential [12]. The fluorescence scanning of the rhodamine 123 was monitored using a Perkin-Elmer SA LS 50B fluorescence spectrometer. The excitation and emission wavelengths were 503 (slit width 3.0) and 527 nm (slit width 2.5), respectively. Experiments were carried out in 1.8 mL of the phosphate buffer including 2  $\mu\text{M}$  rotenone and 0.3  $\mu\text{M}$  rhodamine 123. After 30 sec of incubation, mitochondria (0.5 mg/mL) were added. This was followed by the addition of 6 mM succinate. The huge uptake of rhodamine 123 gave rise to self-quenching and to a reduced signal. Hence, when the mitochondrial membrane potential increased, the fluorescence intensity decreased. Relative changes of membrane potential were expressed in arbitrary fluorescence units and were not converted to potential values.

### *Statistical analysis*

Data are presented as the mean  $\pm$  SEM for the indicated number of separate experiments. Statistical analysis of data was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *t*-test and *P*-values less than 0.05 were considered significant.

## RESULTS

### *Natural chemical compounds*

HRCI mass spectrum showed a molecular ion peak at  $m/z$  367.227  $[\text{M} + \text{H}]^+$  in agreement with the molecular formula of ferulenol ( $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_3$ ) (Fig. 1) which was previously reported by Lahouel et al. [23].

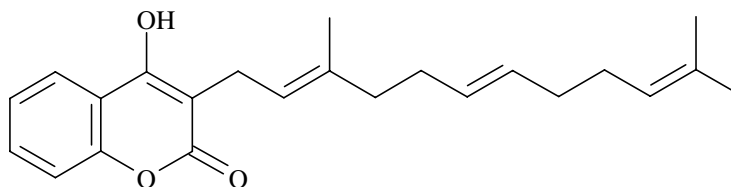


Fig. 1. Chemical structure of ferulenol

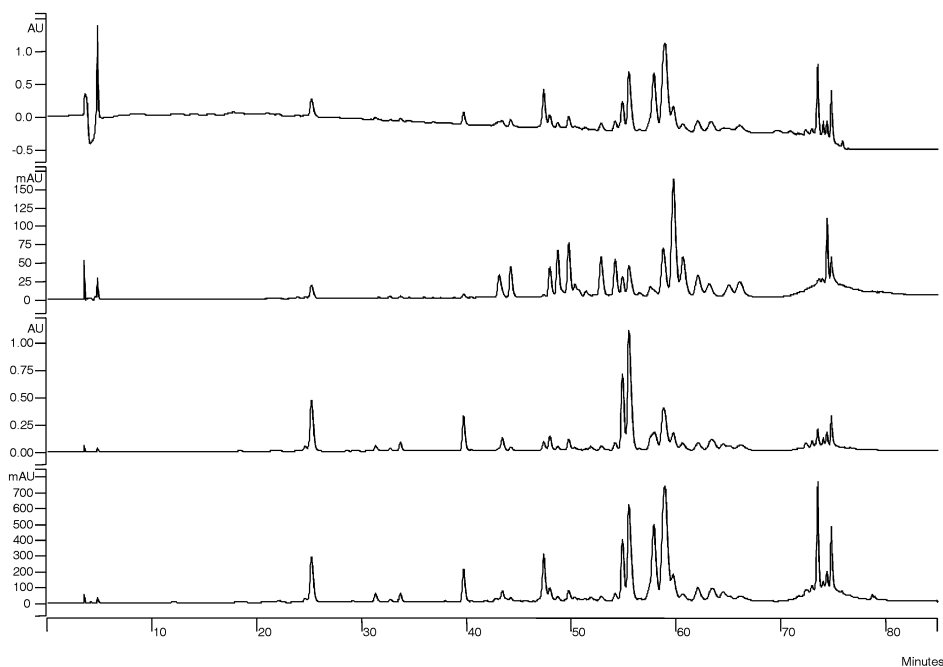


Fig. 2. High performance liquid chromatogram of ethanolic extract of propolis (EEP); flavonoids: 280, 370 nm; phenolic acids 325 nm

The total flavonoid concentration in the propolis extract determined by aluminum chloride colorimetric method is equal to 370 mg QE/g DWPE. HPLC chromatograms (Fig. 2) indicated the presence of 3 classes of polyphenols [8]: Flavonoids (maximal absorption at 280 and 370 nm); Chalcones: dihydrochalcone

Table 1

Chemical composition of Algerian propolis. Major compounds determined by using GC-MS

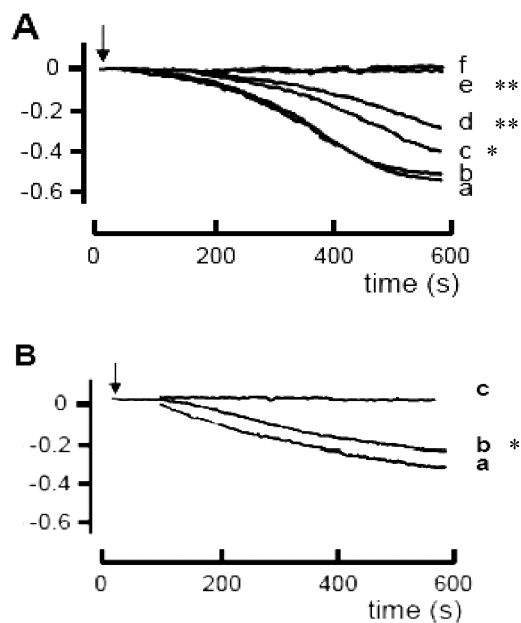
Peak Report TIC

Peak #	Name	R. time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Base m/z
1	Pinostrobin chalcone	18.873	202 402 490	39.47	2 696 610	38.91	7.50	270.10
2	Galangin flavanone	20.975	84 962 205	16.57	13 134 118	18.95	6.46	256.05
3	Tectochrysin	23.361	143 995 688	28.08	17 388 828	25.09	8.28	268.10
4	Naringenin	25.663	71 249 301	13.89	9 890 781	14.27	7.20	153.05
5	Suberosin	25.990	6 080 989	1.19	1 142 943	1.65	5.32	229.05
6	2'-Methoxychrysin	26.634	4 081 671	0.80	791 164	1.14	5.15	283.10
			512 772 344	100.0	69 317 444	100.0		

( $\lambda_{\max}$ =280–290 nm) and phenolic acids: hydroxycinnamic acids derivatives ( $\lambda_{\max}$ =225 nm). Five flavonoids were identified by GC/MS analysis [21]: pinostrobin chalcone (38.91%), galangin (18.95%), naringenin (14.27%), tectochrysin (25.09%), and methoxychrysin (1.14%) and a prenylated coumarin compound suberosin (1.65%) (Table 1).

### *Propolis extract modulates mitochondrial swelling induced by ferulenol*

We studied the effect of propolis extract in the presence of ferulenol on mitochondrial swelling which is the consequence of an increase in membrane permeability. In Fig. 3A, isolated liver mitochondria were energized with 6 mM succinate and mitochondrial swelling was induced by the addition of 25  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$  as attested by the decrease in absorbance of the mitochondrial suspension. On the contrary, ferulenol



**Fig. 3.** Effect of propolis extract on ferulenol inducing mitochondrial swelling – A: Ferulenol inhibited  $\text{Ca}^{2+}$ -induced mitochondrial swelling under energized conditions. Liver mitochondria (1 mg/mL) were preincubated for 2 min in a medium containing 250 mM sucrose, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , including 2  $\mu$ M rotenone and 6 mM succinate, pH 7.4 at 25  $^\circ\text{C}$ , in the absence (a) or in the presence of either increasing concentrations of ferulenol [0.1  $\mu$ M (b), 1  $\mu$ M (c), 10 (d), 100 (e)] or 1  $\mu$ M CsA (f). Then, swelling was induced by the addition of 25  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$  (arrow). – B: Propolis extract inhibited ferulenol-induced mitochondrial swelling. After 1 min incubation in presence of 25  $\mu$ M  $\text{Ca}^{2+}$  (arrow) and two minutes later, swelling was induced by 10  $\mu$ M ferulenol in the presence of 10  $\mu$ M (a), 100  $\mu$ M (b) propolis extract or 1  $\mu$ M cyclosporin, CsA (line c). \* $p$ <0.05 ; \*\* $p$ <0.01 versus the value observed in the absence of ferulenol

was able to promote swelling when it was added instead of the well-known uncoupling agent carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP, not shown). This effect was concentration-dependent ( $*p < 0.01$ ) and was inhibited by propolis extract at 100  $\mu\text{M}$  ( $*p < 0.05$ ) confirming the involvement of PTP in the swelling process (Fig. 4B). The swelling a consequence of PTP opening since it was completely prevented by 1  $\mu\text{M}$  cyclosporine A (CsA), a well-known inhibitor of this channel. Pretreatment with propolis extract decreased the rate of mitochondrial swelling

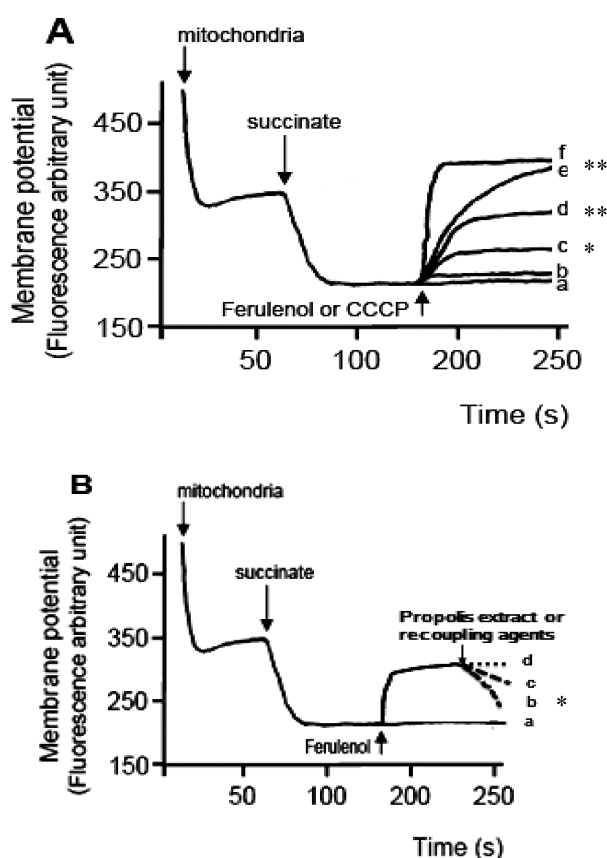


Fig. 4. Effect of ferulenol on mitochondrial membrane potential – A: Ferulenol decreased membrane potential. Isolated liver mitochondria (0.5 mg/mL) were incubated in a medium containing 250 mM sucrose, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2  $\mu\text{M}$  rotenone and 0.3  $\mu\text{M}$  rhodamine 123. Membrane potential was established after the addition of 6 mM succinate, followed by the addition of either increasing concentrations of ferulenol [0.1  $\mu\text{M}$  (b); 1  $\mu\text{M}$  (c); 10  $\mu\text{M}$  (d); 100  $\mu\text{M}$  (e) or CCCP [1  $\mu\text{M}$ ; (f)]. Curve (a): control curve without addition. – B: Propolis extract restored the membrane potential. Addition of propolis extract restored the membrane potential disruption [100  $\mu\text{M}$  (b); 10  $\mu\text{M}$  (c)]. Curve (a): control curve without addition and curve (d) addition of 100  $\mu\text{M}$  of recoupling agents; 6-ketocholestanol, progesterone, testosterone, atracylate or carboxyatracylate b.  $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$  versus the value observed in the absence of ferulenol



(Fig. 3B). Indeed, propolis extract inhibited ferulenol-induced mitochondrial swelling. After 1 min incubation in presence of the 25  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  (arrow) and two minutes later, swelling was induced by 10  $\mu\text{M}$  ferulenol in the presence of 10  $\mu\text{M}$  (line a), 100  $\mu\text{M}$  (line b) of propolis extract or 1  $\mu\text{M}$  cyclosporin, CsA (line c).

According to the effect of these extracts on the mitochondrial swelling *in vitro*, this effect was concentration-dependent. We concluded that the blockage of calcium entrance was due to an inhibition of calcium channels.

### *Propolis extract restored the disruption of mitochondrial $\Delta\Psi$ induced by ferulenol*

Figure 4A demonstrates that ferulenol induced a concentration-dependent decrease in the membrane potential monitored by means of rhodamine 123. Identical results were observed with CCCP. This effect was prevented by propolis extract indicating that mitochondrial membrane depolarization was in part dependent on PTP opening. Indeed, Fig. 4B demonstrates that the ferulenol uncoupling effect was reversed by propolis extract at concentrations of 10 and 100  $\mu\text{M}$  (\* $p < 0.05$ ) but was not reversed by increasing concentrations of recoupling agents such as 6-ketocholestanol, progesterone, testosterone, atractylate or carboxyatractylate b (Fig. 4B).

### *Interaction of propolis extract and ferulenol with the mitochondrial respiratory chain*

It is well demonstrated that the action of protonophores is associated with an increase in the mitochondrial respiratory rate due to futile proton cycling across the inner

*Table 2*  
Effect of increasing concentrations of ferulenol on mitochondrial respiration for ferulenol concentrations higher than 1  $\mu\text{M}$  (ADP-stimulated oxygen consumption cannot be detected and thus  $V_2 = V_3 = V_4$  and the respiratory control ratio (RCR) is equal to 1)

Ferulenol (M)	V2	V3	V4	RCR
	(nmol $\text{O}_2$ /mg protein/min)			
0	40.0 $\pm$ 2.2	122 $\pm$ 5.0	39.9 $\pm$ 1.4	3.1 $\pm$ 0.1
10 <sup>-7</sup>	40.1 $\pm$ 1.3	112 $\pm$ 2.6	42.0 $\pm$ 1.3	2.7 $\pm$ 0.1*
10 <sup>-6</sup>	37.9 $\pm$ 0.3	41.6 $\pm$ 0.6*	39.4 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.1*
10 <sup>-5</sup>	13.7 $\pm$ 0.1*	–	–	–
10 <sup>-4</sup>	9.1 $\pm$ 0.4*	–	–	–

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in duplicate.  
P < 0.05 versus the value observed in the absence of ferulenol (= 0).

membrane. Table 2 shows that the addition of increasing concentrations of ferulenol to a mitochondrial suspension energized with succinate in the presence of rotenone (complexes II to IV with ATP synthase activated) did not increase but rather decreased mitochondrial respiration as attested by the drop in RCR values (\* $p < 0.05$ ). This disruption in mitochondrial respiration was prevented by propolis extract at mean concentrations (10 and 100  $\mu\text{M}$ ) (\* $p < 0.05$ ) supporting the hypothesis that the PTP opening channel is related to the mitochondrial respiration and to the redox state of mitochondrial thiol groups and pyridines nucleotides and thus is directly modulated by the membrane potential (Table 3).

*Table 3*  
Effect of increasing concentrations of propolis extract on mitochondrial respiration in the presence of ferulenol at a concentration of 1  $\mu\text{M}$  (when ADP-stimulated oxygen consumption cannot be detected and thus  $V_2 = V_3 = V_4$  and the respiratory control ratio (RCR) is equal to 1)

Propolis extract (M)	V2	V3	V4	RCR
	(nmol O <sub>2</sub> /mg protein/min)			
0	13.7 $\pm$ 0.1*	–	–	–
10 <sup>-6</sup>	38.1 $\pm$ 2.2	124 $\pm$ 2.1	38.1 $\pm$ 0.9	3.2 $\pm$ 0.1*
10 <sup>-5</sup>	39.7 $\pm$ 0.3	117.0 $\pm$ 1.2*	40.1 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.2*
10 <sup>-4</sup>	21.4 $\pm$ 0.7*	–	–	–
10 <sup>-3</sup>	12.4 $\pm$ 0.5*	–	–	–

Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of three experiments performed in duplicate.  $P < 0.05$  versus the value observed in the absence of propolis extract (= 0).

## DISCUSSION

As previously reported by numerous studies, propolis has many anti-oxidant and antiapoptotic properties. Phenolic compounds (flavonoids and phenolic acid derivatives) are the most important pharmacologically active constituents in propolis. However, the constituents of propolis vary widely due to climate, season, location, and thus its chemical formula is not stable [9]. As a result of that, the chemical composition of propolis from East Algeria (Jijel) was studied in order to determine the major compounds by using GC-MS. Chemical analysis indicated that the propolis sample had high concentrations of flavonoids (37 mg of flavonoids per gram of propolis) which are responsible for the anti-oxidant properties of propolis such as pinostrombin, galangin, naringenin and tectochrysin besides the common compounds as terpenoids and aromatic acids.

Some experimental studies on animals or human cell lines have demonstrated the antioxidant properties of flavonoids and their pivotal role in the prevention of diseases [33]. These molecules have the capacity to capture and to deactivate the free radicals [18, 35]. They act by inhibition of the interaction between free radicals and

DNA, and by the protection of cellular membranes [19]. Mitochondrial target was evoked to explain the protecting effects [19, 28]. Recently, we have reported that flavonoids of propolis extract protect liver and heart tissues in rats treated with anti-cancer drugs [1, 5] and we hypothesized that the protective effect of flavonoids could be due to a direct action on mitochondrial functions. It is true that mitochondria control stress generated by high quantity of reactive oxygen species (ROS) which play an important role in the evolution of the cell injuries [13, 32]. A close relationship between the mitochondrial membrane potential and ROS production has been demonstrated [11, 16, 21]. However, a mitochondrial-protective antioxidant strategy can prevent the oxidant cascade either by prevention of ROS production or neutralisation of free radicals through a scavenging effect [11, 17]. Our data indicate that interaction of propolis flavonoids with mitochondria and the consequent PTP opening protection is probably the mechanism by which cells are kept from oxidative damage. Moreover, the decrease of membrane potential is due to the interaction of ferulenol with PTP and with other mitochondrial receptors. An interaction of the propolis extract with PTP during its protecting effect is possible in regard with the action to restore the fall of mitochondrial membrane potential.

PTP opening is highly related to the redox state of mitochondrial thiol groups and pyridine nucleotides and is directly modulated by the membrane potential, depending on the experimental conditions used. Consequently, this membrane potential-dependent PTP is directly modulated by the membrane potential change [3, 10, 25]. The swelling induced by ferulenol and that was due to PTP opening was prevented by 10 and 100  $\mu\text{M}$  propolis extract. Indeed, in our experiments, we exploited the protocol described by Bernardi et al. [6] who induced PTP by means of the addition of an uncoupler to mitochondria that have accumulated  $\text{Ca}^{2+}$  load not able to induce PTP *per se*. This effect traduces the fact that the pore can be opened by depolarization of mitochondrial membrane. In these experimental conditions propolis extract was able not only to inhibit mitochondrial swelling at mean concentrations but also to promote swelling when it was added at pro-oxidant concentrations (1 and 0.1  $\mu\text{M}$ ) [10, 22, 25] confirming the interaction of propolis extract with PTP.

Mitochondria play an important role in the induction of apoptotic process. During this type of cell death, a number of successive events take place. Starting with a disturbance of mitochondrial respiration, a change of mitochondrial membrane potential where the permeability transition pore (PTP) is implied. Furthermore an incepting of the respiration, an inhibition of the ATP synthesis, a development of a membrane asymmetry followed by a release of proapoptotic factors such as cytochrome C and reactive oxygen species. The high intramitochondrial concentration of calcium prevents the electron transport of the respiratory chain and then oxidative phosphorylation, or activates the principal enzymes responsible for ROS generation [19]. Alternatively, pro-oxidants induce the oxidation of thiol groups of the pore leading to their opening. Finally, it is also proposed that the oxidative stress stimulates the release of mitochondrial calcium which can be still taken up by mitochondria and which excessive calcium uptake can be responsible for the mitochondrial membrane permeability transition (MMPT). Therefore, the oxidation of the thiol groups has as

principal consequence the opening of PTP. It is thought that the mechanism of action of propolis flavonoids on mitochondrial swelling is similar to that proposed by Jian and Riyi [20] for the salvianic acid; this molecule extracted from *Salvia miltorrhiza* Bunge, was shown to prevent swelling via reducing the oxidation of adenine nucleotide translocase (ANT) thiol groups of permeability transition pore. We can also propose that propolis extract tested competes with calcium ions, preventing thereafter their fixing on their site at the level of the transition pore and consequently by inhibition of swelling and apoptosis.

In conclusion, our data demonstrate that propolis extract, rich in flavonoid components is able to restore the disruption of membrane potential induced by an uncoupler compound natural "ferulenol", by interacting with the mitochondrial respiratory chain, which inhibits the oxidation of the permeability transition pore thiols and prevents its opening. In conclusion, the propolis extract could be a promising potential therapeutic agent in providing protection against several chemo-pharmacologically active agents toxicity used in cancer treatment.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge apicultural association (Jijel, Algeria) Mrs Fafa Abdelouahab and Nouasra Djamel for kindly providing the propolis for this study.

#### REFERENCES

1. Alyane, M., Benguedouar, L., Kebsa, W., Bousenane, H. N., Rouibah, H., Lahouel, M. (2008) Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak. J. Pharm. Sci.* 21, 201–209.
2. Appendino, G., Spagliardi, P., Cravotto, G., Pocock, V., Milligan, S. (2002) Daucane phytoestrogens: a structure-activity study. *J. Nat. Prod.* 65, 1612–1615.
3. Appendino, G., Mercall, E., Fuzzati, N., Arnoldi, L., Stavri, M., Gibbons, S., Ballero, M., Maxia, A. (2004) Antimycobacterial coumarins from the sardinian giant fennel (*Ferula communis*). *J. Nat. Prod.* 67, 2108–2110.
4. Bankova, V., Marcucci, M. C. (2000) Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World* 81, 182–188.
5. Benguedouar, L., Bousenane, H. N., Kebsa, W., Alyane, M., Rouibah, H., Lahouel, M. (2008) Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *IJEB* 21, 112–119.
6. Bernardi, P., Veronese, P., Petronilli, V. (1993) Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate  $Me^{2+}$  binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J. Biol. Chem.* 268, 1005–1010.
7. Bocca, C., Gabriel, L., Bozzo, F., Miglietta, A. (2002) Microtubule-interacting activity and cytotoxicity of the prenylated coumarin ferulenol. *Planta. Med.* 68, 1135–1137.
8. Boutabet, K. (2007) Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine, Magister de pharmacochimie, université de Jijel
9. Cheng, P. C., Wong, G. (1996) Honey bee propolis: prospects in medicine. *Bee. World* 77, 8–15.
10. Crompton, M. (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 233–249.

11. de Groot, H., Rauen, U. (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12, 249–255.
12. Emaus, R. K., Grunwald, R., Lemasters, J. J. (1986) Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochem. Biophys. Acta* 850, 436–448.
13. Ferrari, R. (1996) The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 28, S1–S10.
14. Finkel, T., Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.
15. Fraigui, O., Lamnaouer, D., Faouzi, M. Y. (2002) Acute toxicity of ferulenol, a 4-hydroxycoumarin isolated from *Ferula communis* L. *Vet. Hum. Toxicol.* 44, 5–7.
16. Galati, G., O'Brien, P. J. (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anti-cancer properties. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 287–303.
17. Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S. (1994) The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical. Biol. Med.* 16, 845–850.
18. Han, X., Pan, J., Ren, D., Cheng, Y., Fan, P., Lou, H. (2008) Naringenin-7-O-glucoside protects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes by induction of endogenous antioxidant enzymes. *Food Chem. Toxicol.* 3140–3146.
19. Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., Syrova, D., Busanyova, K., Drobna, Z., Ferencik, M. (2001) Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 650–664.
20. Jian, L., Riyi, S. (2005) Acrolein induces oxidative stress in brain mitochondria. *Neurochem. Intern.* 46, 243–252.
21. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., Starkov, A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15–18.
22. Lahouel, M., Amedah, S., Zellagui, A., Touil, A., Rhouati, S., Benyache, F., Leghouchi, E., Bousseboua, H. (2006) The interaction of new plant flavonoids with rat liver mitochondria: relation between the anti- and pro-oxidant effect and flavonoids concentration. *Thérapie* 61, 347–352.
23. Lahouel, M., Zini, R., Zellagui, A., Rhouati, S., Carrupt, P. A., Morin, D. (2007) Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 252–259.
24. Lemasters, J. J., Nieminen, A. L., Qian, T., Trost, L. C., Elmore, S. P., Nishimura, Y. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochem. Biophys. Acta* 1366, 177–196.
25. Ligeret, H., Barthelemy, S., Zini, R., Tillement, J. P., Labidalle, S., Morin, D. (2004) Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 919–929.
26. Liu, C. F., Lin, C. H., Lin, C. C., Lin, Y. H., Chen, C. F., Lin, C. K., Lin, S. C. (2004) Antioxidant natural products protect against Econazole-induced liver injuries. *Toxicology* 196, 87–93.
27. Lowry, O., Rosebrough, J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
28. Marc, W. F., Catherine, B. C., Manisha, P., Bennett, V. H., Sten, O. (2005) Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol. Interv.* 5, 94–111.
29. Morin, D., Barthelemy, S., Zini, R., Labidalle, S. (2001) Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. *FEBS Letters* 495, 131–136.
30. Park, Y. K., Ikegaki, M., Matias of Alencar, S. (2000) Classificação das propolis Brasileiro suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem. Doce* 58, 158–163.
31. Rustin, P., Chrétien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., Munnich, A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* 228, 35–51.
32. Sastre, J., Pallardo, F. V., Garcia de la Asuncion, J., Vina, J. (2000) Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free radic. Res.* 32, 189–198.

33. Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 45, 287–306.
34. Singh, M. M., Agnihotri, A., Garg, S. N., Agarwa, S. K., Gupta, D. N., Keshri, G., Kamboj, V. P. (1988) Antifertility and hormonal properties of certain carotane sesquiterpenes of *Ferula jaeschkeana*. *Planta. Med.* 54, 492–494.
35. Tolomeo, M., Grimaudo, S., Di Cristina, A., Pipitone, R. M., Dusonchet, L., Meli, M., Crosta, L., Gebbia, N., Invidiata, F. P., Titone, L., Simoni, D. (2008) Galangin increases the cytotoxic activity of imatinib mesylate in imatinib-sensitive and imatinib-resistant Bcr-Abl expressing leukemia cells. *Cancer Lett.* 265, 289–297.
36. Velikova, M., Bankova, V., Sorkun, K., Houcine, S., Tsetkova, I., Kujemgiev, A. (2000) Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z. Naturforsch.* 55, 790–803.