

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Jijel

Faculté des sciences  
Département de chimie

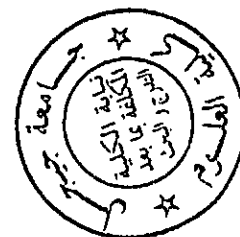
### Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en chimie

Option chimie pharmaceutique

par

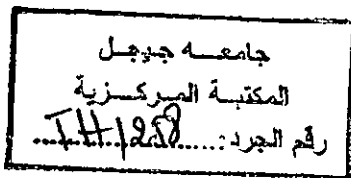
BENCHOULAK Mounir



## Etude de l'effet des flavonoïdes de la *Foeniculum vulgare* Mill. dans la prévention de la cardiotoxicité de la doxorubicine

Devant le jury :

M. L. DEHIMAT	M. C. Université Mentouri Constantine	Président
M <sup>me</sup> N. ABIDLI	M. C. Université Mentouri Constantine	Rapporteur
M. M. LAHOUEL	M. C. Université de Jijel	Co-rapporteur
M. M. BELGHOBSI	M. C. Université de Jijel	Examineur
M. A. ZELLAGUI	M.C. C. U. d'Oum El Bouagui	Examineur



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de Jijel

Faculté des sciences

Département de chimie

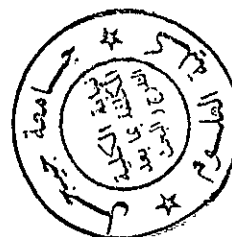
## Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en chimie

Option chimie pharmaceutique

par

BENCHOULAK Mounir



# Etude de l'effet des flavonoïdes de la *Foeniculum vulgare* Mill. dans la prévention de la cardiotoxicité de la doxorubicine



Devant le jury :

M. L. DEHIMAT	M. C. Université Mentouri Constantine	Président
M <sup>me</sup> N. ABIDLI	M. C. Université Mentouri Constantine	Rapporteur
M. M. LAHOUEL	M. C. Université de Jijel	Co-rapporteur
M. M. BELGHOBSI	M. C. Université de Jijel	Examineur
M. A. ZELLAGUI	M.C. C. U. d'Oum El Bouagui	Examineur

Soutenu publiquement le 26 juin 2008

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très vivement mon directeur de travail, madame ABIDLI Nacera, maître de conférence de l'université de Constantine, ainsi que mon co-directeur de travail, monsieur LAHOUEL Mesbah, maître de conférence de l'université de Jijel, pour leur disponibilité, leurs aides, leurs conseils et pour leur grand soutien durant toute la période de la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à monsieur ZELLAGUI Amar, maître de conférence du C. U. d'Oum El Bouagui pour sa précieuse collaboration.

Je remercie également les messieurs : DEHIMAT laïd, maître de conférence et doyen de la faculté des sciences de l'université de Constantine ; BELGHOUBSI Mabrouk, maître de conférence de l'université de Jijel et ZELLAGUI Amar, maître de conférence du C. U. d'Oum El Bouagui, qui m'ont fait le grand honneur d'examiner et de juger ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements à tous mes enseignants qu'ils m'ont suivi durant mon cycle de formation en particulier, à monsieur KHELLILI Ismaïl, professeur et chef du conseil scientifique de l'université de Jijel, et à monsieur LEGHOUCHI Essaïd, professeur et doyen de la faculté des sciences de l'université de Jijel, de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Un très grand merci à monsieur ALYANE Mohamed, enseignant de biochimie à l'université de Jijel et aussi à mademoiselle BENGUEDOUAR Lamia, enseignante de biochimie à l'université de Jijel, pour leurs précieuses aides, leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie également tous mes amis et mes collègues de la post-graduation de l'année 2004 de l'université de Jijel et surtout ceux de l'écotoxicologie de l'année 2005, pour leur ambiance exceptionnelle et leur très bonne humeur, et Je suis très reconnaissant envers la mademoiselle BELLI Nassima, pour la précieuse aide qu'elle m'a donnée.

Je remercie toute les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à la réussite de ce travail en particulier, Yahia, responsable du laboratoire de recherche de phytochimie et de pharmacologie de l'université de Jijel et M<sup>lle</sup> Wahiba Kara-Ali de la post-graduation de biologie cellulaire et moléculaire de l'année 2006 de l'université de Constantine.

J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude à tous les membres de ma famille, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances au cours de ces longues années de formation.

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Synthèse bibliographique</b> .....	3
<b>I. le stress oxydatif</b> .....	3
<b>I.1. Les espèces réactives de l'oxygène</b> .....	3
I.1.1. Définition .....	3
I.1.2. Sources et formation .....	4
<b>I.2. Le stress oxydatif</b> .....	8
I.2.1. Définition .....	8
I.2.2. Le stress oxydatif induit par les médicaments anticancéreux .....	8
I.2.3. Les dégâts oxydatifs .....	8
- Effets sur les lipides .....	9
- Effets sur les protéines .....	11
- Effets sur les acides nucléiques .....	12
I.2.4. Le rôle bénéfique des ROS .....	15
<b>I.3. systèmes de défenses contre le stress oxydatif</b> .....	16
I.3.1. Les antioxydants primaires .....	16
I.3.2. Les antioxydants secondaires .....	19
<b>II. La doxorubicine</b> .....	25
<b>II.1. Généralités</b> .....	25
<b>II.2. Définition et propriétés chimiques</b> .....	25
<b>II.3. Pharmacologie</b> .....	26
<b>II.4. Métabolisme</b> .....	27
<b>II.5. Mécanisme d'action</b> .....	28
<b>II.6. La cardiotoxicité de la doxorubicine</b> .....	29
<b>III. Les biomarqueurs cardiaques</b> .....	33
<b>III.1. Généralités</b> .....	33
<b>III.2. Biomarqueurs cardiaques de l'atteinte aiguë</b> .....	33
III.2.1. LDH .....	33
III.2.2. CPK .....	34
III.2.3. AST (TGO).....	35

<b>IV. Les flavonoïdes</b> .....	36
<b>IV.1. Généralités</b> .....	36
<b>IV.2. Définition</b> .....	37
<b>IV.3. Localisation</b> .....	38
<b>IV.4. Structure chimique et classification</b> .....	38
IV.4.1. Les anthocyanes .....	40
IV.4.2. Flavones, flavonols .....	40
IV.4.3. Flavanones et dihydroflavonols .....	41
IV.4.4. Chalcones, auronnes .....	41
<b>IV.5. Distribution</b> .....	43
<b>IV.6. Biosynthèse des flavonoïdes</b> .....	43
<b>IV.7. Propriétés physicochimiques, extraction, caractérisation</b> .....	45
<b>IV.8. Propriétés biologiques des flavonoïdes</b> .....	46
<b>IV.9. Les flavonoïdes : inhibiteurs enzymatiques</b> .....	47
<b>IV.10. Les flavonoïdes et les radicaux libres</b> .....	47
<b>IV.11. Mécanisme de l'action antioxydante des flavonoïdes</b> .....	48
<b>V. La <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.</b> .....	51
<b>V.1. Généralités</b> .....	51
<b>V.2. Description générale</b> .....	52
<b>V.3. Composition chimique</b> .....	54
<b>V.4. Propriétés thérapeutiques</b> .....	55
<b>Matériel et méthodes</b> .....	57
<b>I. Matériel végétal et méthodes chimiques</b> .....	57
<b>I.1. Méthodes végétales</b> .....	57
I.1.1. Récolte et conservation de la plante .....	57
I.1.2. Préparation de l'extrait des flavonoïdes totaux .....	57

<b>I.2. Méthodes chimiques</b> .....	59
I.2.1. Tests chimiques d'identification des constituants végétaux .....	59
I.2.1.1. Tests pour les flavonoïdes .....	59
I.2.1.2. Test pour les tanins hydrolysables .....	59
I.2.1.3. Test pour les tanins condensés .....	59
I.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux .....	59
I.2.3. Dosage des phénols totaux .....	61
I.2.4. Etude chromatographique de l'extrait préparé des flavonoïdes totaux .....	62
I.2.4.1. La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique .....	62
I.2.4.2. La chromatographie liquide de haute performance (HPLC-DAD) analytique .....	63
<b>II. Les animaux</b> .....	64
<b>II.1. Entretien des animaux</b> .....	64
<b>II.2. Traitement des animaux</b> .....	64
<b>II.3. Sacrifice et prélèvement du sang et du cœur</b> .....	64
<b>II.4. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait préparé</b> .....	65
II.4.1. Mesure de l'effet <i>scavenger</i> du radical libre DPPH° <i>in vitro</i> .....	65
II.4.2. L'évaluation biochimique <i>in vivo</i> .....	66
II.4.2.1. Activité de la CPK .....	66
II.4.2.2. Activité de la l'AST (TGO) .....	67
II.4.2.3. Activité de LDH .....	67
II.4.3. Evaluation de l'activité antilipoperoxydative .....	68
- Dosage du MDA cytosolique cardiaque <i>in vivo</i> .....	68
II.4.4. Dosage du glutathion (GSH) cytosolique cardiaque <i>in vivo</i> .....	69
<b>III. Traitement statistiques</b> .....	70
<b>Résultats et interprétations</b> .....	72
<b>I. Etude phytochimique</b> .....	72
<b>I.1. Tests chimiques d'identification des constituants</b> .....	72
<b>I.2. Dosage des flavonoïdes totaux</b> .....	72
<b>I.3. Dosage des phénols totaux</b> .....	73
<b>I.4. Etude chromatographique de l'extrait préparé</b> .....	74
I.4.1. La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique .....	74

I.4.2. La chromatographie liquide de haute performance (HPLC-DAD) analytique .....	76
<b>II. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait .....</b>	<b>79</b>
<b>II.1. Mesure de l'effet <i>scavenger</i> du radical libre DPPH° <i>in vitro</i> .....</b>	<b>79</b>
<b>II.2. L'évaluation biochimique <i>in vivo</i> (activité de la LDH, la CPK et l'AST) ..</b>	<b>81</b>
<b>II.3. Evaluation de l'activité antilipoperoxydative .....</b>	<b>83</b>
- Dosage du MDA cytosolique cardiaque <i>in vivo</i> .....	83
<b>II.4. Dosage du glutathion cytosolique cardiaque <i>in vivo</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>89</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>100</b>
<b>Annexe .....</b>	<b>103</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>109</b>

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>ADPc</b>	adénosine diphosphate cyclique
<b>AGE</b>	acide gallique équivalent
<b>AMP</b>	adénosine monophosphate
<b>AST</b>	aspartate aminotransférase
<b>CCM</b>	chromatographie sue couche mince
<b>CPK</b>	créatine phosphokinase
<b>DOXO</b>	doxorubicine
<b>DPPH°</b>	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
<b>DTNB</b>	acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
<b>EDTA</b>	acide éthanediaminotetraacétique
<b>EXT</b>	extrait
<b>GPx</b>	glutathion peroxydase
<b>GSH</b>	glutathion réduit
<b>GSSG</b>	glutathion oxydé
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxyde d'hydrogène
<b>HPLC-DAD</b>	high performance liquid chromatography-diode array detector
<b>LDH</b>	lactate déshydrogénase
<b>MDA</b>	malondialdéhyde
<b>NADH</b>	nicotinamide-Adénine-Dinucleotide
<b>NADPH</b>	nicotinamide-Adénine-Dinucleotide-Phosphate
<b>°NO</b>	radical oxide nitrique
<b>O<sub>2</sub>°</b>	radical anion superoxyde
<b>OH°</b>	radical hydroxyle
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	peroxynitrite
<b>QE</b>	quercetine équivalent
<b>ROS</b>	reactive oxygen species
<b>rpm</b>	tour par minute
<b>SOD</b>	superoxide dismutase
<b>TCA</b>	acide trichloroacétique
<b>UV</b>	ultra violet



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Formation en cascade des différentes espèces réactive de l'oxygène à partir du radical superoxyde $O_2^{\circ}$ . .....	5
<b>Figure 2.</b> Origine et cibles de principales espèces réactives de l'oxygène. ....	9
<b>Figure 3.</b> Processus de la peroxydation lipidique en cascade. ....	10
<b>Figure 4.</b> Lésions de l'ADN formées par attaque des radicaux libres. ....	13
<b>Figure 5.</b> Réaction de la guanine (G) avec le radical hydroxyle ( $OH^{\circ}$ ). ....	14
<b>Figure 6.</b> Structure chimique de la vitamine E. ....	20
<b>Figure 7.</b> Régénération de la vitamine E. ....	21
<b>Figure 8.</b> Structure chimique du $\beta$ -carotène (famille des caroténoïdes). ....	21
<b>Figure 9.</b> Structure chimique de la vitamine C. ....	22
<b>Figure 10.</b> Structure chimique du glutathion réduit (GSH). ....	23
<b>Figure 11.</b> Structure chimique de la doxorubicine. ....	26
<b>Figure 12.</b> Structures chimiques d'anthracyclines antibiotiques. ....	26
<b>Figure 13.</b> Métabolisme de la doxorubicine. ....	28
<b>Figure 14.</b> Squelette de base des flavonoïdes. ....	37
<b>Figure 15.</b> Noyau flavone (a) et noyau flavane (b). ....	38
<b>Figure 16.</b> Structures chimiques de deux flavonoïdes aglycones, la quercetine et la morine. ....	39
<b>Figure 17.</b> La structure chimique de l'anthocyanidine. ....	40
<b>Figure 18.</b> Voie de biosynthèse des flavonoïdes. ....	44
<b>Figure 19.</b> Les sites structuraux des flavonoïdes ayant une haute activité antiradicalaire. ....	48
<b>Figure 20.</b> Piégeage des ROS ( $R^{\circ}$ ) par les flavonoïdes. ....	49
<b>Figure 21.</b> Sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $Me^{n+}$ ) par les flavonoïdes. ....	50

<b>Figure 22.</b> La partie aérienne du fenouil amer ( <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.).....	53
<b>Figure 23.</b> Procédure expérimentale d'extraction des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. ....	58
<b>Figure 24.</b> Complexes formés entre les flavonoïdes et l'aluminium (Al <sup>3+</sup> ). ....	60
<b>Figure 25.</b> Les deux formes radicalaire et réduite du DPPH. ....	66
<b>Figure 26.</b> Structure chimique du malondialdéhyde (MDA). ....	68
<b>Figure 27.</b> Structure chimique du DTNB. ....	69
<b>Figure 28.</b> Le chromatogramme CCM de l'extrait, développé dans une phase mobile de butanol-eau-acide acétique (40 : 10 : 50, v/v/v) et une phase stationnaire de gel de silice...	75
<b>Figure 29.</b> Chromatogrammes du profile HPLC-DAD analytique de l'extrait. ....	77
<b>Figure 30.</b> Spectres UV du profile HPLC-DAD analytique de l'extrait. ....	78
<b>Figure 31.</b> Variations de l'effet scavenger du radical libre DPPH° de l'extrait des flavonoïdes totaux et de la quercetine à différentes concentrations massiques. ....	80
<b>Figure 32.</b> Variations des taux du MDA cytosolique cardiaque après 14 jours de la fin du traitement des animaux. ....	84
<b>Figure 33.</b> Variations des taux du GSH cytosolique cardiaque après 14 jours de la fin du traitement des animaux. ....	86

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les principales espèces réactives de l'oxygène. ....	4
<b>Tableau 2.</b> Paramètres pharmacocinétiques de la doxorubicine. ....	27
<b>Tableau 3.</b> Nomenclature des sous- classes des flavonoïdes, basée sur la position de leurs substituants. ....	42
<b>Tableau 4.</b> Les couleurs caractéristiques des flavonoïdes dans le visible et l'UV à 365 nm. ....	46
<b>Tableau 5.</b> Classification de la <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. ....	54
<b>Tableau 6.</b> Les principales couleurs observées sur le chromatogramme CCM de l'extrait dans le visible et l'UV à 365 nm, avec une phase mobile de n-butanol-eau-acide acétique (40 : 10 : 50, v/v/v) et une phase stationnaire de gel de silice.....	75
<b>Tableau 7.</b> Variations des deux effets <i>scavenger</i> , de l'extrait et de la quercétine, du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations massiques utilisées. ....	79
<b>Tableau 8.</b> Les Activités enzymatiques plasmatiques de la LDH, CPK et la AST mesurées dans le premier prélèvement du sang effectué après un (01) jour de la fin du gavage gastrique de l'extrait à une dose quotidienne de 100 mg/kg pendant 7 jours. ....	81
<b>Tableau 9.</b> Les activités enzymatiques plasmatiques de la LDH, la CPK et l'AST des deux groupes "DOXO" et "EXTRAIT-DOXO" mesurées dans le 2 <sup>ème</sup> prélèvement du sang, après un (01) jour de la fin du traitement des animaux. ....	82
<b>Tableau 10.</b> Variations des taux du MDA cytosolique cardiaque après 7 jours de la fin du traitement des animaux. ....	84
<b>Tableau 11.</b> Variations des taux du GSH cytosolique cardiaque après 14 jours de la fin du traitement des animaux. ....	86

# Introduction

## Introduction

L'oxygène, un élément indispensable à la vie, est nécessaire à tous les organismes aérobiques (animaux, plantes, bactéries) pour produire de l'énergie mais, il est également à l'origine de toxicité, d'altération et de dégénérescence.

Le métabolisme cellulaire normal de l'oxygène produit de manière continue de faibles quantités de dérivés réactifs de l'oxygène, en particulier le radical anion superoxyde ( $O_2^{\circ}$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^{\circ}$ ), dont certains de ces dérivés réactifs produits pourraient avoir une fonction dans les processus de signalisation cellulaire.

Le métabolisme de l'oxygène, lorsqu'il est dérégulé, que ce soit sous l'effet de facteurs endogènes ou de facteurs exogènes, peut entraîner un "stress oxydatif".

Le stress oxydatif représente l'incapacité pour l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives oxygénées, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants en faveur des espèces réactives oxygénées.

Les modifications génomiques, métaboliques et fonctionnelles induites par un stress oxydatif ont été impliquées dans le développement de différentes pathologies.

Les flavonoïdes, substances naturelles très répandues dans le monde végétal (54) et qui constituent une classe de composés appartenant à la famille des polyphénols (famille d'antioxydants), possèdent un potentiel pharmacologique élevé. Ils sont connus par leur activité antioxydante, principalement due à leur propriété redox, qui les permet à agir comme des agents réducteurs ou donneurs d'hydrogène, piègeurs d'espèces réactives oxygénées.

Notre étude, basée sur ces notions, vise à évaluer l'effet préventif d'un extrait des flavonoïdes totaux de la partie aérienne d'une plante sauvage, la *Foeniculum vulgare* Mill. (fenouil sauvage), contre la toxicité cardiaque (stress oxydatif) induite *in vivo* chez le rat, par un facteur exogène qui est la doxorubicine, un médicament anticancéreux largement utilisé en chimiothérapie anticancéreuse.

# **Synthèse bibliographique**

## I. Le stress oxydatif

### I.1. Les espèces réactives de l'oxygène

#### I.1.1. Définition

Un radical libre se définit comme toute molécule ou fragment d'une molécule possédant au moins un électron non apparié (célibataire) sur son orbitale externe (56.86.197). Les radicaux libres apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente (fission homolytique) pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical (58.197).

Les radicaux libres sont des espèces chimiquement instables (5.51.54.55), leur durée de vie est généralement très courte (58) (de la nano-à la milliseconde). La présence des électrons non appariés les confèrent une réactivité importante : ils réagissent avec des différentes molécules plus stables pour capter ou céder les électrons (14.48.54) et ils peuvent initier des réactions radicalaires en chaîne en engendrant de nouvelles espèces radicalaires (14.49.53.55.196).

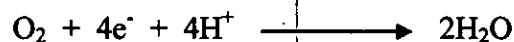
Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie qui s'appellent "radicaux primaires". Les autres radicaux libres, dits "radicaux secondaires", se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron (57) tels le radical anion superoxyde  $O_2^\bullet$ , le radical hydroxyle  $OH^\bullet$  (49.51.57) ou de l'azote tel le radical monoxyde d'azote ( $NO^\bullet$ ) (57). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le peroxynitrite ( $ONOO^\bullet$ ), ne sont pas des radicaux libres mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (48.57). L'ensemble des radicaux libres dérivés de l'oxygène et les espèces actives non radicalaires de l'oxygène est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène : ERO" (ROS en anglais pour *reactive oxygen species*) (29.57) (tableau 1).

Tableau 1. Les principales espèces réactives de l'oxygène (52).

ROS	Formule chimique
Radical anion superoxyde	$O_2^{\circ-}$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Trioxigène moléculaire (l'ozone)	$O_3$
Oxygène singulet	$^1O_2$
Radical hydroxyle	$OH^{\circ}$
Radical hydroperoxyde	$HOO^{\circ}$
Radical peroxyde	$ROO^{\circ}$
Peroxyde et hydroperoxyde	$ROOR'$ et $ROOH$
Radical alkoxyde	$RO^{\circ}$
Radical oxyde nitrique	$^{\circ}NO$
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Hypochlorite	$ClO^-$

### I.1.2. Sources et formation des ROS

Une partie de l'oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors à la formation du chef de file des ROS : le radical anion superoxyde  $O_2^{\circ-}$  ( $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\circ-}$ ) (48.58). Ce radical libre conduit au cours de véritable chaîne d'oxydoréduction à la formation de nombreuses espèces oxygénées très réactives, cette chaîne se termine éventuellement par la formation de l'eau (figure 1) (14.48.58.59) :





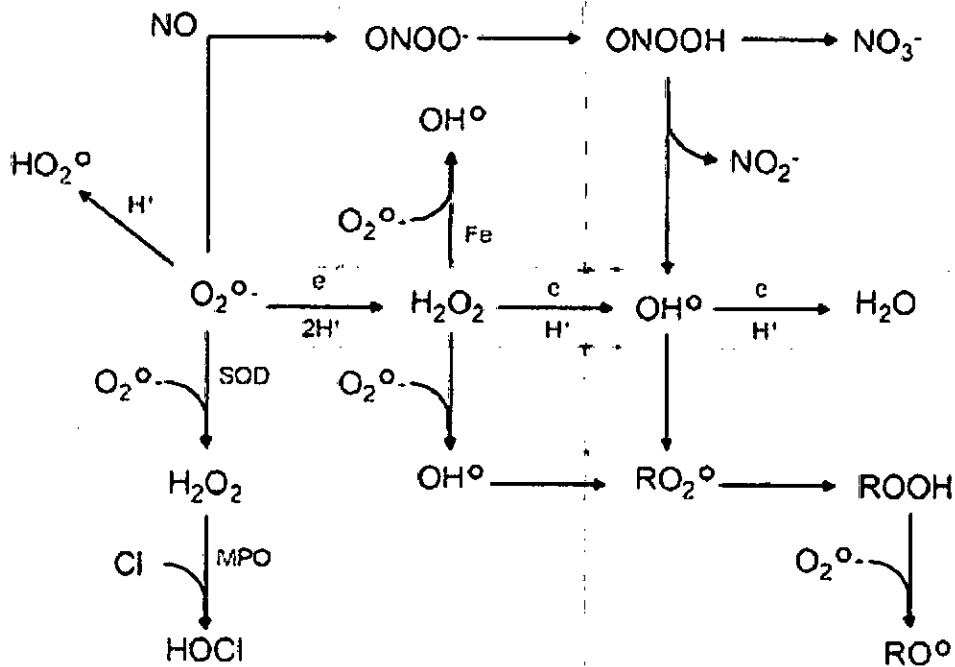
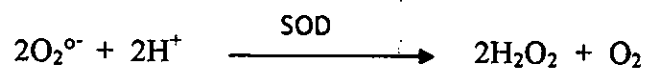
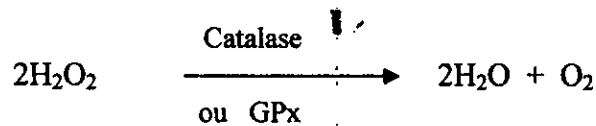


Figure 1. Formation en cascade des différentes espèces réactive de l'oxygène à partir du radical superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  (58).

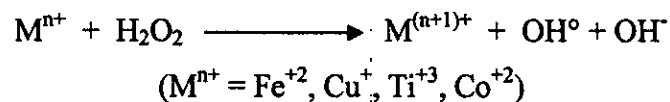
Le radical anion superoxyde est le moins réactif des ROS (48). Il ne réagit pas directement avec les différents composants bioorganiques de la cellule, il est éliminé ou tout au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas (14) par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SODs) qui catalysent sa disparition par dismutation en oxygène et peroxyde d'hydrogène (14.56.58.59) :



La majorité du  $H_2O_2$  formé est décomposé en eau et oxygène par une enzyme cellulaire présente dans les peroxysomes : la catalase (48) ou par la glutathion peroxydase GPx (55) :

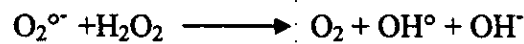


En présence de cations métalliques tels que  $\text{Fe}^{+2}$  ou  $\text{Cu}^+$ , le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  conduit à la formation du radical hydroxyle  $\text{OH}^\circ$  dans une réaction appelée réaction de *Fenton* :

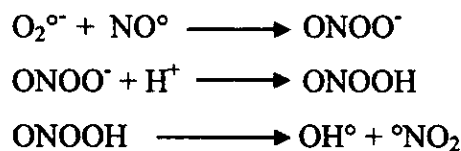


En plus de la réaction de *Fenton* qui constitue la source majeure de la production *in vivo* du radical  $\text{OH}^\circ$ , le radical anion superoxide  $\text{O}_2^{\circ-}$  peut participer à la formation de ce radical à travers :

- La réaction de Haber-Weiss (56.83.86) :



- L'interaction entre  $\text{O}_2^{\circ-}$  et  $\text{NO}^\circ$  (50.133) :



Le radical hydroxyle  $\text{OH}^\circ$  est le plus réactif des ROS (48). Dès qu'il se forme, il attaque rapidement les macromolécules de la cellule (59). A cause de son temps de demi-vie très court (moins de 1 ns dans une solution aqueuse), ce radical libre réagit *in vivo* quasiment sur le lieu de sa production (14.56).

Au cours du processus d'inflammation cellulaire, les cellules du système immunitaire produisent une variété de ROS (48.186) y compris le peroxyde d'oxygène, le radical  $\text{O}_2^{\circ-}$  et le radical  ${}^\circ\text{NO}$ . Ce dernier peut être produit aussi par plusieurs cellules à partir d'arginine et d'oxygène dans une réaction catalysée par la NO-synthase (15) (figure 2). A forte concentration, le  ${}^\circ\text{NO}$  devient délétère pour les cellules, notamment en réagissant avec le radical  $\text{O}_2^{\circ-}$  pour former l'anion peroxynitrite  $\text{ONOO}^-$  :



Cet anion est considérablement oxydatif vis-à-vis l'ADN et les lipides cellulaires(56). Il peut secondairement se décomposer en d'autres oxydants comme le  ${}^{\circ}\text{NO}_2$  et le  $\text{OH}^{\circ}$  (15) (figure 2)

Plusieurs d'autres ROS peuvent se produire dans l'organisme vivant, comme l'acide hypochloreux (HOCL), le radical alkoxy ( $\text{RO}^{\circ}$ ) et le radical peroxy ( $\text{ROO}^{\circ}$ ) (figure 1) (58). Les radicaux peroxy sont des espèces très énergétiques. Le plus simple radical peroxy est le dioxy (hydroperoxy :  $\text{HOO}^{\circ}$ ) qui est l'acide conjugué du radical  $\text{O}_2^{\circ-}$  (56).

La mitochondrie est le site majeur de la production des radicaux anions superoxydes (14.56.59). Elle génère environ 2-3 nmole du  $\text{O}_2^{\circ-}$  / min par mg de protéines (56). Cette production est due à des électrons qui s'échappent de la chaîne respiratoire et se fixent directement sur l'oxygène moléculaire  $\text{O}_2$  selon la réaction ( $\text{O}_2 + e^- \longrightarrow \text{O}_2^{\circ-}$ ) (17).

La xanthine oxydase, enzyme présente dans plusieurs tissus des mammifères est une source importante du radical  $\text{O}_2^{\circ-}$  et du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (56). La NADH déshydrogénase, située dans la membrane mitochondriale interne, tout comme la NADPH oxydase, présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales, peuvent conduire à la formation de radicaux  $\text{O}_2^{\circ-}$  (14) (figure 2). Par ailleurs, l'apparition de radicaux  $\text{O}_2^{\circ-}$  peut résulter de l'auto-oxydation des semiquinones (59), mais aussi de la détoxification des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450 présents au niveau du réticulum endoplasmique (14).

Les ROS sont la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène par l'organisme. Durant le fonctionnement cellulaire normale, la production des ROS est permanente et physiologique (58.127.129.131). Cependant, cette production augmente dans les conditions pathologiques (59) (l'exposition aux facteurs environnementaux tels que les radiations ionisantes, les produits chimiques (2), la fumée et les polluants ; manque des antioxydants ou destruction des piègeurs des radicaux libres (48)).

## **I.2. Le stress oxydatif**

### **I.2.1. Définition**

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence en faible quantité. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatif par rapport au niveau de radicaux libres présents. Dans ces circonstances normales, la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre (15.57).

Dans certaines conditions, il apparaît un déséquilibre provoqué par une production exagérée de radicaux libres ou par une diminution des systèmes de défense, ou encore par une association de ces deux phénomènes. Un tel déséquilibre entre systèmes producteurs de radicaux libres et systèmes de défense caractérise l'état de stress oxydatif (14.15.57.85).

### **I.2.2. Le stress oxydatif induit par les médicaments anticancéreux**

Des antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité. Ils agissent selon un mécanisme de transfert d'électrons. Ainsi, selon les travaux de Sinha et al., 1989, réalisés sur des cultures de cellules tumorales mammaires, la doxorubicine est bioactivée en radical semiquinone de la doxorubicine par réduction enzymatique (cytochrome P450). Ce radical peut réagir avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde. Pour une autre anthracycline, la daunorubicine, la réduction en radical libre se réalise alors que la molécule est déjà intercalée dans l'ADN (5).

### **I.2.3. Les dégâts oxydatifs**

Lors d'un stress oxydatif, les ROS non "détoxiquées" par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines et l'ADN (figure 2) et peuvent conduire à la mort cellulaire (17.58.59.36.125.132).

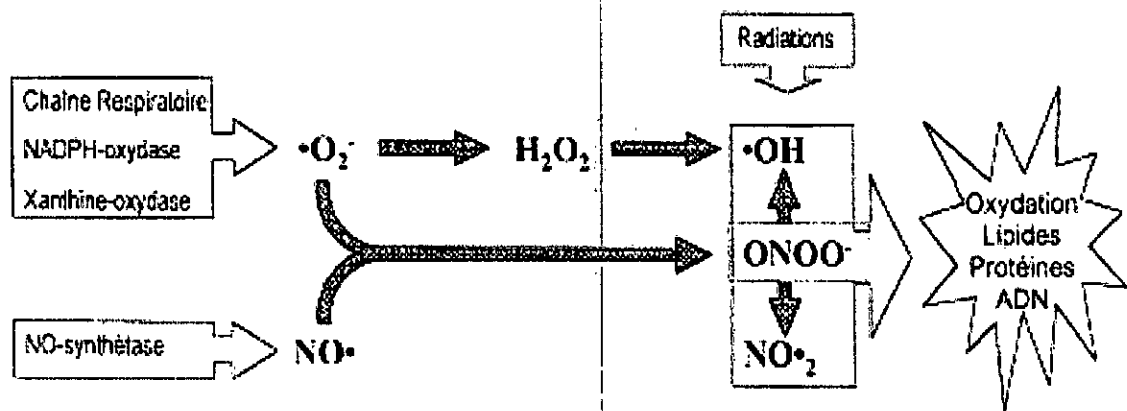


Figure 2. Origine et cibles de principales espèces réactives de l'oxygène (15).

#### • I.2.2.1. Effets sur les lipides

Les ROS peuvent attaquer les lipides, et plus particulièrement les acides gras polyinsaturés qui sont facilement oxydables (15.56). L'attaque au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydation lipidique en cascade (figure 3) aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (58).

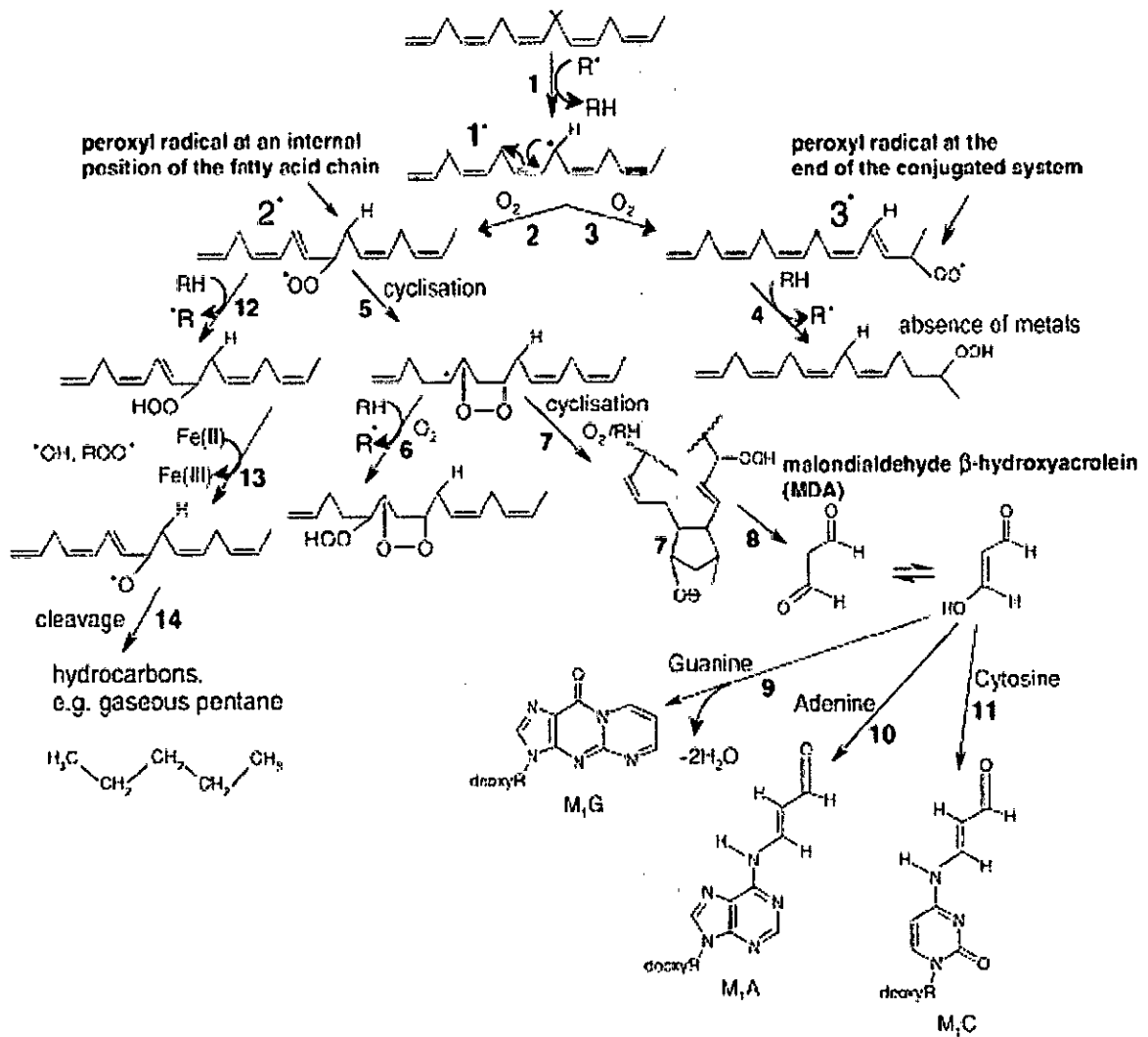


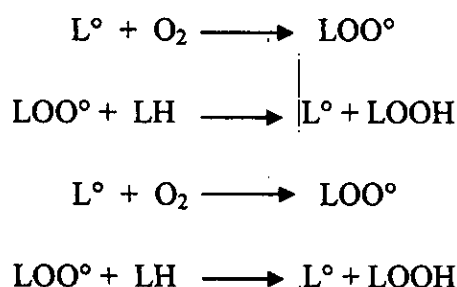
Figure 3. Processus de la peroxydation lipidique en cascade (56).

Le processus total de la peroxydation lipidique passe par trois étapes : initiation, propagation et terminaison (56).

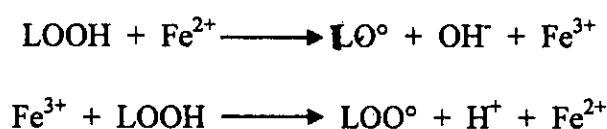
La peroxydation des lipides est généralement initiée par un radical libre ( $R^\bullet$ ) particulièrement réactif (17), comme le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) (56) selon la réaction :



Le radical lipidique ( $L^\circ$ , radical alkyle) formé lors de cette réaction réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde ( $LOO^\circ$ ) capable de transformer un autre acide gras polyinsaturé en radical lipidique, propageant ainsi la réaction de peroxydation lipidique :



L'hydroperoxyde lipidique ( $LOOH$ ) formé lors de la phase de propagation de la réaction de peroxydation est relativement stable. Cependant, en présence de métaux de transition, il peut reformer de nouveaux radicaux lipidiques ( $L^\circ$ , radical alkoxyde ou  $LOO^\circ$ , radical peroxyde) :



Par ailleurs, il peut aussi se transformer en endopéroxyde, qui, en présence d'oxygène, va conduire à la formation de divers produits, dont notamment des aldéhydes (4-hydroxynonéal, malondialdéhyde (MDA)...) (figure 3), qui peuvent aller endommager les protéines et les acides nucléiques et dont le dosage permet de déterminer l'étendue de la peroxydation.

La réaction de la peroxydation lipidique se termine lorsque deux radicaux libres se rencontrent ( $L^\circ + L^\circ \longrightarrow L-L$ ) ou lorsque le radical lipidique interagit avec un antioxydant liposoluble tel que la vitamine E (17),

#### • 1.2.2.2. Effets sur les protéines

La toxicité des ROS s'exerce également sur les protéines. Les ROS sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction (56.58.136). Les effets des ROS sur les protéines sont complexes, allant de l'oxydation du squelette protéique, c'est-à-dire de la chaîne polypeptidique conduisant à son clivage, à celle des chaînes latérales de différents acides aminés (17).

Les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine et l'histidine sont les acides aminés les plus sensibles à l'action des ROS. Le radical hydroxyle  $\text{OH}^\circ$  peut s'additionner sur eux, modifiant ainsi la conformation de la protéine (58). Ce radical libre est considéré comme l'espèce majeure responsable de l'oxydation des protéines (56)

Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation d'un pont disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. Les ROS sont capables aussi de couper des liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments protéiques.

Par ailleurs, le radical  $\text{OH}^\circ$ , mais aussi l'anion superoxyde  $\text{O}_2^\circ$ , s'attaquent également aux protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif. L'oxydation de ces acides aminés conduit à une modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique

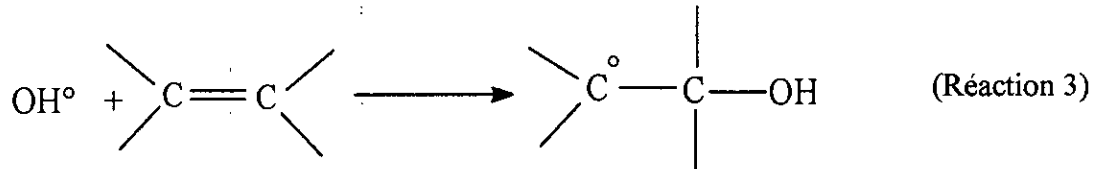
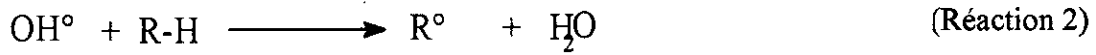
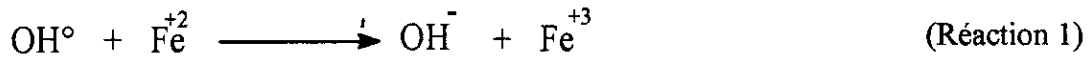
Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant la signalisation cellulaire (58).

#### • I.2.2.3. Effets sur les acides nucléiques

L'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondriale, est également une cible majeure des ROS. Les radicaux superoxydes et les radicaux hydroxyles peuvent provoquer des lésions des acides nucléiques susceptibles d'entraîner des mutations ou d'altérer l'expression des gènes (17).

Les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\circ$ ) sont connus par leur capacité de réagir avec tous les composants moléculaire de l'ADN. Par conséquent, ils endommagent à la fois, les bases puriques et pyrimidiques et souvent aussi les désoxyriboses (56.58). Ce sont des oxydants puissants qui réagissent selon trois modes d'action : soit en arrachant un électron (réaction 1), soit en arrachant un atome d'hydrogène d'un substrat organique RH (réaction 2), soit encore en s'additionnant sur les doubles liaisons (réaction 3).





Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par le radical hydroxyle peuvent être générées (figure 4). Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines.

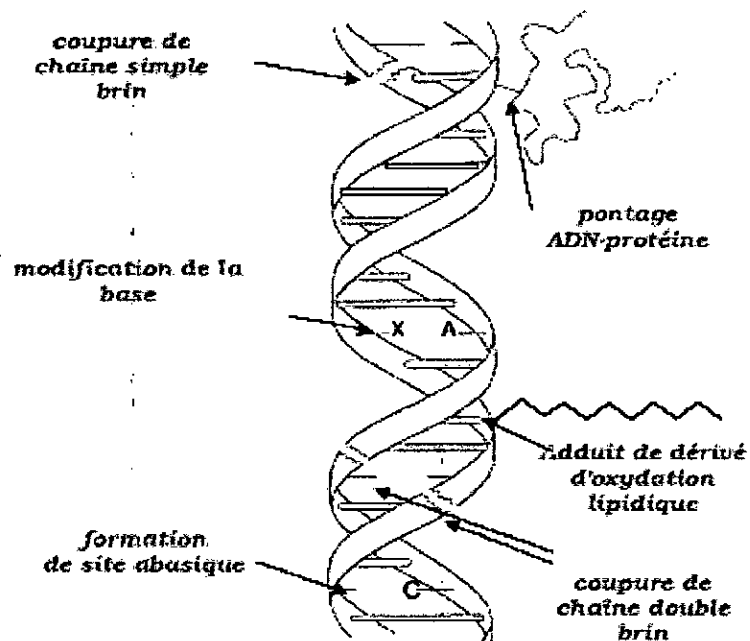


Figure 4. Lésions de l'ADN formées par attaque des radicaux libres (57).

Les bases qui composent l'ADN, et particulièrement la guanine, sont sensibles à l'oxydation. L'attaque radicalaire peut être directe et entraîner l'oxydation des bases, engendrant un grand nombre de bases modifiées : 8-hydroxyguanine, 8-nitroguanine, formamidopyrimidine, 8-oxoadénine, formimidouracile, 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyméthyluracile, thyminediol, oxazolone.

Le stress oxydatif peut attaquer aussi la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin (57).

Le radical hydroxyle réagit avec les bases de l'ADN en s'additionnant sur leurs double liaisons (réaction 3). Dans le cas de la guanine (G), la réaction d'addition conduit à la formation de la 8-hydroxyguanine (8-OH-G) (14.56) (figure 5). Ce produit oxydé de l'ADN (8-OH-G) est important à cause de sa formation relativement facile et aussi à ses propriétés mutagènes et carcinogènes (56). Sa présence est utilisée comme un biomarqueur des attaques oxydatives sur les acides nucléiques (17.56) et comme un biomarqueur potentiel de la carcinogenèse (56).

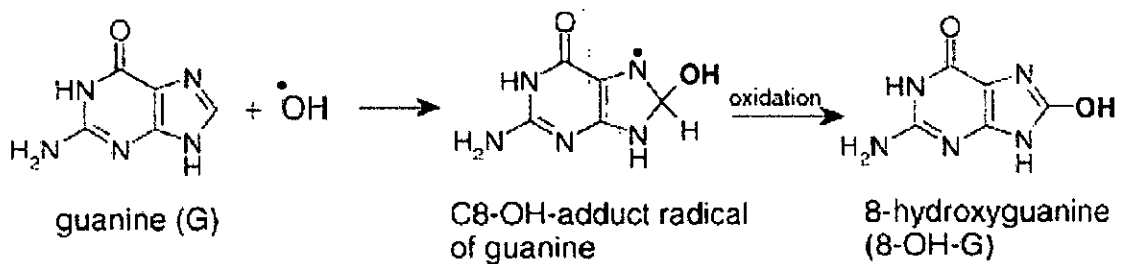


Figure 5. Réaction de la guanine (G) avec le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) (56).

De par leur action sur les principaux constituants moléculaires de la cellule, les ROS induisent différents signaux cellulaires susceptibles d'activer les systèmes de protéolyse et de mort cellulaire (58).

Les dommages causés aux ARNs ne sont pas réparés ; en revanche, les processus de réparation de l'ADN semblent pouvoir éliminer pratiquement sans erreurs les lésions

oxydatives de l'ADN. Cependant, si les dommages excèdent les capacités de réparation, la récupération cellulaire après un stress oxydatif peut être compromise.

Les altérations structurales lorsqu'elles ne sont " réparées " entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétions, amplifications, à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (58).

En raison de leur capacité à endommager presque tous les types de molécules dans l'organisme, les dérivés réactifs de l'oxygène ont été impliqués dans un très grand nombre de pathologies (15.173) tant aiguës que chroniques (15) comme facteurs déclenchant ou associés à des complications de l'évolution (57). Ainsi, l'oxydation des lipides et de l'ADN est un facteur primordial dans l'augmentation des maladies cardiovasculaires et celle des cancers.

Le stress oxydatif est également impliqué dans des affections aussi diverses que l'arthrite, les maladies cardiaques (125.128.134), la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer (58), le diabète (29.124), le dysfonctionnement des organes, la coagulation intravasculaire (59), les maladies inflammatoires (12) et les maladies neurodégénératives (14.125.148). Il est un mécanisme majeur dans le vieillissement physiologique, selon la théorie radicalaire (12.58).

Par altération des enzymes du cycle de Krebs et du rendement mitochondrial, le stress oxydatif participe à une diminution de la principale voie énergétique, la phosphorylation oxydase favorisant une acidose et une fatigue précoce (58)

#### **I.2.4. Le rôle bénéfique des ROS**

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'endommager un nombre considérables de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions physiologiques utiles (57) : phagocytose (56.58.192), signalisation cellulaire (56.58), bactéricide (58). Ils participent également au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, au fonctionnement de certaines enzymes (57), à l'amélioration du captage musculaire du glucose, à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire et à la régulation de nombreux facteurs de transcription qui activent des gènes dits "protecteurs" pour la cellule. Les ROS sont impliqués aussi dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée) et dans la prolifération des cellules musculaires lisses (cellules vasculaires) (14)...

### **I.3. Systèmes de défense contre le stress oxydatif**

Les systèmes de défense contre le stress oxydatif vont surtout viser à limiter les réactions radicalaires, qui sont pour la plupart irréversibles (17).

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leur niveau d'espèces réactives de l'oxygène (57).

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (15.17). Cette définition fonctionnelle s'applique à un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro- ou liposolubles.

Les antioxydants sont présents dans tous les compartiments de l'organisme, qu'ils soient intracellulaires, membranaires ou extracellulaires (15). Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux :

- En prévenant la formation des ROS (antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes)
- En épurant les ROS (antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo- ou hydrosolubles piègeurs de ROS)

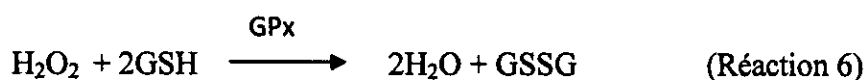
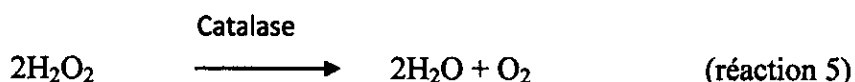
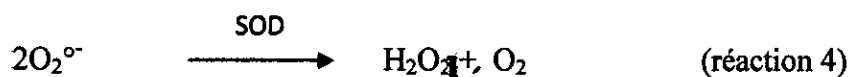
#### **I.3.1. Les antioxydants primaires**

Le fer et le cuivre sous forme libre étant particulièrement promoteurs de dommages radicalaires. Ces métaux sont séquestrés et transportés grâce à des protéines comme la ferritine et la transferrine qui agissent donc en tant qu'antioxydants primaires (15.17).

La superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) sont les principaux antioxydants enzymatiques primaires. Ils sont responsables de la prévention de la formation et l'oxydation des ROS (48).

- **La superoxyde dismutase**

La SOD est une enzyme convertissant, par dismutation, le radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et oxygène moléculaire (57.187.188.194) (réaction 4).



Les superoxydes dismutases existent sous plusieurs isoformes dont la structure d'ensemble est très bien conservée lors de l'évolution, formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme (57). Elles catalysent la même réaction de dismutation mais différent par leurs masses moléculaires, leurs séquences en acides aminés et leurs localisations (49).

Les SODs sont des métalloenzymes qui contiennent soit du manganèse (Mn-SOD), soit du cuivre et du zinc (Cu/Zn-SOD), et qui sont restreintes à des compartiments cellulaires différents (15.17.57). Il existe trois types de SOD (17.193) : la SOD1 ou Cu/Zn-SOD protégeant le cytosol, la SOD2 ou mn-SOD protégeant la mitochondrie et la SOD3 qui comme la SOD1 comporte du cuivre et qui est extracellulaire et aussi appelée EC-SOD (17). C'est donc indirectement que ces métaux possèdent une activité antioxydante, alors que le cuivre par exemple, sous forme libre, est directement prooxydant (15).

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui se forme lors de la réaction (4) est secondairement soit convertit en oxygène et eau, grâce à la catalase (réaction 5), soit transformé en eau à travers une réaction couplée à l'oxydation du glutathion, catalysée par la glutathion peroxydase (GPx) (15.17.191), une métalloenzyme à sélénium (15.17) (réaction 6). Le glutathion oxydé est non toxique et peu en outre être réduit par le NADPH grâce à l'enzyme glutathion réductase (15).

- **La catalase**

La catalase est une enzyme hémérique (17) à cofacteur fer, elle est présente dans un grand nombre de tissus mais elle est particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. La catalase est une enzyme tétramérique, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH (53).

- **Les glutathions peroxydases**

Les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium existent dans le cytosol (cGPx), dans le plasma (pGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx) et une isoenzyme est spécifique des cellules digestives (GIGPx).

Les glutathions peroxydases constituent le principal système de protection car elles détruisent non seulement le peroxyde d'hydrogène mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium (57).

Le rôle des superoxydes dismutases et des peroxydases est complémentaire car une bonne protection ne peut être obtenue par les superoxydes dismutases seules (17.57). L'activité des SODs doit être couplée à une activité suffisante des peroxydases, sinon il s'en suivra une production nette du  $H_2O_2$  qui, en présence de métaux de transition, pourra donner naissance au puissant oxydant, le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) et pour lequel il n'y a aucun mécanisme de détoxification enzymatique (17).

- **Les peroxyredoxines**

Les peroxyredoxines (Prx), ou thioredoxines peroxydases, sont des protéines antioxydantes qui ont été découvertes récemment. Elles sont au nombre de six chez les mammifères et sont localisées dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes, associées au noyau et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant dans la cellule à travers une activité peroxydase, ou le  $H_2O_2$ , le  $ONOO^-$  et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Malgré leur plus faible efficacité catalytique par rapport à la GPx et à la catalase, ces protéines pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes du fait de leur quantité importante (0.1 à 0.8% de protéines solubles cellulaires) et de leur large distribution dans la cellule (62).

### I.3.2. Les antioxydants secondaires

L'organisme possède une seconde ligne de défense "les piègeurs des radicaux libres" qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ROS, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (58).

Les piègeurs des ROS agissent en piégeant les radicaux libres et en captant les électrons célibataires, les transformant en molécules ou ions stables. Le piègeur va devenir un radical libre, puis sera soit détruit, soit régénéré par un autre système (57).

Les antioxydants piègeurs de radicaux libres sont localisés dans le sang et les fluides des espaces extracellulaires, où les antioxydants enzymatiques préventifs (antioxydants primaires) sont absents ou présents en très faibles quantités.

Ces petites molécules antioxydantes contiennent, à la fois, des variétés hydro- et liposolubles (48). Les antioxydants secondaires liposolubles, comme la vitamine E, l'ubiquinol (forme réduite du coenzyme Q), les caroténoïdes et les flavonoïdes (17), sont localisés dans les membranes cellulaires et les lipoprotéines (48) où ils sont particulièrement efficaces pour limiter la peroxydation lipidique tandis que les antioxydants secondaires hydrosolubles, comme la vitamine C, l'acide urique, l'albumine et la bilirubine (15), sont présents dans les environnements aqueux tel que les fluides intracellulaires et dans le sang (48).

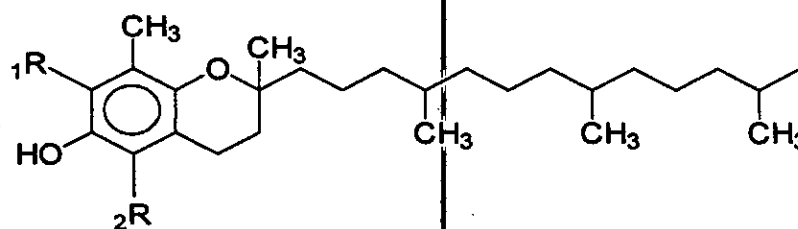
- **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes (chapitre IV) constituent une famille de polyphénols d'origine végétale, souvent désignés sous le nom "vitamine P". Ils sont des antioxydants stœchiométriques régénérables par la vitamine C (83).

- **La vitamine E**

La vitamine E (figure 6) est le principal antioxydant liposoluble (17.59). Le terme vitamine E englobe différents isomères, l' $\alpha$ -tocophérol (alpha-tocophérol) étant l'antioxydant le plus efficace, notamment dans la détoxification des radicaux peroxydes ( $\text{ROO}^\circ$ ) et alkoxydes ( $\text{RO}^\circ$ ) et donc dans la prévention des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (17.49).

La chaîne aliphatique confère à cette vitamine sa liposolubilité et permet son incorporation dans les membranes cellulaires (49).



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	tocophérols
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	alpha
H	CH <sub>3</sub>	beta
CH <sub>3</sub>	H	gamma
H	H	delta

Figure 6. Structure chimique de la vitamine E (49).

Les tocophérols  $\alpha$  (alpha),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gamma) et  $\delta$  (delta) détruisent les radicaux peroxydes et alkoxydes grâce au groupement hydroxyle de leur cycle aromatique en formant des hydroperoxydes et hydroxydes lipidiques et les radicaux tocophéroxydes. Les réactions peuvent être résumées de la façon suivante :



Le radical tocophéroxyde formé ( $\alpha\text{-TO}^\circ$ ) est peu réactif. Il doit être réduit pour régénérer le tocophérol et cette réduction est réalisée par d'autres antioxydants, dont la vitamine C, le glutathion (GSH) (17,49) et l'ubiquinone (49) (figure 7). En l'absence de systèmes de régénération appropriés, la vitamine E peut avoir des effets prooxydants (17).



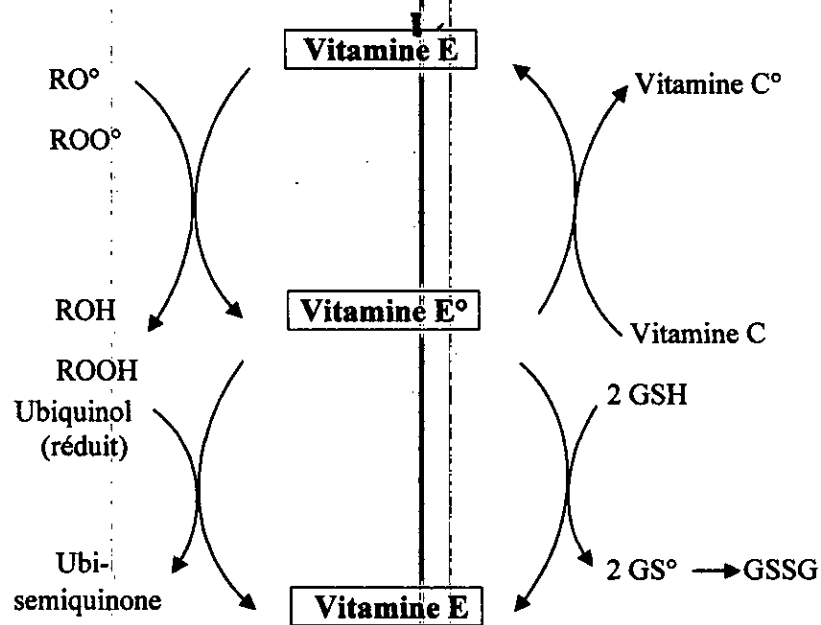


Figure 7. Régénération de la vitamine E (49).

- **Les caroténoïdes**

Quant aux caroténoïdes (figure 8) (piégeurs liposolubles de ROS), ils forment une grande famille de polyènes conjugués pigmentaires aux capacités antioxydantes similaires à celles des tocophérols. Grâce à leur longue chaîne carbonée, riche en double liaisons, ils sont d'excellents piégeurs de radicaux peroxydes et d'oxygène singulet. Une molécule de caroténoïdes peut piéger plusieurs ROS avant d'être finalement détruite (49).

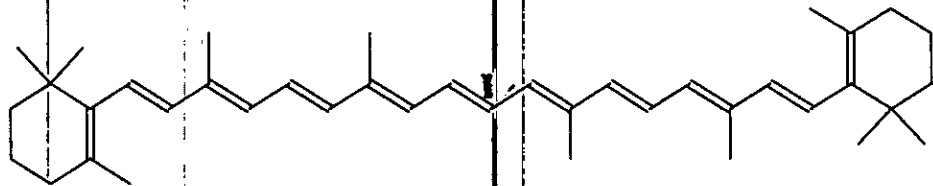
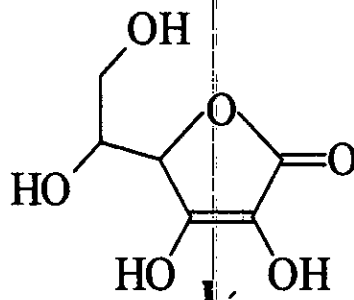


Figure 8. Structure chimique du  $\beta$ -carotène (famille des caroténoïdes).

- **La vitamine C**

La vitamine C (acide ascorbique) (figure 9) est considérée comme l'antioxydant secondaire hydrosoluble le plus important dans les fluides extracellulaires (59). Cette vitamine est une piègeuse de ROS à spectre large, efficace contre les radicaux peroxydes, hydroxydes et superoxydes ainsi que contre le peroxyde d'azote ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ ) (17). Elle est capable de neutraliser les ROS dans la phase aqueuse avant que la peroxydation lipidique soit initiée (59) et capable aussi de régénérer la vitamine E (figure 7). Les formes oxydées de l'ascorbate (le semidéhydroascorbate et le déhydroascorbate) peuvent être régénérées par le glutathion (GSH), des thiols intracellulaires (17) ou par les ascorbates réductases (57).



**Figure 9.** Structure chimique de la vitamine C.

A forte dose et en présence de quantité importante des métaux de transition comme le fer, la vitamine C peut devenir prooxydante en favorisant la réaction de *Fenton* (17,49).

- **Le glutathion (GSH)**

Le glutathion est le thiol non protéique le plus abondant dans les cellules des mammifères (17). Le glutathion ou L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine (figure 10) est un tripeptide dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques (49).

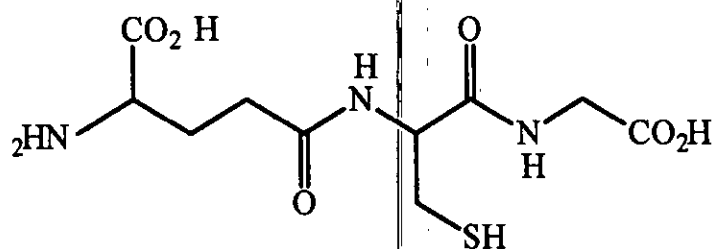
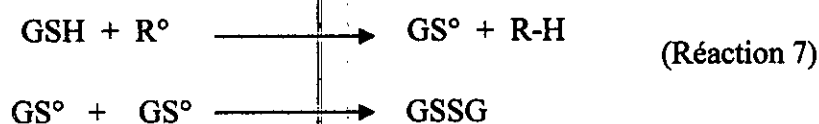


Figure 10. Structure chimique du glutathion réduit (GSH) (49).

Dans la plupart des cellules animales, la concentration de glutathion réduit (GSH) est comprise entre 0.5 et 10 mM alors que sa concentration plasmatique est 1000 fois plus faible (0.5 à 10  $\mu$ M). Dans les conditions normales, le glutathion sous forme réduite (GSH) représente entre 90 et 98 % du glutathion total (49).

Grâce à sa concentration élevée et du fait qu'il est le substrat d'importantes enzymes de défense (49), le glutathion est considéré comme un antioxydant majeur de la cellule (17.49.126.195). Il agit soit en interagissant directement avec différents ROS (radical hydroxyle, superoxyde, monoxyde d'azote  $^{\circ}\text{NO}$ ...) (17) par donation d'un atome d'hydrogène (piégeage et neutralisation des ROS) (réaction 7) (48.195), soit en tant que cosubstrat de la glutathion peroxydase (GPx) (17.85), soit en régénérant d'autres antioxydants comme la vitamine C et la vitamine E (17.59).

En réagissant avec un radical libre, le glutathion (GSH) s'oxyde et forme finalement une molécule de glutathion oxydé (GSSG) :



Le (GSSG) formé peut être réduit au (GSH) par la GSSG-réductase (49).

Le glutathion est aussi une forme de transport et de stockage de la cystéine (17.49), un régulateur de l'apoptose et de la prolifération cellulaire, un partenaire dans les réactions de détoxification des xénobiotiques auxquels il est conjugué par la GSH-S-transférase et un cofacteur des réactions d'isomérisation.

Il est également impliqué dans la synthèse des désoxyribonucléiques et il permet de garder les groupements SH des protéines cellulaires sous forme réduite, contribuant ainsi au maintien du potentiel redox de la cellule et donc au maintien de bon nombre de processus de signalisation (17).

- **Autres antioxydants secondaires**

Il existe de nombreuses autres enzymes comme la glutathion réductase (GR), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), la glutathion-S-transférase (GST) (59) et la thioredoxine réductase (57) qui sont considérées comme des enzymes antioxydantes secondaires. Ces enzymes aident dans la détoxification des ROS en diminuant les niveaux des peroxydes ou par le maintien d'une fourniture régulière des intermédiaires métaboliques comme le GSH et le NADPH (réactions 8 et 9) qui sont nécessaire pour le fonctionnement optimale des enzymes antioxydantes primaires (59).



## II. La doxorubicine

### II.1. Généralités

L'ensemble des composés possédant un chromophore anthraquinonique relié à un aminosucre du type daunosamine constitue la classe des anthracyclines. Les anthracyclines antitumorales figurent encore parmi les agents les plus communément employés en chimiothérapie anticancéreuse (34.37.76). Les travaux réalisés depuis près de 30 ans, dans la série des anthracyclines, ont eu pour objet d'augmenter l'activité antitumorale, d'élucider leur mécanisme d'action et de tenter d'atténuer la cardiotoxicité propre à ces antitumoraux qui constitue avec l'apparition du phénomène de résistance pléiotropique, les deux handicaps majeurs de la série (34).

### II.2. Définition et propriétés chimiques

La doxorubicine (adriamycine) (figure 11) est un médicament antibiotique anticancéreux qui est largement utilisé dans le traitement d'un large spectre des cancers (31.32.33.34.39.67.69). Cette drogue antinéoplasique est le chef de file de la famille des anthracyclines (figure 12). Il est produit à partir de *streptomyces coeruleorubidus peucetius* ou de *streptomyces peucetius var caesius* (34). Aujourd'hui, une synthèse chimique totale de ce médicament est possible (33).

La doxorubicine possède un chromophore de tetracycline sur lequel est attaché un sucre de type daunosamine par une liaison glycosidique. Ce chromophore contient deux noyaux adjacents, de quinone et d'hydroquinone, qui rendent la molécule de la doxorubicine comme agent donneur et accepteur d'électron. Ces deux noyaux sont responsables aussi de sa couleur rouge intense, de sa fluorescence et de sa capacité de chélater des ions métallique.

La formule chimique brute de la doxorubicine est  $C_{27}H_{29}NO_{11}H^+ Cl^-$  et sa masse molaire est de 580. Son nom chimique complet est : Hydrochloride de (1S,3S)-3-glycoloyl-1,2,3,4,6,11-hexahydro-3,5,12-trihydroxy-10-methoxy-6,11-dioxonaphtacen-1-yl-3-amino-2,3,6-trideoxy-a-L-lyxopyranoside.

La doxorubicine est soluble dans l'eau et dans l'eau physiologique et elle est pratiquement insoluble dans l'acétone et dans l'éther diéthylique.

La solution de la doxorubicine peut être conservée, à l'abri de la lumière, jusqu'à 24 heures dans la température ambiante et jusqu'à 48 heures entre 4-10°C (68).

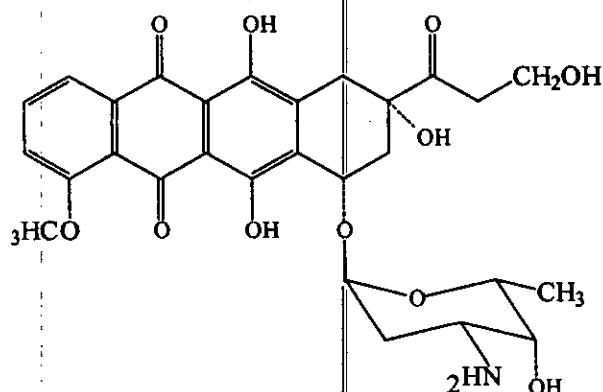


Figure 11. Structure chimique de la doxorubicine (40).

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Doxorubicine	CH <sub>2</sub> OH	OCH <sub>3</sub>
Daunorubicine	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Idarubicine	CH <sub>2</sub> OH	H
Epirubicine	Comme la doxorubicine	avec epimérisation du groupe hydroxyle de l'aminosucré

Figure 12. Structures chimiques d'anthracyclines antibiotiques (40).

### II.3. Pharmacologie

Hormis l'idarubicine qui peut être utilisée per os, toutes les anthracyclines sont administrées par voie intraveineuse. Elles sont diversement liées aux protéines plasmatiques : de 75% pour la doxorubicine, le taux de liaison s'élève à 95% pour l'idarubicine.

Les concentrations tissulaires peuvent être jusqu'à 100-200 fois plus élevées qu'au niveau plasmatique (34).

La pharmacocinétique de la doxorubicine est triphasique (34.35.38) (tableau 2). Elle semble être similaire chez l'animal et chez l'homme (38). Éliminée du plasma, la molécule se concentre dans le foie, le cœur et le rein (34.38) après une rapide distribution (34.114). L'élimination de la molécule et de ses métabolites est essentiellement biliaire (37.39). En effet, l'élimination urinaire est faible (34).

**Tableau 2.** Paramètres pharmacocinétiques de la doxorubicine (34).

	Clairance plasmatique (L/h/m <sup>2</sup> )	t <sub>1/2</sub> élimination α (min) ; β(h) ; γ(h)	Élimination	
			% biliaire	% urinaire
Doxorubicine	30	5 ; 1 ; 30	≤45	10

#### II.4. Métabolisme

Le métabolisme de la doxorubicine, essentiellement hépatique, s'effectue à deux niveaux :

1. Réduction stéréospécifique du carbonyle en C13 en alcool (S) catalysée par une enzyme cytoplasmique NADPH dépendante, l'aldocétoréductase. Le composé obtenu est le doxorubicinol (34.37.39), il est le métabolite majeur de la drogue (37.38.74).
2. Déglycosylation : celle-ci constitue une voie mineure de métabolisation (34). Elle est sous la dépendance de glycosidases microsomales présentes dans le réticulum endoplasmique. Elle conduit à la formation des composés hydroxy- ou désoxy-aglycones (34.37.39).

Le métabolisme de la doxorubicine est représenté dans la figure 13.

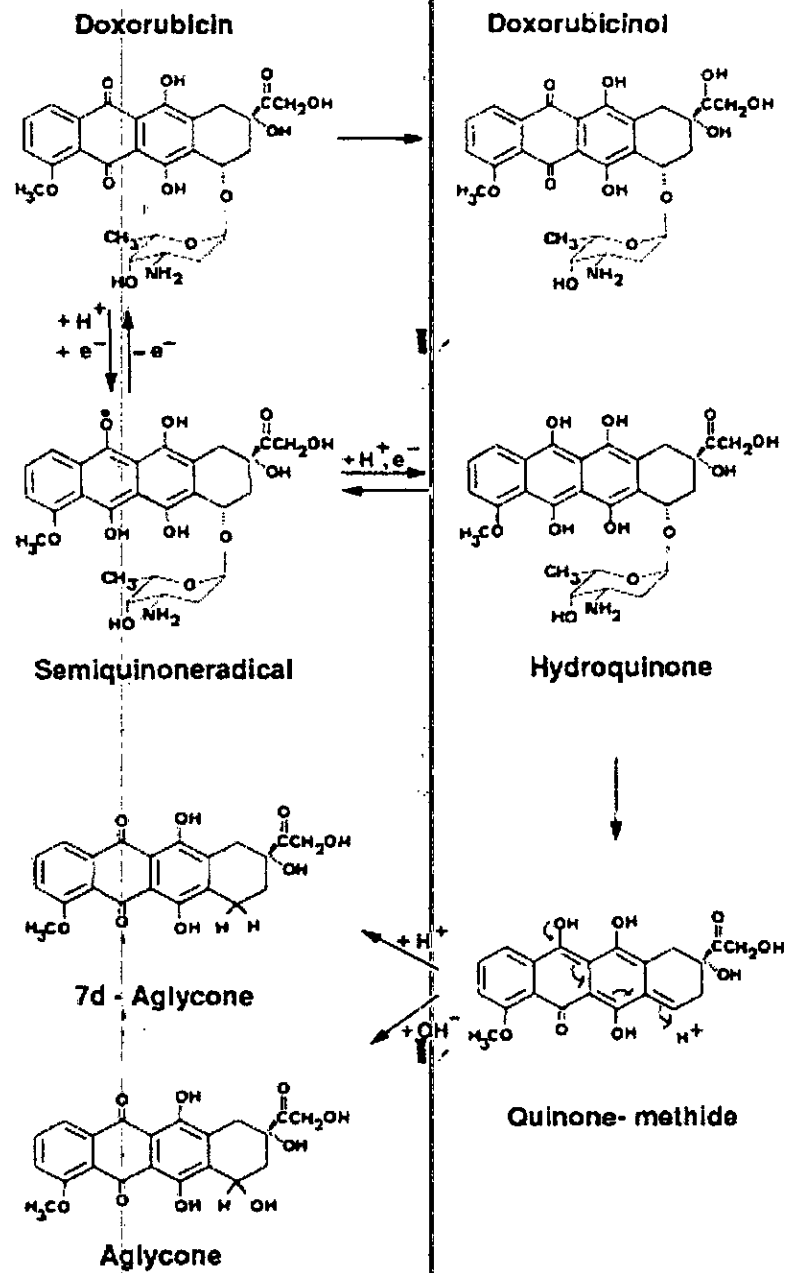


Figure 13. Métabolisme de la doxorubicine (35).

## II.5. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de l'activité cytostatique de la doxorubicine n'est pas encore bien élucidé, il est sujet à controverse (33.34.72.75). La doxorubicine s'intercale entre deux paires



adjacentes de bases azotées de l'ADN (37) et agit avec la topo-isomérase II (34.37), enzyme qui contrôle la structure dans l'espace de l'ADN (34.37.183.185). Il se forme des complexes ternaires ADN-topo-isomérase II-doxorubicine stables et irréversibles qui fixent les coupures de l'ADN, bloquent ses fonctions, inhibent sa synthèse, et entraînent la mort cellulaire (34.37). De récentes études ont mis en évidence une inhibition de l'hélicase. Les interférences inter-brin de la doxorubicine avec l'ADN pourraient être une explication de l'empêchement de la séparation des deux brins par cette enzyme (33). La doxorubicine favorise aussi la formation de radicaux libres qui peuvent couper l'ADN et endommager les membranes cellulaires, et expliquent la toxicité sur le cœur (33.34).

## **II.6. La cardiotoxicité de la doxorubicine**

La cardiotoxicité de la doxorubicine constitue l'effet indésirable sérieux qui limite son utilisation clinique dans le traitement des cancers (32.71). Le mécanisme de la cardiotoxicité de ce médicament n'est pas parfaitement connu, il est sujet à controverse (33.34.81.82).

La cardiotoxicité de la doxorubicine est dose-dépendante, elle est aiguë et chronique. La cardiotoxicité aiguë inclue une baisse de contractilité cardiaque, une hypotension, une tachycardie, une arythmie et des anomalies dans la conduction (68). Ces signes de cardiotoxicité aiguë se développent dans quelques minutes qui suivent l'administration intraveineuse du médicament et ils sont transitoires (31.68).

La cardiotoxicité chronique de la doxorubicine se développe après plusieurs semaines ou plusieurs mois de l'administration répétitive du médicament. Elle est caractérisée par le dysfonctionnement progressif du ventricule gauche du cœur indiquant une myocardiopathie chronique et irréversible (31) accompagnée par une hypotension (pression sanguine 70/50 mm hg), une tachycardie, un développement d'une dilatation cardiaque et une insuffisance ventriculaire. Dans les cas extrêmes, la myocardiopathie conduit à une insuffisance cardiaque congestive (33.68). La cardiotoxicité chronique de la doxorubicine se produit lorsque la dose cumulative totale administrée du médicament dépasse 550 mg/m<sup>2</sup> de la surface corporelle (31.33.68).

Chez quelques patients, la myocardiopathie induite par la doxorubicine a été identifiée de façon retardée, après 4 à 20 ans de la fin du traitement (33.68).

- **Mécanismes liés aux radicaux libres**

Il est largement admis que le stress oxydatif et la production des radicaux libres sont impliqués dans le mécanisme d'action de la doxorubicine (33.75.184), à la fois en terme d'effet antitumoral et de cardiotoxicité (33.75). Les radicaux libres générés n'affectent pas seulement les cellules malignes, mais ils affectent aussi les tissus sains, comme le cœur, causant ainsi des altérations morphologiques et des dommages fonctionnels (37).

Dans certaines conditions, la chimie des anthracyclines conduit à la génération de radicaux libres. La structure quinonique de la doxorubicine lui permet de se comporter comme accepteur ou donneur d'un électron (31.33.34).

Deux différentes voies de la formation des radicaux libres par la doxorubicine ont été décrites. La première voie implique la formation des radicaux libres semi-quinoniques en présence d'enzymes d'oxydoréduction (33.34.84) telles que le cytochrome P450, la NADPH déshydrogénase (34), et le cytochrome P450 réductase (78) : l'addition d'un électron libre transforme la quinone en radical libre semi-quinonique (33.34.84.119) (figure 13) qui aurait un effet délétère direct sur l'ADN (34). En présence d'oxygène et d'entités radicalaires anthraquinoniques, il se forme des radicaux superoxydes, hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène qui seront également toxiques pour l'ADN (31.34), les lipides et les protéines cellulaires (31).

Dans la deuxième voie, les radicaux libres de la doxorubicine sont produits par un mécanisme non enzymatique qui implique des réactions avec le fer intracellulaire (33.34.84). Le  $Fe^{3+}$  réagit avec la doxorubicine dans une réaction redox. L'atome de fer accepte un électron de la doxorubicine et forme avec ce dernier un radical libre complexe  $Fe^{2+}$ -doxorubicine (33.79.84). Ce radical libre, qui peut réduire l'oxygène au peroxyde d'hydrogène et aux autres espèces actives d'oxygène (33), est très toxique pour des protéines intracellulaires et lipides membranaires divers. Il peut aussi endommager l'ADN par sa capacité de former des adduits avec lui (31).

La toxicité cardiaque de la doxorubicine s'explique notamment par la grande sensibilité du myocarde aux dommages des radicaux libres générés par ce médicament (33.34.75.80).

Cette sensibilité s'explique par :

- Les faibles quantités des systèmes enzymatiques de défense antiradicalaire (catalase, glutathion peroxydase, glutathion transférase...) présents dans le cœur par rapport à celle présents dans d'autres organes comme le foie (75.81).
- Les effets délétères directs des métabolites de la doxorubicine sur ces systèmes enzymatiques de défense (31).
- La très grande affinité de la doxorubicine au *cardiolipine* (33.115), une espèce phospholipidique (31.33) présente principalement dans les membranes mitochondriales du cœur (33.115) conduisant à l'accumulation du médicament dans le tissu cardiaque (80).

- **Mécanisme lié aux altérations de l'ADN**

La partie aglycone de la doxorubicine (figure 13) peut s'insérer entre des paires de bases azotées adjacentes de l'ADN et agir avec la topo-isomérase de type II, une enzyme qui contrôle la structure spatiale de l'ADN, appartenant à la famille des topo-isomérase. Les topo-isomérases sont des enzymes ubiquistes et essentielles à la résolution des problèmes topologiques accompagnant la réplication, la transcription, l'assemblage de la chromatine, la recombinaison et la séparation des chromosomes (34). Il se forme des complexes ternaires ADN-topo-isomérase II-doxorubicine qui fixent les coupures de l'ADN et bloquent ses fonctions, inhibent l'activité de la topo-isomérase II et entraînent la mort cellulaire, expliquant d'une part la toxicité cardiaque de ce médicament (36.37).

- **Mécanisme lié à la surcharge de calcium**

L'insuffisance cardiaque induite par la doxorubicine peut être expliquée par l'augmentation du tau du calcium cardiaque (33). La doxorubicine provoque des altérations dans le métabolisme du calcium comprenant l'augmentation du calcium intracellulaire, l'accumulation du calcium dans le ventricule myocardique et son inclusion dans les mitochondries, des anomalies dans le transport du calcium dans le tissu cardiaque et des altérations dans la fonction de libération du calcium du réticulum sarcoplasmique par des effets sur la  $Ca^{+2}$ -ATP ase et la chaîne de libération du  $Ca^{+2}$  (33). Ces changements sont importants à cause du rôle central du calcium dans le cycle contraction-relaxation du cœur (68).

- **Autres mécanismes**

La toxicité cardiaque de la doxorubicine a été expliquée aussi par la formation de ses métabolites (33.119). Le doxorubicinol, qui est le métabolite majeur de la doxorubicine et qui s'accumule dans le cœur, joue un rôle dans cette toxicité (33).

La doxorubicine est un médicament anticancéreux inducteur d'apoptose (31.33.70.73.77.82) dans quelques tumeurs et dans quelques tissus (31). L'apoptose observée dans le cœur semble être l'un des mécanismes d'action de la toxicité cardiaque de ce médicament (31).

La doxorubicine provoque une augmentation de la formation des prostaglandines, des leukotriennes, des thromboxanes et du PAF (platelet activating factor). Les antagonistes du PAF semble avoir un effet protecteur contre les lésions myocardiques induites par la doxorubicine.

La doxorubicine provoque une arythmie cardiaque par l'augmentation du taux des catécholamines dans le courant circulatoire. Une réduction de la densité des  $\beta$ -adrenocepteurs est clairement trouvée chez des patients ayant une insuffisance cardiaque chronique.

La doxorubicine stimule la libération de l'histamine à partir des mastocytes et à partir des cellules cardiaques isolées du lapin. De même, les radicaux libres peuvent aussi libérer l'histamine à partir des mastocytes. L'administration de l'histamine au lapin cause des lésions histopathologiques similaires à ceux observées après le traitement par la doxorubicine (68).

### III. Les biomarqueurs cardiaques

#### III.1. Généralités

Les tissus subissent un renouvellement permanent, ce qui implique une destruction cellulaire incessante : cette cytolyse libère le contenu des cellules dans le courant circulatoire. Le plasma sanguin contient donc des enzymes cellulaires témoins du renouvellement cellulaire (41). Le niveau de l'activité de certaines enzymes est augmenté dans différentes situations pathologiques suite aux dommages cellulaires (42). La mesure de l'activité de certaines enzymes dans le plasma peut ainsi être d'un grand intérêt diagnostique. Si une enzyme d'origine myocardique peut facilement être dosée dans le plasma, il sera possible de détecter voire même de quantifier une nécrose myocardique (41).

Il existe à l'heure actuelle de nombreux marqueurs biologiques de la souffrance cardiaque permettant un diagnostic rapide et le plus souvent une datation de l'atteinte. Ils sont classés en deux catégories : marqueurs de l'atteinte aiguë (infarctus du myocarde) et marqueurs de l'atteinte chronique (dysfonctionnements ventriculaires et insuffisance cardiaque).

Un "bon" marqueur cardiaque est un paramètre biologique, mesurable dans le sang, qui a une bonne spécificité au tissu myocardique, une bonne sensibilité (présence à taux significatif et suffisant pour être mesurable dans les tissus après lésions), facilement mesurable par une technique rapide d'application, facile à mettre en œuvre, fiable et peu coûteux (43).

#### III.2. Biomarqueurs cardiaques de l'atteinte aiguë

##### III.2.1. LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme dite de transfert d'hydrogène. Son rôle est de catalyser, avec le NADPH comme coenzyme, la réduction du pyruvate en lactate (41.44.47.159), selon la réaction suivante :



La LDH est constituée de quatre sous-unités ou chaînes peptidiques ; il existe deux types de sous-unités H et M donc cinq types (isoenzymes) de LDH :

HHHH (LDH-1), HHHM (LDH-2), HHMM (LDH-3), HMMM (LDH-4) et MMMM (LDH-5) (41.44.198). Chaque chaîne est dotée d'une activité enzymatique.

La LDH se trouve dans le cytoplasme de presque toutes les cellules de l'organisme (44). La répartition de ses différentes formes varie selon les tissus (41.44). Les LDH-1 et LDH-2 prédominent dans le cœur, le rein et les globules rouges alors que les LDH-4 et LDH-5 prédominent dans le foie et le muscle squelettique. La concentration de la LDH totale varie d'un tissu à l'autre, mais les concentrations les plus élevées se retrouvent dans le foie, le cœur, les muscles squelettiques, les reins et les globules rouges (44). Le tissu myocardique est riche en LDH totale et la mesure de cette enzyme dans le plasma ou, mieux le sérum peut être utilisée pour confirmer un diagnostic clinique et électrocardiographique d'infarctus du myocarde. Le muscle cardiaque contenant une forte proportion de LDH-1, Le dosage spécifique de cette forme isoenzymatique pourrait être plus intéressant que le dosage de la LDH totale pour le diagnostic d'infarctus du myocarde (41).

### III.2.2. CPK

La créatine kinase (CK) ou créatine phosphokinase (CPK) est une enzyme qui catalyse la phosphorylation réversible de la créatine en créatine phosphate, selon la réaction suivante (42.45.199-201) :



La phosphocréatine formée constitue la réserve énergétique du muscle (42.45).

La créatine kinase est présente dans de nombreux tissus, notamment les muscles et le cerveau (45). Trois isoenzymes de cette enzyme, avec deux sous-unités appelées M (pour *muscle*) et B (*brain* = cerveau), ont été identifiées. La CPK existe donc sous forme de trois isoenzymes dont la proportion varie d'un tissu à l'autre : la CK-MM (CK-3) se retrouve en proportion élevée dans les muscles squelettiques, la CK-MB (CK-2) qui est l'enzyme prédominant dans le tissu myocardique et la CK-BB (CK-1) d'origine surtout cérébrale.

Le dosage de la créatine kinase totale dans le sérum mais surtout de son isoenzyme cardiospécifique CK-MB est utilisé dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde (41.42.45).

### III.2.3. AST (TGO)

L'aspartate aminotransférase (ASAT) ou aspartate transférase (AST) ou encore transaminase glutamique oxaloacétique (TGO) (GOT en anglais) est une enzyme de la classe des transférases catalysant le transfert réversible d'un groupement amine de l'aspartate à l' $\alpha$ -cétooglutarate pour former de l'oxaloacétate et du glutamate selon la réaction suivante (42.46.171) :



Le phosphate de pyridoxal (pyridoxal-5'-phosphate = vitamine B<sub>6</sub>) agit comme coenzyme (42.46).

Cette enzyme se retrouve dans de nombreux tissus, principalement le cœur, le foie, les muscles squelettiques (46.162), les reins, le pancréas, les poumons et les érythrocytes. Son activité la plus élevée se retrouve au niveau du cœur d'où l'intérêt d'inclure l'ASAT dans le bilan cardiaque pour le diagnostic de l'infarctus du myocarde (46).

## IV. Les flavonoïdes

### IV.1. Généralités

Les composés phénoliques végétaux sont des substances issues du métabolisme secondaire. Ils se synthétisent par les plantes durant leur développement normal (16) et ils forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement (1.6.16.20). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (1.6).

Les composés phénoliques des végétaux sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont principalement issus de deux grandes voies d'aromagenèse :

- La voie la plus courante est celle qui, *via* le shikimate (l'acide shikimique), conduit des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leur très nombreux dérivés : lignanes, lignines, acétophénones, coumarines...
- L'autre voie par de l'acétate et conduit à des poly- $\beta$ -cétosters de longueur variable (les polyacétates) qui engendrent, par cyclisation (réaction de *Claisen* ou condensation aldolique), des composés souvent polycycliques (1).

La classification moderne des composés phénoliques forme deux groupes principaux ; les phénols simples et les acides phénoliques constituent le premier, les polyphénols - qui contiennent au moins deux cycles phénoliques - constituent le deuxième (20).

Les polyphénols (flavonoïdes, tanins hydrolysables et tanins condensés, stilbènes, lignanes, lignines et autres) possèdent un large spectre d'activités biologiques. Ils sont des antioxydants (capables de piéger les radicaux libres) (1.2.12.126.169), des anticancérogènes (20.174), des anti-inflammatoires et des inhibiteurs des enzymes oxydatives et hydrolytiques (2).

La distribution des polyphénols au niveau tissulaire et cellulaire n'est pas uniforme. Les polyphénols insolubles sont les composants des murs cellulaires, alors que les polyphénols solubles sont compartimentés dans les vacuoles cellulaires (16).



Dans les fruits et les légumes, les polyphénols contribuent à leur amertume et astringence, à leur couleur, saveur et leur odeur (16).

Les polyphénols sont tous des composés aromatiques. Ils donnent des absorptions intenses dans la région UV du spectre (6).

#### IV.2. Définition

Les flavonoïdes sont une classe des métabolites secondaires des plantes (11.149.153.182) qui s'impliquent dans plusieurs fonctions importantes (11). Ils sont présents dans tout le règne végétal (1.5) mais leur présence chez les végétaux inférieurs est rare (5). Ils constituent un très large groupe de composés (2.3.175) qui appartient à la famille des polyphénols (2.3.120.138.157).

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (1.5.165). S'ils ne sont pas directement visibles, ils contribuent à la coloration par leur rôle de co-pigments (1.161).

Les flavonoïdes sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles (1.5), et sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (1.5.155.179).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune (1) et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, le diphenylpropane (1.144.145.166.189) (figure 14).

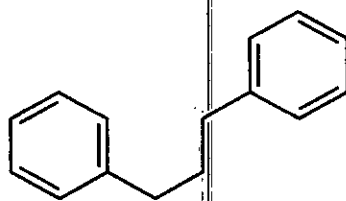


Figure 14. Squelette de base des flavonoïdes (13).

### IV.3. Localisation

Les flavonoïdes sont présents dans les plantes sous forme de mélanges, formés le plus souvent par différentes classes de flavonoïdes (6). Les formes hétérosidiques des flavonoïdes, hydrosolubles, s'accumulent dans les vacuoles et, selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles où se répartissent entre l'épiderme et le mésophile. Dans le cas des fleurs, elles sont concentrées dans les cellules épidermiques.

Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (1).

### IV.4. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau *flavone* ou *2-phénylchromone* (figure 15a) (1.5.6.168) portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (1.5.6) dont ils possèdent tous un nombre de propriétés en commun (6). Le noyau *flavone* est lui-même un dérivé du noyau *flavane* de base (figure 15b).

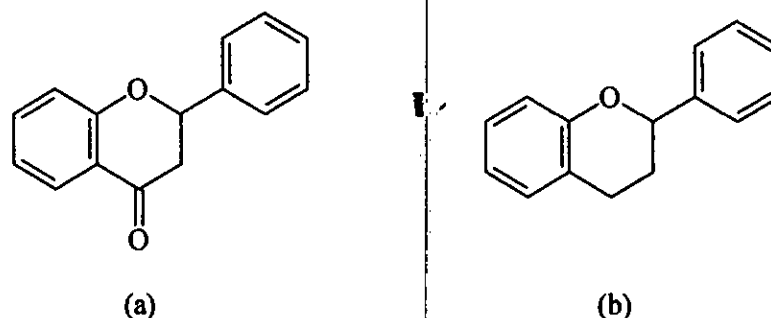
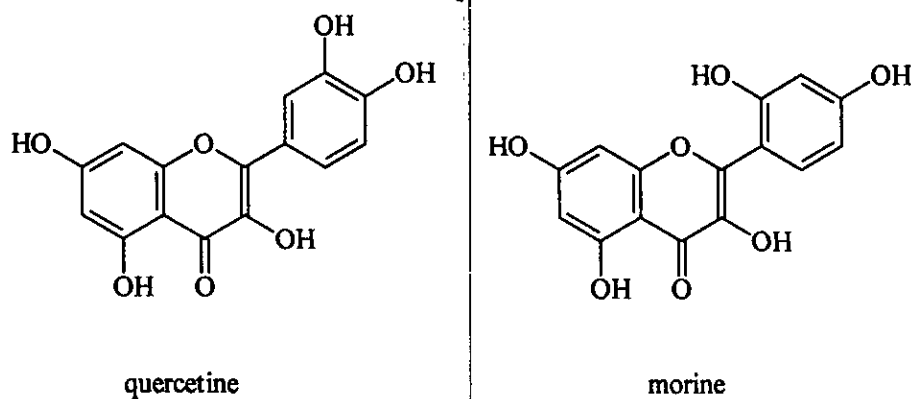


Figure 15. Noyau flavone (a) et noyau flavane (b) (5).

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) (5.7.10). Ils se trouvent sous forme d'aglycones, glycosides et des dérivés méthoxylés (7.160.172) (tableau 3).

Les flavonoïdes glycosidiques ou hétérosidiques (tableau 3) sont des dérivés des génines ou aglycones (figure 16) sur lesquelles un ou plusieurs oses sont greffés (D-glucose, galactose, arabinose, rahmnose...) (5). La partie osidique peut être mono-, di-, ou trisaccharidique (1). La liaison génine-ose existe grâce à la réunion, soit d'un hydroxyle phénolique, soit d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné, soit d'un -CH avec l'hydroxyle hémiacétalique du ou des oses (1.5). Il se résulte alors des O-hétérosides ou des C-hétérosides.

Les positions des substituants hydroxylés et méthoxylés des génines peuvent être très diverses. Il s'obtient ainsi des O-hétérosides et des C-hétérosides ayant chacun des structures qui leur sont propre (5).



**Figure 16.** Structures chimiques de deux flavonoïdes aglycones, la quercetine et la morine (7).

Selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central, les flavonoïdes peuvent être regroupés en une douzaine de classes (1.3.6) :

- 2-phenylbenzopyrilium : les anthocyanes.
- 2-phenylchromones :
  - Flavones, flavonols, et leurs dimères.
  - Flavanones et dihydroflavonols (dérivés 2,3-dihydrogènes).
  - Isoflavones, isoflavanones.
- 2-phenylchromanes :
  - Flavanes.
  - Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols.
- Chalcones et dihydrochalcones (le cycle pyranique est ouvert).
- 2-benzylidènes coumaranones (aurones) (1).

#### IV.4.1. Les anthocyanes

Les anthocyanes constituent le groupe le plus important et le plus abondant des matières colorantes végétales. Ces pigments qui sont hydrosolubles et qui ont des couleurs intenses, sont responsables presque toujours de toutes les couleurs roses, écarlates, rouges, mauves, violettes et bleues dans les pétales, les feuilles, et les fruits des plantes supérieures.

La formule chimique de tous les anthocyanes est basée sur une seule structure aromatique, celle de l'anthocyanidine (figure 17) par addition ou soustraction des groupes hydroxyles ou par méthylation ou par glycosylation (6).

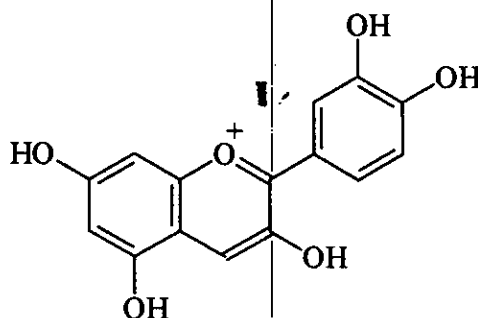


Figure 17. La structure chimique de l'anthocyanidine (13).

#### IV.4.2. Flavones, flavonols

Ils représentent environ 80% des flavonoïdes *stricto sensu* connus. Chez ces molécules, le noyau A est, dans plus de 90% des cas, substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Les hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés, l'un d'entre eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique. Un troisième hydroxyle, libre chez les chalcones, est à l'origine de l'atome d'oxygène du cycle pyranique des autres flavonoïdes et de celui du cycle furanique des aurones. Le noyau B, substitué dans 80% des cas en 4', peut être 3',4'-disubstitué ou, moins fréquemment, 3',4',5'-trisubstitué ; les substituants sont des groupes  $-OH$  ou  $-OCH_3$  (1).

Les flavonoles sont très largement distribués dans les plantes. Comme les anthocyanes, ils se trouvent le plus souvent sous formes glycosidiques.

Parmi les 200 ou 300 flavonols aglycones connus, seulement trois sont habituels : la quercétine, le kaempferol et la myricétine (tableau 3).

Les flavones se trouvent dans les plantes sous forme de combinaisons glycosidiques aussi mais, le rang des différents glycosides chez les flavones est inférieur à celui chez les flavonols. L'apigénine et la luteoline sont les deux flavones les plus connus (tableau 3). Les flavones, contrairement aux flavonols, se trouvent souvent –et de manière remarquable- liés avec une liaison osidique de type carbone-carbone (6).

Les flavonols diffèrent des flavones par le groupe hydroxyle sur le carbone C3 et par la double liaison entre le carbone C2 et le carbone C3 (7).

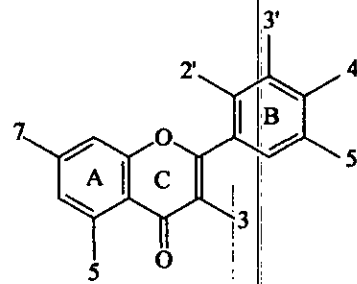
#### **IV.4.3. Flavanones et dihydroflavonols**

Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2,3 et par la présence de centre d'asymétrie (1). Les flavanones sont isomériques avec les chalcones, et les deux classes sont interconvertibles *in vitro* (6). Les variations structurales sont de mêmes natures que celles qui sont décrites pour les flavones et les flavonols. Ces flavonoïdes semblent un peu moins fréquents que leurs homologues insaturés.

#### **IV.4.4. Chalcones – aurones**

Les chalcones dépourvues de l'hétérocycle central, sont caractérisées par la présence d'un chaînon tricarboné, cétonique,  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturé. Si les substituants sur le noyau A sont le plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes, le noyau B est assez fréquemment non substitué. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone (1).

Tableau 3. Nomenclature des sous-classes des flavonoïdes, basée sur la position de leurs substituants (7).



	3	5	7	2'	3'	4'	5'
<b>Flavonols:</b>							
Kaempferol	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Morin	OH	OH	OH	CH	H	OH	H
Rutin	O-R <sup>1</sup>	OH	OH	H	OH	OH	H
Myricetin	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Quercetin	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Quercetin	O-Rh	OH	OH	H	OH	OH	H
Myricitrin	O-Rh	OH	OH	H	OH	OH	OH
Sphaeroside	OH	OH	OH	H	OH	O-Glu	H
Galangin	CH	OH	OH	H	H	H	H
Robinin	O-R <sup>1</sup>	OH	OH	H	H	OH	H
Kaempferide	CH	OH	OH	H	H	O-Me	H
Fisetin	CH	H	OH	H	OH	OH	H
Rhamnetin	CH	OH	O-Me	H	OH	OH	H
<b>Flavonones:</b>							
Hesperitin	H	OH	OH	H	OH	O-Me	H
Naringin	H	OH	O-R	H	H	OH	H
Naringenin	H	OH	OH	H	H	OH	H
Eriodictyol	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Hesperidin	H	OH	O-Me	H	OH	O-Me	H
Pinocembrin	H	OH	OH	H	H	H	H
Likvirin	H	H	OH	H	H	O-Glu H	H
<b>Flavones:</b>							
Rutinolin	H	OH	O-R	H	H	OH	H
Apigenin	H	OH	OH	H	H	OH	H
Tangeretin	H	O-Me	O-Me	H	H	O-Me	H
Flavone	H	H	H	H	H	H	H
Baicalin	H	OH	OH	H	H	H	H
Luteolin	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Chrysin	H	OH	OH	H	H	H	H
Technochrysin	H	OH	O-Me	H	H	H	H
Diosmetin	H	OH	OH	H	OH	O-Me	H
Diosmin	H	OH	O-R <sup>1</sup>	H	OH	O-Me	H
<b>Flavanols:</b>							
Silibinin	OH	OH	OH	H	H	O-L-O-	H
Silymarin	OH	OH	OH	H	H	O-L-O-	H
Taxifolin	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Pinobanksin	OH	OH	OH	H	H	H	H
<b>Flavan-3-ols:</b>							
Catechin	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
<b>Isoflavones:</b>							
Genistein	-	OH	OH	H	H	OH	H
Daidzin	-	H	O-Glu	H	H	OH	H

-O-Me = Méthoxy

-O-Glu = Glucosyl

-O-R<sup>1</sup> = Alkoxy

-O-L-O = Sélane

#### IV.5. Distribution

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les plantes vasculaires mais, quelques classes sont largement plus distribuées que d'autres (6). La distribution de ces composés et des hétérosides de flavones et flavonols qui les accompagnent varie ici nettement en fonction de l'organe (bois, écorce, feuilles) (1). Alors que les flavones et les flavonols sont universels, les isoflavones et les biflavonyls sont localisés seulement dans un petit nombre de familles des plantes(6).

Les O-hétérosides de flavonols dominent chez les fougères qui, pour certaines, élaborent également chalcones ou proanthocyanidols. Chez les gymnospermes, les proanthocyanidols sont remarquablement constant, alors que chez les angiospermes, la diversité structurale des flavonoïdes est maximale. Chez les astéracées, une trentaine de composés flavonoïdiques ont pu être identifiés (1).

#### IV.6. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont synthétisés dans les plantes et ils participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme des catalyseurs du transport des électrons (10).

L'origine des flavonoïdes apparaît bien dans celle des chalcones : condensation d'un « triacétate » (noyau A) et d'un acide cinnamique (noyau B), la cyclisation engendre le cycle pyranique central (1).

La voie biosynthétique des flavonoïdes commence par la condensation, catalysée par la chalcone synthase, de trois molécules de malonyl-COA et une molécule de 4-coumaroyl-COA, donnant naissance à la chalcone naringénique. Dans les conditions physiologiques normales, la chalcone tend à s'isomériser en flavanone, par l'intermédiaire de la chalcone flavanone isomérase. A partir de cela, la voie biosynthétique diverge aux différentes branches qui donnent les différentes classes des flavonoïdes (1.11).

La voie de biosynthèse des flavonoïdes est représentée dans la figure 18.

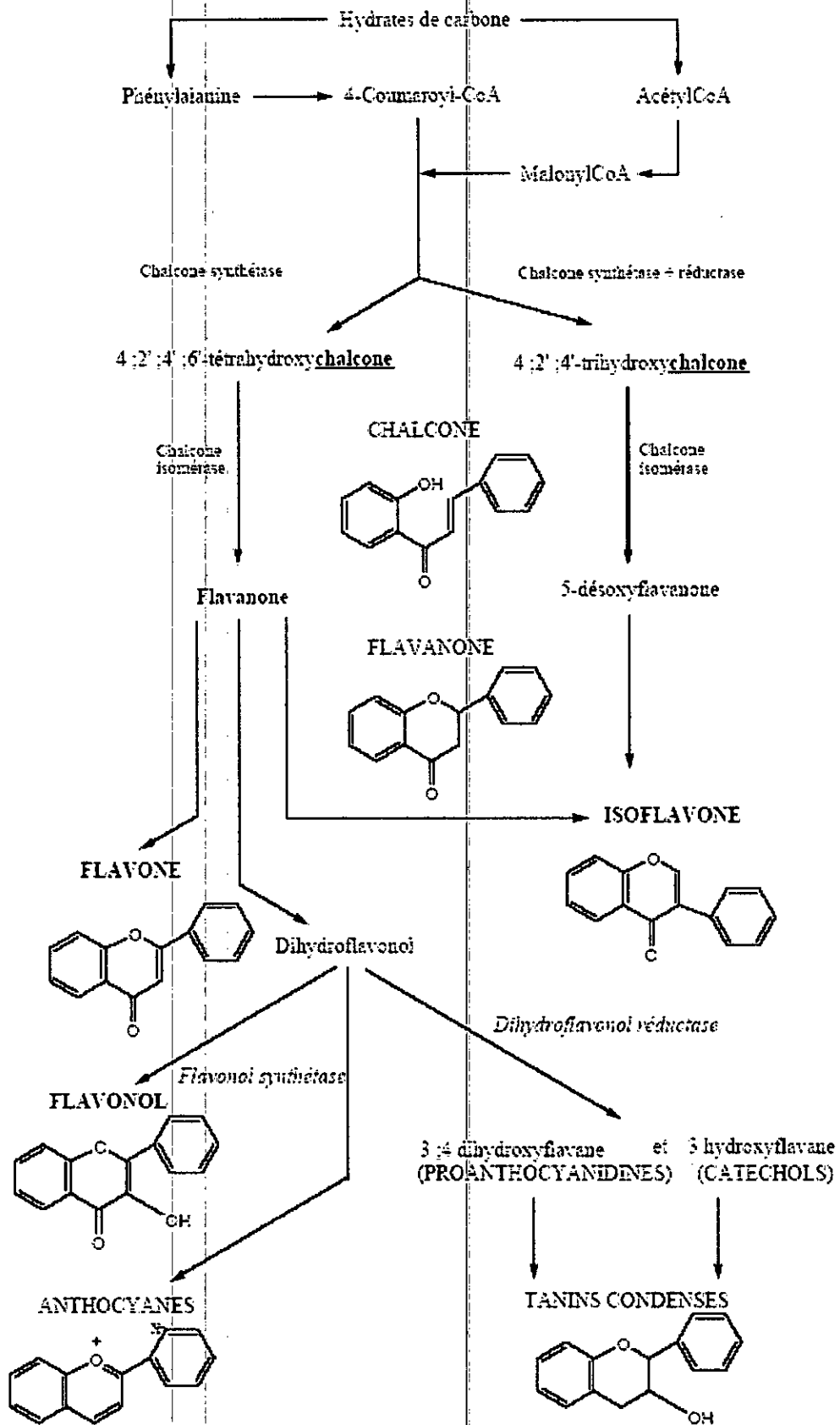


Figure 18. Voie de biosynthèse des flavonoïdes (5).



#### IV.7. Propriétés physico-chimiques, extraction, caractérisation

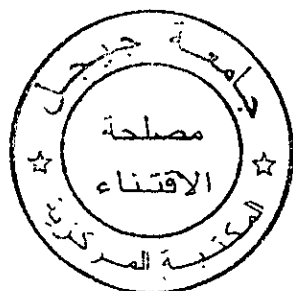
En règle générale, les flavonoïdes hétérosidiques sont hydrosolubles et solubles dans les alcools (1.6), mais un bon nombre d'entre eux ont une hydrosolubilité plutôt faible (rutoside). Les génines sont, pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires ; lorsqu'elles ont au moins un groupe phénolique libre, elles se dissolvent dans les solutions d'hydroxydes alcalins (1).

Les hétérosides peuvent être extraits, le plus souvent à chaud, par des alcools (éthanol, méthanol) additionnés d'eau (20 à 50% selon que la drogue est fraîche ou sèche) (1.6), comme ils peuvent être extraits aussi par l'acétone (1). Les flavonoïdes lipophiles des tissus superficiels des feuilles sont directement extraits par des solvants moyennement polaires comme le dichlorométhane  $Cl_2CH_2$ . Il conviendra ensuite de les séparer des cires et des graisses extraites simultanément (1).

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques, leurs couleurs se changent quand ils se traitent par une base ou par l'ammoniaque. Ils deviennent alors facilement détectables sur les chromatogrammes ou dans les solutions (6).

Plusieurs réactions colorées permettent de mettre en évidence génines et hétérosides dans les extraits bruts, l'étude préliminaire de ces extraits est, classiquement, dominée par une analyse en CCM (1).

Les flavonoïdes possèdent des systèmes aromatiques conjugués, qui donnent des bandes d'absorption intenses dans les deux régions UV et visible des spectres (6).



**Tableau 4.** Les couleurs caractéristiques des flavonoïdes dans le visible et l'UV à 365 nm.

Couleur dans le visible	Couleur dans l'UV à 365 nm	Indication	Référence
-	Bleue	Acides phénols, coumarines	Wagner et al., 1984 (8)
Rien	Mauve foncé	La plupart des isoflavones et des flavanonols	Harborne, 1984 (6)
Jaune très pâle	Marron foncé	La plupart des flavonols glycosidiques ou, la plupart des flavones glycosidiques, biflavonyls et inabituellement des flavones substitués	Harborne, 1984 (6)
Rien	Bleue faible	5-désoxyisoflavones et 7,8-dihydroxyflavanones	Harborne, 1984 (6)
Orange } Rouge } Mauve }	Orange faible, rouge ou mauve	Anthocyanidines 3-glycosylés	Harborne, 1984 (6)

#### IV.8. Propriétés biologiques des flavonoïdes

La principale activité attribuée aux flavonoïdes est une propriété *vitaminique P* (p étant la première lettre du mot perméabilité) (1.5.10) : les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de jus de citron -riche en vitamine C- et de flavonoïdes alors que l'acide ascorbique seul est inefficace (5.10).

Potentiellement veino-actif, les flavonoïdes diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et renforcent leur résistance (1.5.10).

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (1.2.5.7.10.118.160) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T, ils inhibent également l'adhésion et l'agrégation des plaquettes.

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales (5). Théoriquement, les flavonoïdes pourraient exercer des effets antibactériens (1.5.7.10) puisqu'ils sont de puissants inhibiteurs *in vitro* de l'ADN gyrase (5).

Les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des procarcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes (5). Ils peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques (5.152), notamment en stimulant les systèmes de détoxification (5).

Les flavonoïdes peuvent être cardiotoniques et antiulcéreux (7), antimicrobiens (181) antioxydants (121.123.141.143.150.151), anticancéreux (163.164.167.178), antiviraux (146.147.156), antithrombotiques (10.123.139), antiallergiques (1.10.123.177), hépatoprotecteurs (1.7.10.123), cardioprotecteurs (158), neuroprotecteurs (170), antispasmodiques (flavonoïdes du thym et autres lamiacées), hypocholestérolémiants et diurétique (1).

I

#### IV.9. Les flavonoïdes : inhibiteurs enzymatiques

Les flavonoïdes sont connus par leurs rôles inhibiteurs de plusieurs enzymes comme l'aldose réductase (1.7), la lipooxygénase, la cyclooxygénase (1.7.142.176), l'oxyde nitrique synthase (180), l'élastase (1) et la  $\text{Ca}^{+2}$  ATP ase (7).

Les flavonoïdes inhibent :

- L'élévation intracellulaire du  $\text{Ca}^{+2}$  par la réduction de l'activité de la phospholipase-C (7).
- De manière non spécifique de la catéchol-O-méthyltransférase.
- La phosphodiesterase de l'AMP<sub>c</sub> ce qui pourrait expliquer, en outre, leur activité antiagrégante plaquettaire (1).

I

Les flavonols comme la quercétine, la myricétin et la kaempferol inhibent l'activité de l'adénosine deaminase des cellules endothéliales, alors que les flavones sont inactives (7). Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline hydroxylase (1).

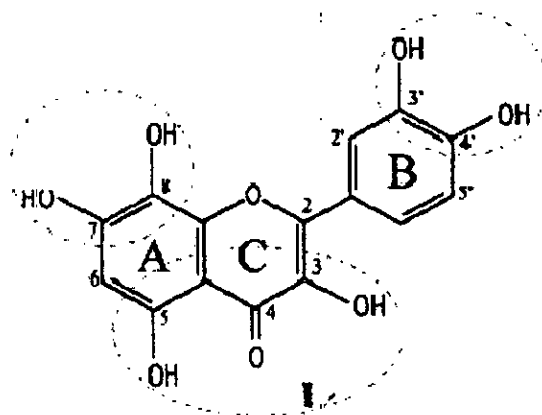
#### IV.10. Les flavonoïdes et les radicaux libres

Les flavonoïdes sont des piègeurs de radicaux libres formés dans diverses circonstances (1-3.12.118.130.135). Ils réagissent avec les radicaux libres empêchant ainsi les dégradations liées à leur intense réactivité au niveau des phospholipides membranaires (1).

L'activité antioxydante des composés phénoliques, y compris les flavonoïdes, est due principalement à leur propriété redox : ils agissent comme agents réducteurs donateurs de l'hydrogène et neutraliseurs de l'oxygène (12). Ils ont également un potentiel de chélation des métaux (12.135.137.142.154). L'effet antagoniste à l'égard de la production de radicaux

libres peut être apprécié expérimentalement *in vitro* par voie chimique (radical DPPH°), et le détecter colorimétriquement (1.2.3.12.140).

Plusieurs flavonoïdes et autres composés phénoliques possèdent des capacités antioxydantes qui sont plus grandes aux celles de la vitamine C et la vitamine E (3). Il semble que la capacité antioxydante d'un flavonoïde dépende de son affinité pour les radicaux libres et donc de sa structure : la présence de deux (-OH) en ortho sur le noyau B, la conjugaison du noyau B au groupe oxo en 4 *via* la double liaison en 2,3 sont des éléments favorables (1.2.3) (figure 19).



**Figure 19.** Les sites structuraux des flavonoïdes ayant une haute activité antiradicalaire (3).

#### IV.11. Mécanisme de l'action antioxydante des flavonoïdes

D'après les études effectuées par Halliwell et, Ishige et ses collaborateurs, les mécanismes de l'action d'un antioxydant peuvent comprendre :

- Le piégeage direct des ROS
- L'inhibition des enzymes responsables de la production de ROS, comme la xanthine oxydase qui est considérée comme une source biologique importante du radical superoxyde
- La chélation des traces métalliques responsables de la production de ROS
- La protection des systèmes de défense antioxydant tel que l'augmentation des taux de glutathion (9.13).

### ➤ Le piégeage direct des ROS

A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (FL-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène :



Où :  $\text{R}^\circ$  représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle.

Le radical flavonoxy ( $\text{FL-O}^\circ$ ) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (figure 20) ou interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet pro-oxydant indésirable des flavonoïdes (13).

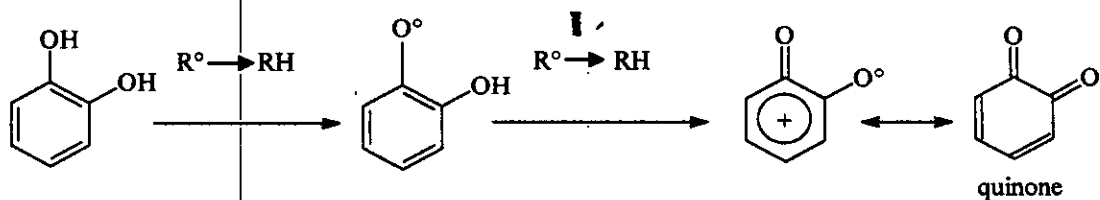
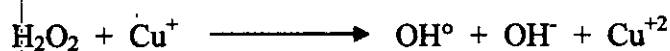
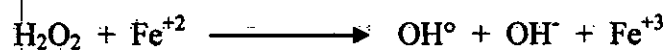


Figure 20. Piégeage des ROS ( $\text{R}^\circ$ ) par les flavonoïdes (13).

### ➤ La chélation des traces métalliques

Les ions du fer ( $\text{Fe}^{+2}$ ) et du cuivre ( $\text{Cu}^{+2}$ ) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (13). Ces ions sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de *Fenton* (13.14) :



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (figure 21).

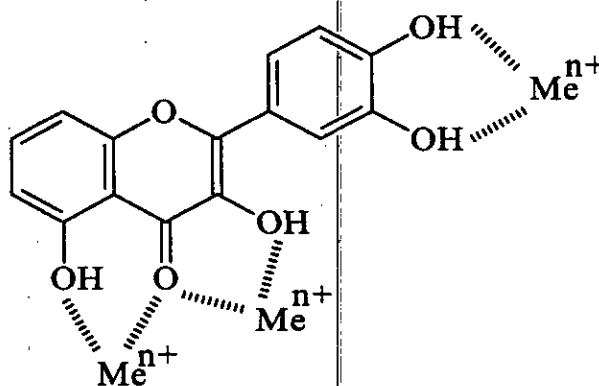


Figure 21. Sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $Me^{n+}$ ) par les flavonoïdes (13).

## V. La *Foeniculum vulgare* Mill.

### V.1. Généralités

La famille "*Apiaceae*" (*Umbelliferae*), qui comporte près de 3000 espèces, est représentée dans la plupart des régions du globe (18.22.27). Elle est très importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 55 genres (19).

Très homogène sur le plan botanique, cette famille est caractérisée par son inflorescence en ombelles d'où l'appellation, ancienne mais encore souvent utilisée, d'ombellifères (18).

Les apiacées sont des plantes vasculaires à fleurs herbacées (19), leurs feuilles sont en générale très divisées et leurs fruits sont des diakènes qui se scindent à maturité en deux méricarpes (18.19).

Le *Foeniculum* (fenouil) est un genre qui appartient à la famille "*Apiaceae*". Les plantes appartenant à ce genre ont l'odeur d'anis (*Pimpinella anisum* L), et leurs fruits sont de 5-7 \* 2-3 mm à bandelettes bien marquées (19).

Le *Foeniculum* est un genre qui comprend une seule espèce, la *Foeniculum vulgare* Mill., duquel quelques variétés ont été obtenues. La *Foeniculum vulgare* Mill. est une espèce très polymorphe dont on distingue 02 sous-espèces :

- Sous-espèce *piperitum* (fenouil d'âne).
- Sous-espèce *vulgare* : présente 03 variétés :
  - Variété *azoricum* (fenouil bulbeux)
  - Variété *dulce* (fenouil doux)
  - Variété *vulgare* (fenouil sauvage)

#### ➤ *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum*

Connue sous le nom de "fenouil d'âne", cette plante est caractérisée par des segments glauques, charnus, généralement courts (63). Elle est plus large que le fenouil sauvage (*Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *vulgare*) et le fenouil doux (*Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *dulce*) et elle possède des longues gaines de feuilles qui enveloppent les tiges fleurissantes.

➤ *Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *azoricum*

Connue sous le nom de "fenouil bulbeux" ou "fenouil de Florence". Cette variété trouve facilement sa place dans les jardins potagers. Les pétioles de ses feuilles sont renflés et fortement imbriqués à la base, formant une "pompe" charnue, ferme, blanche et sucrée, qui se consomme cuite ou crue.

➤ *Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *dulce*

Communément connue sous le nom de "fenouil doux". La forme de cette plante est similaire à celle de la *Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* mais ses fruits son généralement plus larges. Elle peut être distinguée du *Foeniculum vulgare* par le parfum anisé de ses feuilles et de ses fruits. Cette variété se cultive essentiellement pour ses fruits.

➤ *Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *rubrum*

Une variété à feuillage bronze, qui est particulièrement décorative.

## V.2. Description générale

La *Foeniculum vulgare* Mill. (*Foeniculum vulgare* subsp. *vulgare* var. *vulgare*) (figure 22) (tableau 4) communément appelée "fenouil sauvage", "fenouil amer", "fenouil commun" ou "fenouil officinale" (appellation populaire : *besbas* بسباس, nom classique : *choumra* شمرة) est une plante médicinale, aromatique et industrielle, appartient à la famille "Apiaceae" (*Umbellifereae*). Elle est l'une des principales sources d'anéthole, principe des boissons anisées, avec l'anis vert (*Pimpinella anisum* L, *Apiaceae*) et la badiane de chine (*Illicium verum* hook, *Illiciaceae*) (23).

C'est une plante annuelle ou persistante dont toutes ses parties sont fortement aromatiques (parfum anisé) (25). Elle est vivace, à tiges rameuses (26), droites et debouts, vertes grisés ou vertes foncées (25), élevées de 0.8 à 2m, striées, luisantes et pleines (26). Feuilles glauques, divisées en lanière filiformes, munies de gaines au niveau des bifurcations des rameaux du haut ; inflorescence jaune en grande ombelles de 6 à 20 rayons, sans involucre ni involucelles ; corolle très petite à 5 pétales, 5 étamines et 2 styles. Fruits diakènes (27),



oblongs, fuselés, côtelés, à saveur d'anis (26), produisent une huile essentielle aromatique de couleur jaune claire, utilisée dans l'industrie des parfums, des liqueurs et des produits alimentaires (24.28). Pétioles charnus à la base, non renflés et beaucoup moins larges que ceux du fenouil doux (*Foeniculum vulgare* var. *dulce*) ; souche épaisse et ligneuse (26).

Initialement originaire de la méditerranée, la *Foeniculum vulgare* Mill. est cultivé de nos jours en Europe, en Asie, dans certaines parties d'Afrique et en Amérique du sud. Ses fruits se récoltent au début de leur jaunissement (27).

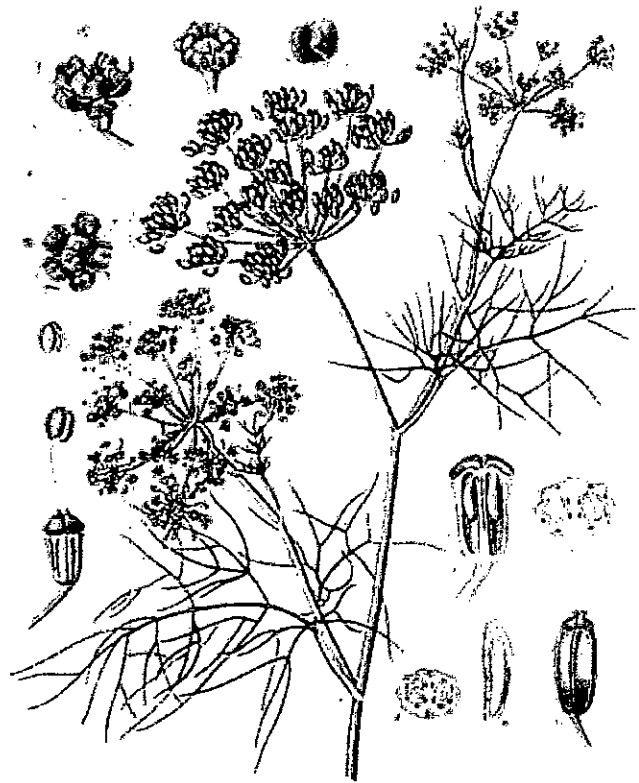


Figure 22. La partie aérienne du fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Tableau 5. Classification de la *Foeniculum vulgare* Mill.

<b>Règne</b>	<i>plantae</i>		plantes
<b>Sous-règne</b>	<i>Tracheobionta</i>		Plantes vasculaires
<b>Superdivision</b>	<i>Spermatophyta</i>		Plantes à graines
<b>Division</b>	<i>Magnoliophyta</i>		Plantes fleurissantes
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>		Dicotylédones
<b>Sous-classe</b>	<i>Rosidae</i>		-
<b>Ordre</b>	<i>Apiales</i>		-
<b>Famille</b>	<i>Apiaceae (Umbelliferae)</i>		Famille des carottes
<b>Genre</b>	<i>Foeniculum</i>		Fenouil
<b>Espèce</b>	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.		Fenouil sauvage

### V.3. Composition chimique

Huile grasse (environ 20%), protéines (environ 20%), flavonoïdes hétérosidiques comportant du quercetol et du kaempferol (27) (3-glycosylés) détectés dans les feuilles et les fruits, flavonoïdes aglycones (kaempferol et quercétine) détectés dans les feuilles (30), acides organiques (acides phénoliques divers : acides quiniques et caféiques), traces de coumarines et de furanocoumarines.

La stabilité de l'huile grasse est considérable en raison de sa teneur en antioxydants naturels.

- **Huile essentielle**

Trans-anéthole (2 - 8.5%), (+)-fenchone (50 - 70 %, min 60%), estragole = méthylchavicol (12 - 18 %, min 15%), autres monoterpènes (2 - 8%, min 5%) :  $\alpha$ -pinène, limonène et cis-ocimène (caractéristique du fenouil amer).

La composition de l'huile essentielle peut varier en fonction de l'origine et du degré de maturation des fruits (27).

#### V.4. Propriétés thérapeutiques

La *Foeniculum vulgare* Mill. était connu et utilisé par les êtres humains depuis l'antiquité (29). Elle était l'une des neuf herbes sacrées des Anglo-saxons. Les soldats romains en mangeaient pour rester en bonne santé et leurs épouses pour ne pas grossir. Les égyptiens, les chinois, les indiens et les grecs l'ont tous utilisés pour s'assurer une longue vie et s'attirer courage, force et puissance (22).

La *Foeniculum vulgare* Mill. est expectorante (22.27), sécrétolytique, antiseptique (27), elle est utilisée comme un remède naturel dans les troubles digestifs légers (22.27.28). C'est la raison pour laquelle elle est encore souvent ajoutée aux laxatifs pour tempérer d'éventuels spasmes fréquemment associés. Les essences de fenouil et les deux variétés de fenouil (*dulce* et *vulgare*) sont des carminatifs spasmolytiques et non des carminatifs stimulants (27).

La *Foeniculum vulgare* Mill. est utilisée comme antispasmodique, stimulant d'appétit, diurétique (22.24), stomachique, anti-inflammatoire, anti-diarrhéique, anticolique et comme un promoteur de lactation (24). Elle est un excellent détoxiquant de l'organisme après un excès de nourriture ou d'alcool (22).

En médecine traditionnelle, la *Foeniculum vulgare* Mill. est utilisée comme galactagoque et par voie externe en lotion oculaire (décoction), lors de fatigue oculaire et de troubles fonctionnels de la vision (27).

# Matériel et méthodes

## Matériel et méthodes

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de recherche de phytochimie et de pharmacologie de l'université de Jijel.

### I. Matériel végétal et méthodes chimiques

#### I.1. Méthodes végétales

##### I.1.1. Récolte et conservation de la plante

La plante (*Foeniculum vulgare* Mill.) utilisée dans cette étude a été cueillie de la région de Ouargla (Algérie) en mars 2003, dans la période de floraison-fructification. Les parties aériennes des plantes cueillies sont laissées sécher, à l'abri de l'humidité, le soleil et la chaleur puis broyées par un mortier. La poudre végétale obtenue est utilisée pour la préparation de l'extrait des flavonoïdes totaux.

##### I.1.2. Préparation de l'extrait des flavonoïdes totaux

Un poids de 900 g de la poudre végétale de la partie aérienne de la plante (tiges, feuilles, fleurs et fruits) est mis en macération dans un mélange méthanol-eau (70 : 30, v/v) pendant 24 heures puis filtré par un papier filtre. Cette étape est réalisée (03) fois avec ce mélange de solvants et une fois avec le même mélange chaud. Le filtrat obtenu est évaporé à moins de 70°C à sec et le résidu d'évaporation est macéré dans l'eau bouillante (150 ml) pendant une nuit puis filtré par un papier filtre. Le filtrat obtenu est mélangée avec le n-butanol (50 ml) : deux (02) phases sont obtenues ; phase organique en haut et phase aqueuse en bas. Les deux phases sont séparées et la phase aqueuse est subit deux (02) autres affrontements par le même solvant (n-butanol) pour extraire le maximum de substances bioactives. La phase organique obtenue est évaporée à sec à 65°C par un mini évaporateur rotatif (Heidolph VV micro, Germany). Le résidu d'évaporation est l'extrait des flavonoïdes totaux, qui est utilisé dans cette étude.

La procédure d'extraction des flavonoïdes totaux est représentée dans la figure (23).

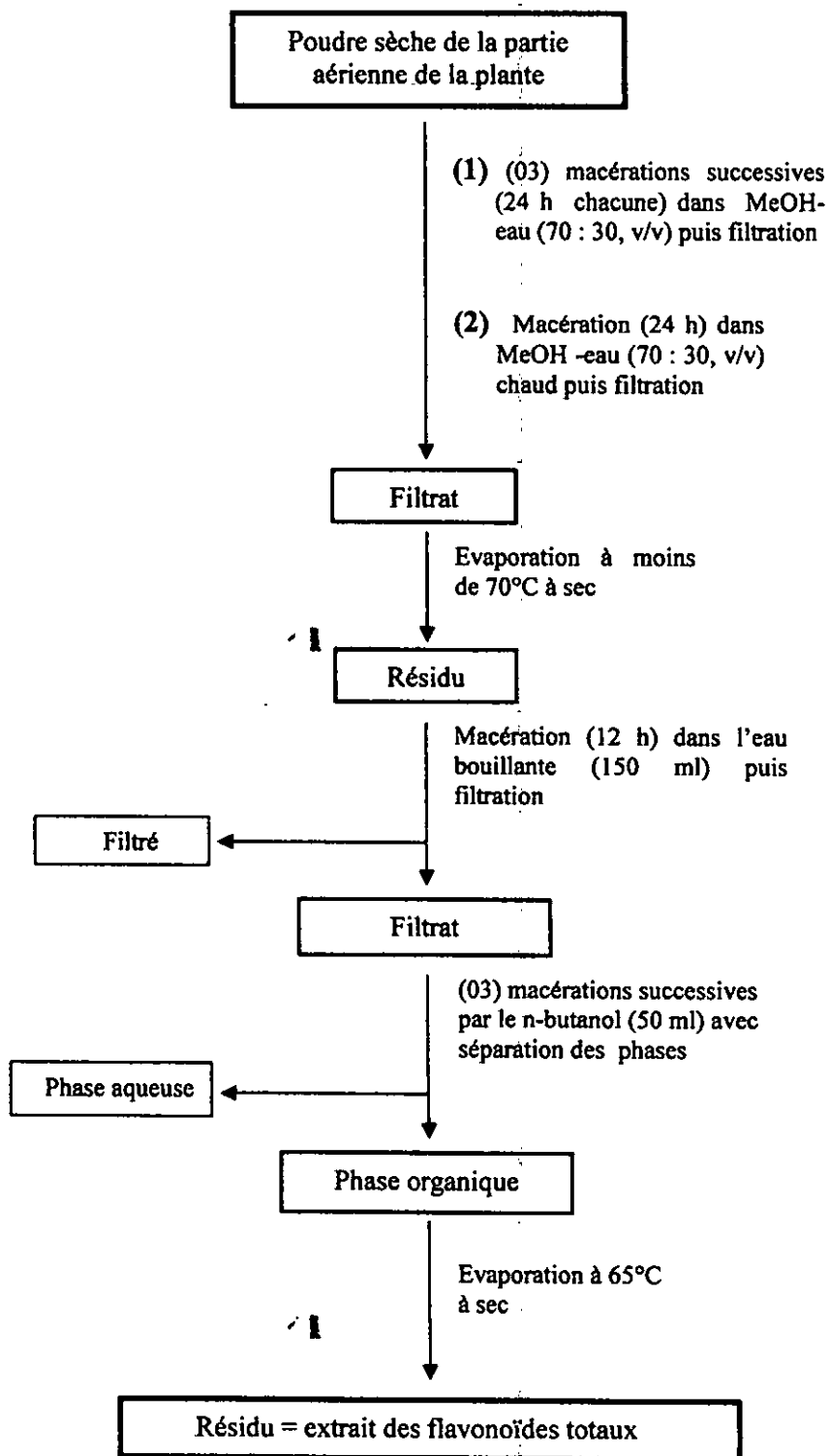


Figure (23). Procédure expérimentale d'extraction des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. selon Harborne, 1975 (65).

## **I.2. Méthodes chimiques**

### **I.2.1. Tests chimiques d'identification des constituants végétaux**

#### **I.2.1.1. Tests pour les flavonoïdes**

- **Test 1**

5 ml d'une solution d'ammoniaque diluée sont ajoutés à une portion du filtrat d'une solution aqueuse de l'extrait. L'observation de la couleur jaune, et sa disparition après l'addition de quelques gouttes de l'acide sulfurique concentré, indiquent la présence des flavonoïdes dans l'extrait (4).

- **Test 2**

Quelques gouttes d'une solution d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$  à 1%) sont ajoutés à une portion du filtrat aqueux de l'extrait. L'observation de la couleur jaune indique la présence des flavonoïdes dans l'extrait (4).

#### **I.2.1.2. Test pour les tanins hydrolysables**

0.250 g de l'extrait sont ajoutés à 10 ml de l'eau distillée dans un tube à essai et porter à ébullition puis filtrer. Quelques gouttes du chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$  à 0.1%) sont ajoutés au filtrat pour l'observation de la couleur verte-marron (tanins catéchiques) ou bleue nuit (tanins galliques), qui sont les signes de la présence des tanins hydrolysables dans l'extrait (4).

#### **I.2.1.3. Test pour les tanins condensés**

Déposition d'un précipité rouge quand un extrait aqueux est porté à ébullition avec l'acide chlorhydrique aqueux ( $\text{HCl}$  à 1%) (4).

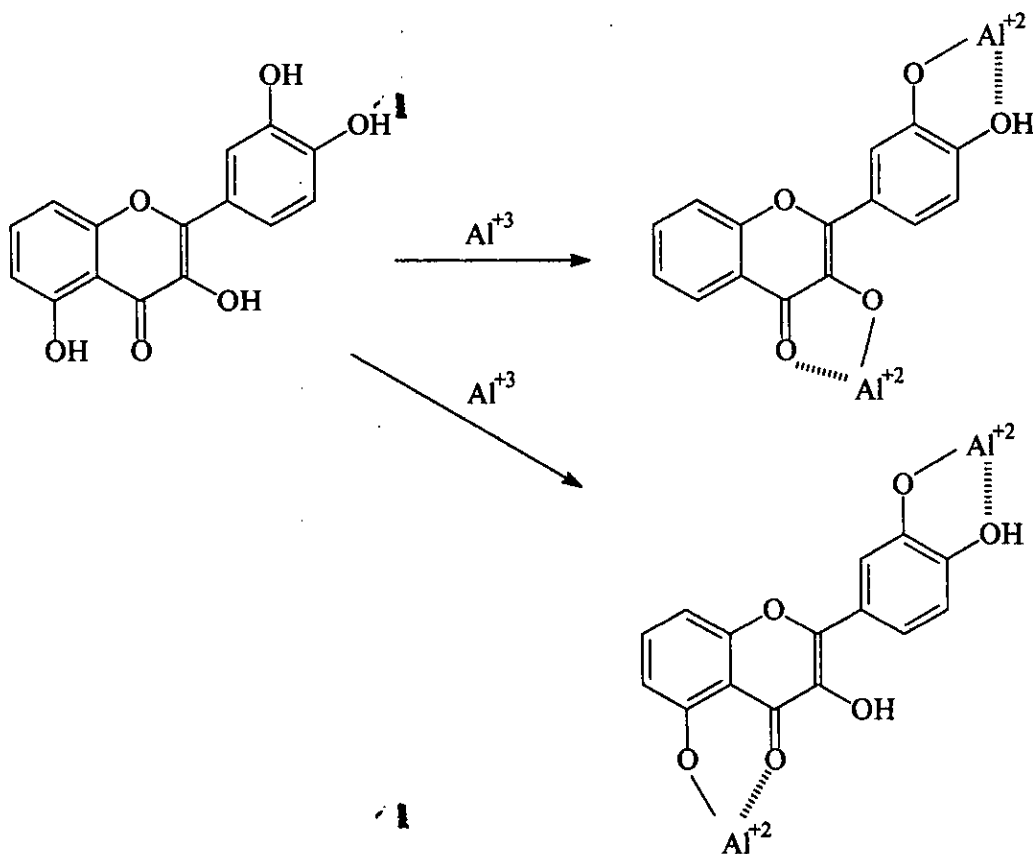
### **I.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux**

Le contenu des flavonoïdes totaux dans l'extrait préparé a été déterminé par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) de Chang et al., 2002 (2).

#### Principe

Le chlorure d'aluminium  $\text{AlCl}_3$  forme des complexes acides stables avec le groupe cétone en position (4) et l'un des deux groupes hydroxyyles sur les positions C3 et C5 chez les

flavones et les flavonols, comme il forme aussi des complexes acides labiles avec les groupes ortho-dihydroxyls dans les deux cycles A et B des flavonoïdes (figure 24). Ces complexes formés sont caractérisés par une longueur d'onde d'absorption moyenne de 415nm.



**Figure 24.** Complexes formés entre les flavonoïdes et l'aluminium ( $\text{Al}^{3+}$ ).

Deux solutions méthanolique de l'extrait (1 et 2 mg/ml) ont été utilisées pour la réalisation de ce dosage.

- 0.250 ml de chaque solution méthanolique de l'extrait est séparément mixé avec 0.75 ml du méthanol, 50  $\mu\text{l}$  du  $\text{AlCl}_3$  aqueux à 10%, 50  $\mu\text{l}$  d'acétate de potassium aqueux (1 M) et 1.4 ml d'eau distillée. Après incubation à température ambiante pendant 30 minutes, les absorbances des mélanges réactionnels sont mesurées à



415 nm avec un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu corporation, UV mini 1240).

Le volume du chlorure d'aluminium aqueux à 10% est substitué par le même volume d'eau distillée dans l'échantillon blanc.

Une courbe de calibration est préparée de la même façon à celle de l'échantillon, par la préparation de différentes solutions méthanoliques de la quercétine allant de la concentration de 25 à 100 µg/ml.

### 1.2.3. Dosage des phénols totaux

La détermination quantitative des phénols totaux dans l'extrait préparé a été réalisée par la méthode de McDonald et al., 2001 (21), basée sur le réactif de Folin-Ciocalteu.

#### Principe

L'ensemble des composés phénoliques de l'extrait est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ).

La coloration bleue produite de l'oxydation possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. Elle est proportionnelle aux taux des composés phénoliques présents dans l'extrait.

- A 0.125 ml d'une solution méthanolique de l'extrait (0.1 mg/ml), un volume de 1.250 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (dix fois dilué par l'eau distillée) est ajouté. Après agitation par un agitateur électrique, un volume de 1 ml de  $Na_2CO_3$  aqueux à 1 M est ensuite ajouté. Le mélange obtenu est agité puis chauffé à 45°C pendant 15 minutes dans un bain Marie. L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à 765 nm, contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant le volume de l'extrait par le même volume de l'eau distillée.

Une courbe de calibration se prépare de la même façon à celle de l'échantillon, par la préparation de différentes concentrations de l'acide gallique dans le méthanol-eau (50 : 50, v/v) allant de 0 à 250 mg/l.

## I.2.4. Etude chromatographique de l'extrait préparé

### I.2.4.1. La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique

#### Principe

La CCM est une méthode analytique rapide qui repose principalement sur des phénomènes d'adsorption. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire (fixée sur une plaque de verre ou une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium) essentiellement par capillarité. Les interactions du composé à analyser avec l'éluant (phase mobile) et l'adsorbant (phase stationnaire) constituent le facteur majeur qui détermine l'efficacité de la séparation. Les substances – déposées sur la phase stationnaire – migrent à une vitesse qui dépend de deux forces : les forces d'attraction de l'adsorbant et les forces d'entraînement de l'éluant qui tendent à les extraire.

Les conditions chromatographiques adoptées pour la réalisation de cette technique sont :

- Phase stationnaire :  
couche de 0.2 mm de gel de silice 60 sur plaque en aluminium avec indicateur de fluorescence UV<sub>254</sub> (ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G / UV<sub>254</sub>, MACHEREY - NAGEL).
- Phase mobile :  
n-butanol – acide acétique – eau (40 : 10 : 50, v/v/v).
- Echantillon :  
l'extrait préparé des flavonoïdes totaux cent (100) fois dilué par un mélange eau – méthanol (50 :50, v/v).

#### Révélation

Après développement, les plaques sont observées :

- Dans le visible et sous la lumière UV à 365 nm.
- Dans le visible après pulvérisation par une solution de AlCl<sub>3</sub> à 1%.

Les couleurs observées sur les plaques dans le visible et sous la lumière UV à 365 nm apportent des informations sur la nature des principaux constituants de l'extrait.

### I.2.4.2. La chromatographie liquide de haute performance (HPLC-DAD) analytique

#### Principe

Elle est la forme moderne de la chromatographie en phase liquide. Elle est une méthode analytique physico-chimique basée sur des différences d'interactions. Les molécules des produits à séparer sont mises en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenue dans un tube appelé colonne chromatographique. Ces interactions provoquent des échanges qui aboutissent à la séparation désirée.

Les conditions chromatographiques adoptées pour la réalisation de cette technique sont :

HPLC Varian, colonne Nucleodur®, Machery-Nagel (250\*4.6 mm) C18 (5µm)

Détecteur UV à barrettes de diode Prostar® Varian.

- Echantillon : l'extrait préparé des flavonoïdes totaux à 10 mg/ml dans le méthanol.
- Phase mobile : un gradient de solvants comme suit :

Temps (min)	Acide trifluoroacétique (TFA) 0.01%	Acétonitrile (ACN)
0	90	10
10	90	10
50	50	50
65	50	50
70	0	100
80	0	100
85	90	10

Les chromatogrammes sont acquis à 205 ; 280 ; 325 et 370 nm et les spectres UV sont enregistrés entre 191.9 et 400 nm.

## II. Les animaux

### II.1. Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur des rats de laboratoire de souche *wistar* provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Les animaux, pesant environ 250 g, sont élevés dans des cages de 08 rats chacun avec la liberté d'accès à l'eau et à la nourriture. L'animalerie est maintenue à une température de 20-25°C et une photopériode de 12/24 heures.

### II.2. Traitement des animaux

Le traitement de tous les animaux a été commencé dans le même jour.

Quatre (04) groupes d'animaux sont utilisés dans cette étude :

- Groupe "TEMOIN" : animaux témoins, recevant 5 ml/kg d'eau distillée par voie orale chaque jour pendant sept (07) jours.
- Groupe "DOXO" : animaux recevant 5 ml/kg d'eau distillée par voie orale chaque jour pendant les 07 jours puis une seule dose de 10 mg/kg de la doxorubicine par voie intraveineuse dans le 9<sup>ème</sup> jour.
- Groupe "EXTRAIT" : animaux recevant une dose quotidienne de 100 mg/kg de l'extrait des flavonoïdes totaux par gavage gastrique pendant les 07 jours.
- Groupe "EXTRAIT-DOXO" : animaux recevant une dose quotidienne de 100 mg/kg de l'extrait des flavonoïdes totaux par gavage gastrique pendant les 07 jours suivie par une seule dose de 10 mg/kg de la doxorubicine par voie intraveineuse dans le 9<sup>ème</sup> jour.

### II.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du sang et du cœur

Les animaux sont sacrifiés après 7 et 14 jours de la fin du traitement. Les cœurs des animaux sacrifiés sont prélevés et utilisés dans le dosage du MDA cytosolique cardiaque et le dosage du glutathion cytosolique cardiaque.

Deux (02) prélèvements du sang ont été effectués à partir du sinus rétro-orbital du rat à l'aide d'un capillaire à bout poli, comme suit :

- Prélèvement 1 :

Dans le 8<sup>ème</sup> jour qui suit les 07 jours du gavage gastrique de l'extrait. Ce prélèvement du sang a concerné tous les rats des quatre groupes.

- Prélèvement 2 :

Après l'injection de la doxorubicine d'un jour. Ce prélèvement sanguin a concerné le groupe 2 (groupe "DOXO") et le groupe 4 (groupe "EXTRAIT-DOXO") qui sont traités par la doxorubicine.

Le sang prélevé de chaque rat est recueilli sur EDTA, puis centrifugé à 4000 rpm pendant 10 minutes. Les surnageants obtenus (plasmas sanguins) sont utilisés dans tous les dosages biochimiques enzymatiques (dosage de la LDH, la CPK et l'AST).

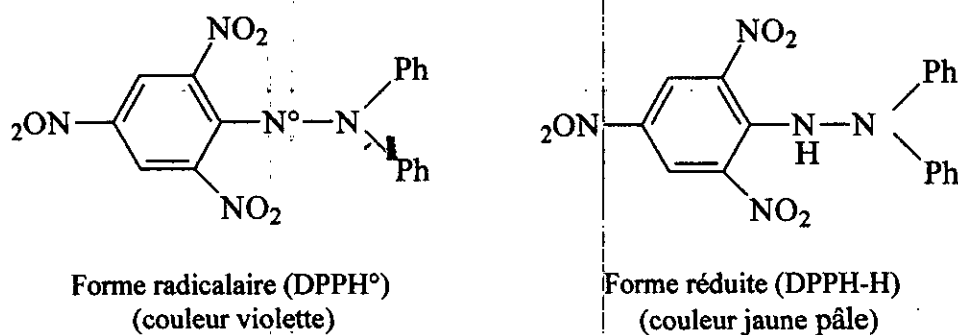
## II.4. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait des flavonoïdes totaux

### II.4.1. Mesure de l'effet *scavenger* du radical libre DPPH° *in vitro*

L'effet *scavenger* ou la capacité de l'extrait de piéger les radicaux libres est déterminée par la méthode colorimétrique de Koleva et al., 2002 (2). Une méthode simple, rapide et peu coûteuse a la capacité de mesurer, *in vitro*, l'activité antioxydante des composés par l'utilisation du radical libre stable DPPH° : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

#### Principe

Quand une solution de DPPH° est mixée avec une autre solution d'une substance qui peut donner un atome d'hydrogène, le radical libre DPPH° (de couleur violette) est réduit (DPPH-H) (de couleur jaune pâle) (figure 25). Ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance du radical DPPH° à 515nm.



**Figure 25.** Les deux formes radicalaire et réduite du DPPH (3).

- A partir d'une solution méthanolique de  $C_1=1$  mg/ml de l'extrait, les dilutions suivantes ont été préparées :

$C_2 = 0.5$  mg/ml,

$C_3 = 0.250$  mg/ml,

$C_4 = 0.125$  mg/ml,

$C_5 = 0.1$  mg/ml

A chaque volume de 1.5 ml de la solution méthanolique du DPPH° à 100  $\mu$ M, un volume de 15  $\mu$ l de chaque concentration préparée de l'extrait est ajouté. Après agitation et incubation à la température ambiante pendant 15 minutes, les densités optiques des mélanges réactionnels sont mesurées à 517 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions par le méthanol.

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

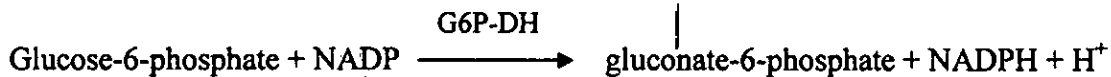
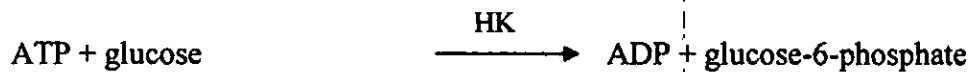
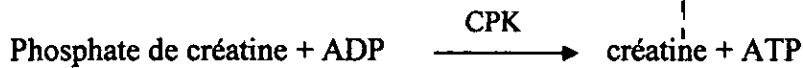
## II.4.2. L'évaluation biochimique in vivo (activité de LDH, la CPK et la TGO)

### II.4.2.1. Activité de la CPK (selon Spinreact)

#### Principe

La créatine phosphokinase catalyse la phosphorylation de l'ADP par le phosphate de

créatine pour donner la créatine et l'ATP. La concentration catalytique est déterminée grâce aux réactions couplées de l'héxokinase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase à partir de la vitesse de formation du NADPH mesurée à 340 nm (annexe).



#### II.4.2.2. Activité de l'AST (selon Spinreact)

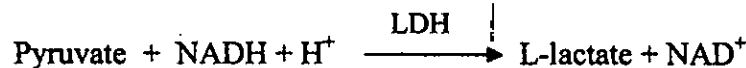
##### Principe

La transaminase glutamique oxaloacétique catalyse le transfert du groupement amino de l'aspartate au 2-oxoglutarate en formant l'oxaloacétate et le glutamate. L'activité de la transaminase est proportionnelle au taux de l'oxalate formé dans une période de temps déterminée et elle est mesurée par une réaction avec le 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) dans une solution alcaline (annexe).

#### II.4.2.3. Activité de LDH (selon Spinreact)

##### Principe

La lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la réduction de la pyruvate par la NADH en lactate selon la réaction suivante :



Le taux de diminution de la concentration du NADPH, mesuré photométriquement à 340 nm, est proportionnel à la concentration catalytique de LDH présente dans l'échantillon (annexe).

### II.4.3. Evaluation de l'activité antilipoperoxydative

- Dosage du MDA cytosolique cardiaque *in vivo*

Le MDA (figure 26) est l'un des produits terminaux formés lors de la peroxydation lipidique qui résulte de la coupure, médiée par les radicaux libres, des acides gras polyinsaturés possédant au moins trois doubles liaisons. Le MDA réagit avec deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) dans un milieu acide (pH 2 à 3) et à chaud (100°C) pour donner un composé coloré en rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

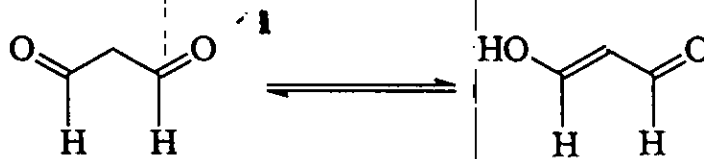


Figure 26. Structure chimique du malondialdéhyde (MDA) (56).

Le dosage du MDA cytosolique cardiaque est effectué par la méthode de Ohkawa et al., 1979 (60) après 07 jours de la fin du traitement des animaux.

- 0.5g de cœur est plongé dans 1.5ml d'une solution de KCl à 1.15% puis broyé par un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 steered firm, New jersey USA). A 0.5 ml de l'homogénat, 0.5ml d'acide trichloracétique à 20% et 1ml d'acide thiobarbiturique (TBA) à 1% ont été ajoutés. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 4ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec l'eau distillée.

Le taux du MDA est déduit à partir d'une gamme étalon, préparée dans les mêmes conditions, en n mole/l par l'utilisation d'une solution du tétraétoxypropane (TEP) qui donne après leur hydrolyse du MDA.



#### II.4.4. Dosage du glutathion (GSH) cytosolique cardiaque *in vivo*

Le dosage du glutathion (GSH) cytosolique cardiaque est effectué par la méthode colorimétrique d'Ellman et al., 1959 (61), un peu modifiée, par le réactif de DTNB (acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque) (figure 27) après 14 jours de la fin du traitement des animaux.

Le principe de la réaction consiste à l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide 2-nitro 5-mercapto benzoïque thionitrobenzoïque lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :

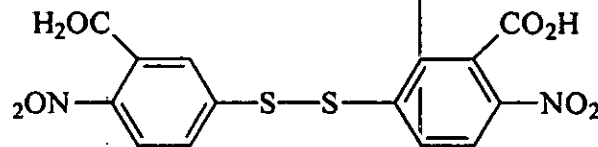
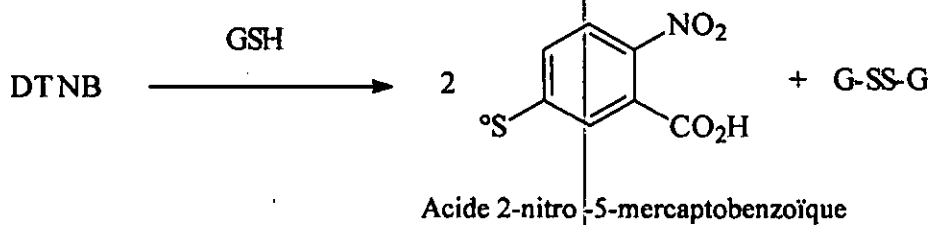


Figure 27. Structure chimique du DTNB.

- 0.3 g de cœur est coupé et homogénéisé avec 03 volumes (0.9 ml) de l'acide trichloracétique (TCA) à 1% à l'aide d'un broyeur de DOUNCE, puis le mélange est centrifugé à 2000 rpm pendant 15 minutes. Un volume de 50  $\mu\text{l}$  du surnageant obtenu est dilué dans 10 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH = 8) puis 20  $\mu\text{l}$  du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 15 minutes d'incubation, la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA à 1%. Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion, préparée dans les mêmes conditions que le dosage, en m mole/l.

### III. Traitement statistique

Les résultats quantitatifs obtenus sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type dans toutes les représentations numériques et graphiques. Ces résultats sont traités statistiquement par le test *t* de Student avec un seuil de signification supérieur à 95 % ( $p < 0.05$ ), tel que :

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

( $p < 0.05$ ) : désigne un effet significatif.

( $p < 0.01$ ) : désigne un effet très significatif.

( $p < 0.001$ ) : désigne un effet hautement significatif.

# Résultats et interprétations

## Résultats et interprétations

### I. Etude phytochimique

#### I.1. Tests chimiques d'identification des constituants

Les résultats des tests chimiques réalisés pour l'identification de quelques constituants végétaux sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Test pour		Résultat
Les flavonoïdes	Test 1	+
	Test 2	+
Les tanins hydrolysables		+
Les tanins condensés		-

(+) = présence du constituant dans l'extrait.

(-) = absence du constituant dans l'extrait.

Les deux tests chimiques d'identification des flavonoïdes et le test chimique d'identification des tanins hydrolysable, étaient tous positifs. Cependant, le test chimique d'identification des tanins condensés était négatif.

Ces tests chimiques d'identification montrent que notre extrait préparé des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. contient des flavonoïdes et des tanins hydrolysables et il ne contient pas des tanins condensés.

#### I.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux réalisé par la méthode spectrophotométrique de Chang et al., 2002 (2) a donné les résultats suivants :

L'équation de la courbe de calibration préparée par la quercétine est :

$$y = 0.006 x + 0.025, \quad r^2 = 0.9517$$

y = l'absorbance mesurée par le spectrophotomètre

x = la concentration de la solution méthanolique de la quercétine ( $\mu\text{g/ml}$ )

La concentration des flavonoïdes totaux dans l'extrait préparé, exprimée comme quercétine équivalent (QE), est calculée par l'équation précédente comme suit :

$$C = (y - 0.025)/0.06 \quad (\mu\text{g/ml})$$

y = l'absorbance de la solution analysée de l'extrait, mesurée par le spectrophotomètre.

C = la concentration recherchée des flavonoïdes totaux dans la solution analysée de l'extrait, exprimée comme (QE) en ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Les taux des flavonoïdes totaux calculés (en mg/g extrait) dans l'extrait préparé, exprimés comme (QE), sont regroupés dans le tableau suivant :

		Solution méthanolique de l'extrait	
		1 mg/ml	2 mg/ml
Taux des flavonoïdes totaux (mg QE/g extrait)	Essai 1	12.5	14.58
	Essai 2	14.66	-

Le taux moyen des flavonoïdes totaux dans l'extrait préparé des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill., exprimée comme quercétine équivalent, est :

$$C = 13.91 \pm 1.22 \text{ mg QE/g extrait}$$

### I.3. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux dans l'extrait préparé, réalisé par la méthode spectrophotométrique de McDonald et al., 2001 (21) a donné les résultats suivants :

L'équation de la courbe de calibration préparée par l'acide gallique est :

$$y = 0.0051 x - 0.0335, r^2 = 0.9974 \quad (21)$$

y = l'absorbance mesurée par le spectrophotomètre

x = la concentration de la solution de l'acide gallique (mg/l) dans le méthanol-eau (50 : 50, v/v)

La concentration des phénols totaux dans l'extrait, exprimée comme acide gallique équivalent (AGE), est calculée par l'équation précédente comme suit :

$$C = (y + 0.0335) / 0.0051 \text{ (mg/l)}$$

y = l'absorbance de la solution analysée de l'extrait, mesurée par le spectrophotomètre.

C = la concentration recherchée des phénols totaux dans la solution analysée de l'extrait, exprimée comme (AGE) en (mg/l).

Les taux des phénols totaux calculés (en mg/g extrait) dans l'extrait préparé, exprimés comme (AGE) sont regroupés dans le tableau suivant :

		Solution méthanolique de l'extrait	
		0.1 mg/ml	
<b>Taux des phénols totaux</b> (mg AGE/g extrait)	Essai 1		295.1
	Essai 2		308.8
	Essai 3		308.8

Le taux moyen des phénols totaux dans l'extrait préparé des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill., Exprimée comme acide gallique équivalent (AGE), est :

$$C = 304.23 \pm 7.9 \text{ mg AGE/g extrait}$$

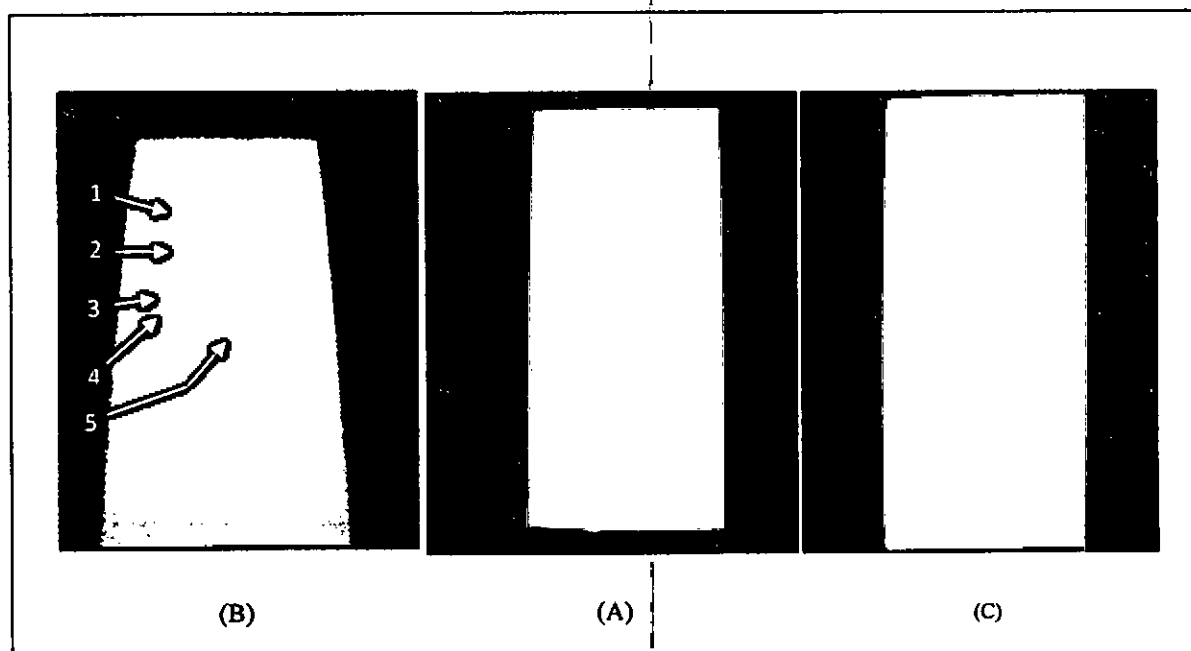
#### I.4. Etude chromatographique de l'extrait préparé

##### I.4.1. La chromatographie sur couche mince (CCM) analytique

La chromatographie sur couche mince analytique effectuée sur l'extrait avec un système solvant composé de n-butanol-eau-acide acétique (40 : 10 : 50, v/v/v) et une phase stationnaire de gel de silice, a donné les résultats représentés dans le tableau 5 et la figure 28.

**Tableau 6.** Les principales couleurs observées sur le chromatogramme CCM de l'extrait dans le visible et l'UV à 365 nm, avec une phase mobile de n-butanol-eau-acide acétique (40 : 10 : 50, v/v/v) et une phase stationnaire de gel de silice.

	Couleur dans la lumière visible	Couleur dans la lumière UV à 365 nm
<b>Taches</b>	Jaune orangé très pâle	Bleue (1)
	Rien	Mauve foncé (2)
		Marron foncé (3)
		Bleue faible (4)
	Jaune orangé pâle	Orange faible (5)



**Figure 28.** Le chromatogramme CCM de l'extrait, développé dans une phase mobile de n-butanol-eau-acide acétique (40 : 10 : 50, v/v/v) et une phase stationnaire de gel de silice.

- (A) Dans le visible après développement
- (B) Dans l'UV à 365 nm après développement
- (C) Dans le visible après pulvérisation par AlCl<sub>3</sub> à 1%

Selon Wagner (tableau 4, page 46), la tache bleue qui a apparue dans le chromatogramme sous la lumière UV à 365 nm (figure 28 tache 1) est probablement, en faveur des acides phénols et des coumarines alors que celle qui a apparue dans la même lumière d'une couleur bleue faible (figure 28 tache 4) et qui n'a présentée aucune couleur dans le visible est, très probablement, en faveur de composés flavonoïdiques de 5-désoxyisoflavones et 7,8-dihydroxyflavanones, selon Harborne (tableau 4, page 46).

Une tache a apparue dans deux couleurs : jaune orangé pâle et orange faible (figure 28 tache 5), la première couleur dans le visible et la deuxième dans l'UV à 365 nm. D'après Harborne (tableau 4, page 46), cette tache correspond de manière très probable, aux anthocyanidines 3-glycosylés.

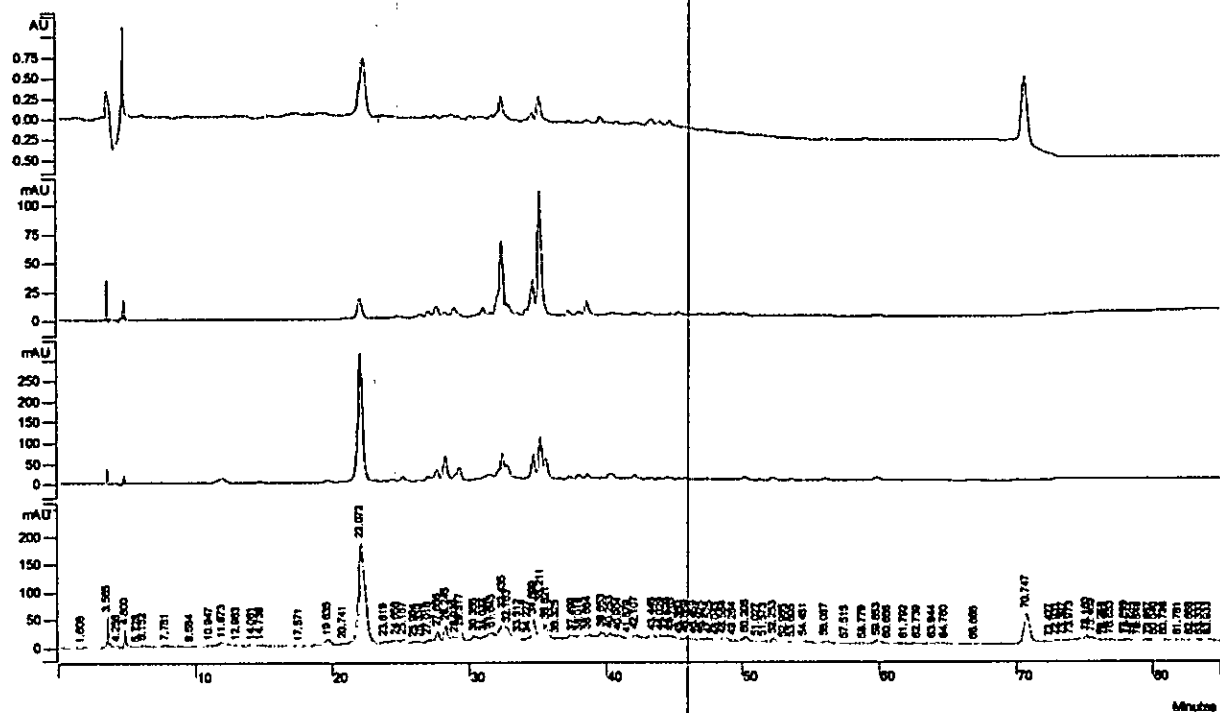
Selon Harborne (tableau 4, page 46) :

- La tache mauve foncé qui a apparue dans le chromatogramme sous UV à 365 nm (figure 28 tache 2) est probablement, en faveur de la grande partie des isoflavones et des flavanonols.
- La tache marron foncé qui a apparue dans le chromatogramme sous UV à 365 nm (figure 28 tache 3) est probablement, en faveur de la grande partie de flavonols glycosidiques ou de la grande partie de flavones glycosidiques, biflavonyls et, inabituellement, des flavones substitués.

#### **I.4.2. La chromatographie liquide de haute performance (HPLC-DAD) analytique**

L'analyse chromatographique de l'extrait préparé des flavonoïdes totaux par l'HPLC-DAD analytique (HPLC-diode array detector = HPLC avec détecteur à barrettes de diodes), dans une colonne de C18 (5µm) (250 \* 4.6 mm) et une phase mobile d'un gradient de solvants composé d'acide trifluoroacétique (TFA) (0.01%) et d'acétonitrile (ACN), a donné les chromatogrammes et les spectres UV représentés dans la figure 29 et la figure 30.





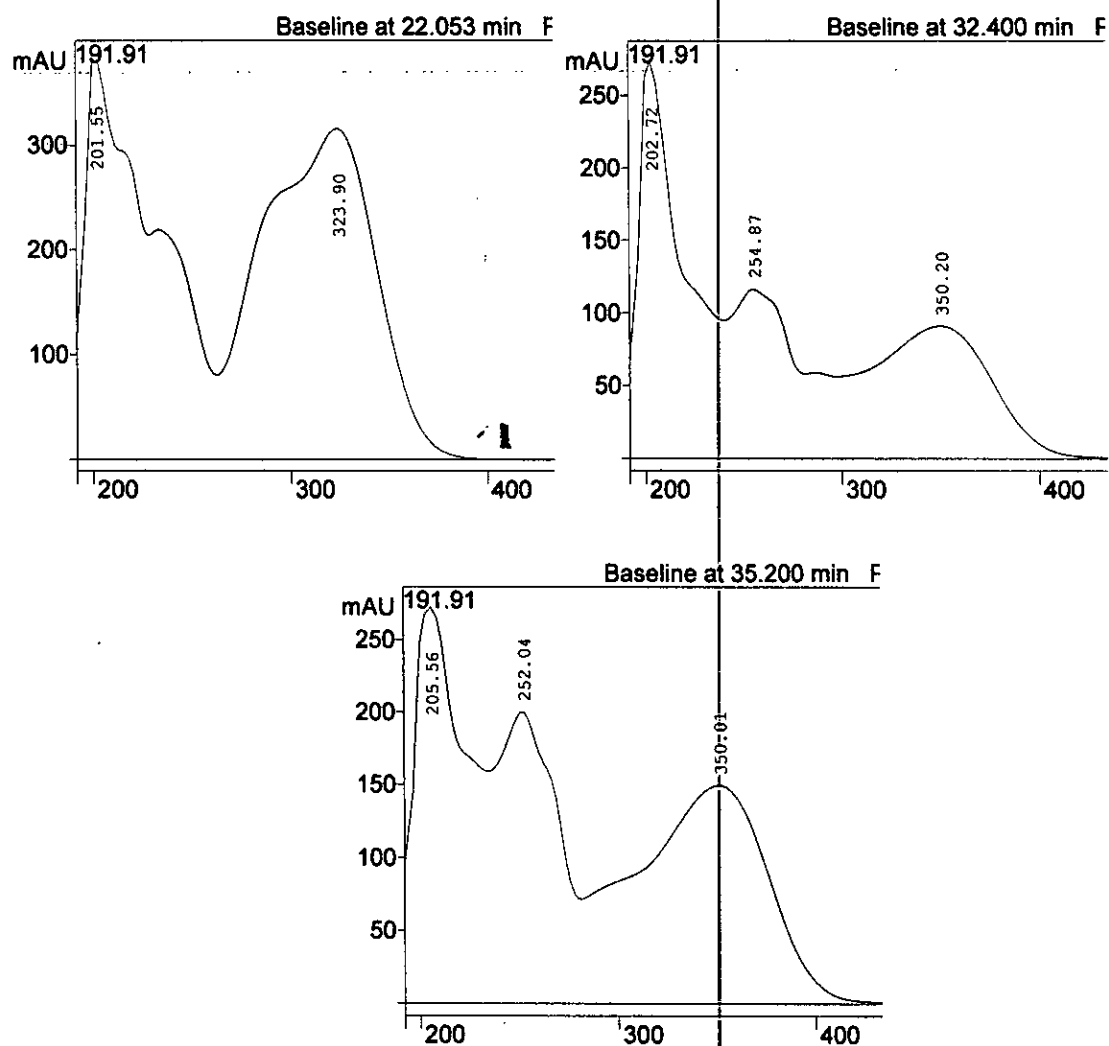


Figure 30. Spectres UV d'un profil HPLC-DAD analytique de l'extrait.

Le composant ayant le temps de rétention  $t = 22.05$  min et le spectre UV max à 323.9 nm (figures 29 et 30) est très probablement en faveur des dérivés de l'acide caféique.

Le composant ayant le temps de rétention  $t = 32.4$  min et les trois bandes d'absorption dans le spectre UV (202.7 ; 254.8 et 350.2 nm) (figures 29 et 30) est très probablement en faveur de flavonoïdes glycosylés de type flavonols substitués en position 3. Ces derniers sont caractérisés par deux bandes d'absorption dans l'UV en milieu méthanolique : bande I entre 330-360 nm et bande II entre 250-280 nm.

Le composant ayant le temps de rétention  $t = 35.2$  min et présentant trois bandes d'absorption dans le spectre UV (205.5 ; 252.04 et 350.81 nm) (figures 29 et 30) est très probablement en faveur de flavonoïdes glycosylés aussi de type flavonols substitués en position 3.

## II. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait

### II.1. Mesure de l'effet *scavenger* du radical libre DPPH° *in vitro*

En vue d'évaluer, *in vitro*, le pouvoir antioxydant de l'extrait préparé des flavonoïdes totaux, nous avons mesurés la capacité de cet extrait à réduire le radical libre stable DPPH° et comparer cette capacité à celle d'un flavonoïde commercial de référence qui est la quercétine.

Les variations des deux effets *scavenger*, de l'extrait et de la quercétine, du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations massiques utilisées sont regroupées dans le tableau 7 et la figure 31.

Tableau 7. Variations des deux effets *scavenger*, de l'extrait et de la quercétine, du radical libre DPPH° en fonction des différentes concentrations massiques utilisées.

		Solutions méthanoliques (mg/ml)				
		1	0.5	0.25	0.125	0.1
% de réduction du DPPH°	EXTRAIT	27.5 ±5.32	13.4 ±1.38	7.72 ±0.43	3.44 ±0.06	3.35 ±0.37
	Quercétine	85.88 ±0.93	84.81 ±0.84	63.58 ±7.11	30.5 ±3.7	27.82 ±2.66

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type.

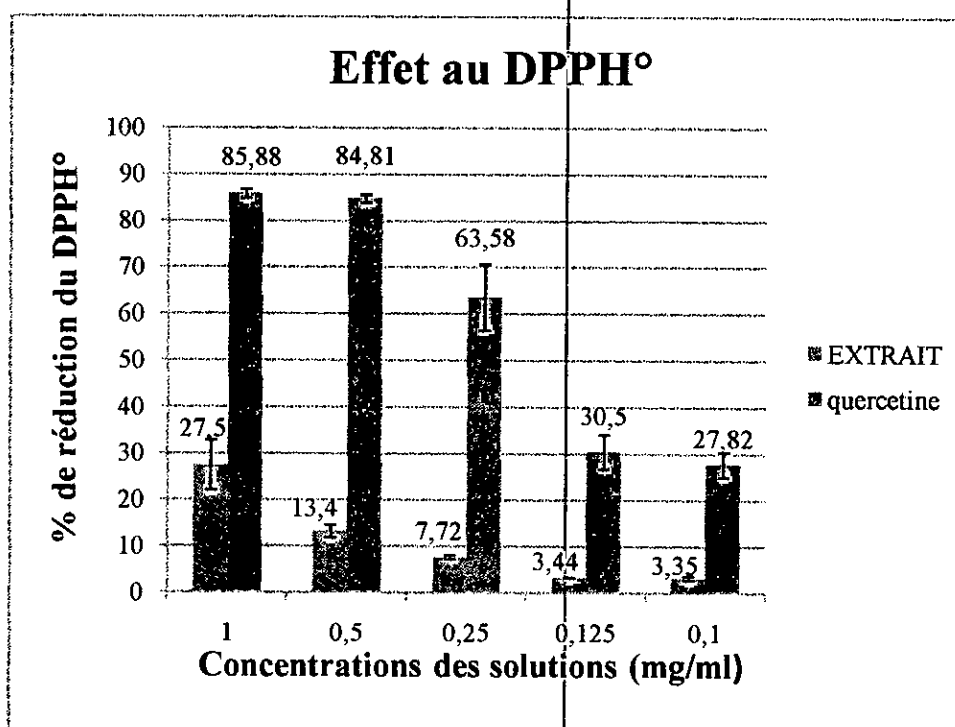


Figure 31. Variations de l'effet *scavenger* du radical libre DPPH° de l'extrait des flavonoïdes totaux et de la quercetine à différentes concentrations massiques.

Ces résultats obtenus montrent bien que notre extrait préparé des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. possède un effet piègeur du radical libre DPPH° et que Cet extrait est actif pour toutes les concentrations et les conditions opératoires utilisées dans ce test.

L'extrait des flavonoïdes totaux ainsi que la quercetine ont un effet piègeur maximal à la plus grande concentration utilisée qui est 1 mg/ml (27,5 ± 5,32% pour l'extrait contre 85,88 ± 0,93% pour la quercetine). A cette concentration, l'effet piègeur de l'extrait est presque quatre (4) fois moins faible à celui de la quercetine, et il est pratiquement égal à celui de ce flavonoïde pour une concentration dix (10) fois moins faible qui est 0,1 mg/ml (27,5 ± 5,32% pour l'extrait à 1 mg/ml contre 27,82 ± 2,66% pour la quercetine à 0,1 mg/ml).

A la concentration de 0,5 mg/ml, l'effet *scavenger* de l'extrait (13,4 ± 1,38%) est presque six (6) fois moins faible à celui mesuré chez la quercetine (84,81 ± 0,84%). Pour les deux concentrations 0,25 mg/ml et 0,125 mg/ml, l'effet *scavenger* de l'extrait est presque huit (8) fois plus faible à celui enregistré chez la quercetine (7,72 ± 0,43% chez l'extrait contre 63,58

$\pm 7.11\%$  chez la quercétine, pour  $C = 0.25$  mg/ml, et  $13.4 \pm 1.38\%$  chez l'extrait contre  $84.81 \pm 0.84\%$  chez la quercétine, pour  $C = 0.5$  mg/ml), et il est presque neuf (9) fois plus faible aussi à celui de ce flavonoïde, à la concentration de  $0.1$  mg/ml ( $3.35 \pm 0.37\%$  pour l'extrait contre  $27.82 \pm 2.66\%$  pour la quercétine).

## II.2. L'évaluation biochimique *in vivo* (activité de la LDH, la CPK et l'AST)

Le dosage plasmatique des enzymes (LDH, CPK, et AST) effectué dans la première prise du sang (prélèvement 1) sur tous les groupes d'animaux, après un (01) jour de la fin du gavage gastrique de l'extrait à une dose quotidienne de  $100$  mg/kg pendant sept (7) jours, a donné les résultats regroupés dans le tableau 8.

**Tableau 8.** Les Activités enzymatiques plasmatiques de la LDH, CPK et la AST mesurées dans le premier prélèvement du sang effectué après un (01) jour de la fin du gavage gastrique de l'extrait à une dose quotidienne de  $100$  mg/kg pendant 7 jours.

	Activité enzymatique (U/L)	
	Rats témoins	Rats traités par l'extrait
LDH	$242.25 \pm 25.6$	$290.7 \pm 33.56$ (ns)
CPK	$137.61 \pm 26.6$	$143.01 \pm 22.7$ (ns)
AST	$32.39 \pm 2.24$	$28.83 \pm 2.84$ (ns)

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ).

D'après ces résultats, on constate que :

- L'activité enzymatique de la LDH est faiblement augmentée chez les rats traités par l'extrait par rapport aux témoins non traités ( $290.7 \pm 33.56$  U/L chez les rats traités contre  $242.25 \pm 25.6$  U/L chez les témoins) mais, cette augmentation est statistiquement non significative ( $p > 0.05$ ).

- L'activité enzymatique de la CPK est faiblement augmentée aussi chez les rats traités par l'extrait par rapport aux rats témoins non traités (143.01 ±22.7 U/L chez les traités contre 137.61 ±26.6 U/L chez les témoins) mais, de façon statistiquement non significative ( $p > 0.05$ ).
- L'activité enzymatique de l'AST est faiblement diminuée (28.83 ±2.84 U/L chez les rats traités contre 32.39 ±2.24 U/L chez les rats témoins non traités) mais, cette diminution est statistiquement non significative ( $p > 0.05$ ).

Le dosage plasmatique des trois enzymes (LDH, CPK et AST) effectué sur les deux groupes d'animaux "DOXO" et "EXTRAIT-DOXO" dans la deuxième prise du sang (prélèvement 2) après un (01) jour de la fin du traitement des animaux, a donné les résultats regroupés dans le tableau 9.

**Tableau 9.** Les activités enzymatiques plasmatiques de la LDH, la CPK et l'AST des deux groupes "DOXO" et "EXTRAIT-DOXO" mesurées dans le 2<sup>ème</sup> prélèvement du sang, après un (01) jour de la fin du traitement des animaux.

	Activité enzymatique (U/L)			
	Groupe "DOXO"		Groupe "EXTRAIT-DOXO"	
	Rats témoins	Rats traités	Rats témoins	Rats traités
LDH	258.4 ±47.8	471.58 ±40.34 (*)	261.63 ±68.5	256.79 ±75.37 (ns)
CPK	129.5 ±14	433.08 ±40 (**)	145.71 ±21.42	178.09 ±11.44 (ns)
AST	32.05 ±2.85	15.88 ±3.45 (**)	29.64 ±3.71	62.43 ±3.81 (***)

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. (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 intraveineuse de la dose de 10 mg/kg de la doxorubicine aux animaux du groupe "DOXO" (traités uniquement par cette dose) a conduit à :

- Une augmentation, statistiquement significative ( $p < 0.05$ ), de l'activité de la LDH ( $471.58 \pm 40.34$  U/L chez les rats traités contre  $258.4 \pm 47.84$  U/L chez les témoins), soit une augmentation de l'activité d'environ deux fois.
- Une augmentation, statistiquement très significative ( $p < 0.01$ ), de l'activité de la CPK ( $433.08 \pm 40$  U/L chez les rats traités contre  $129.5 \pm 14$  U/L chez les témoins), soit une augmentation de l'activité d'environ 3 fois et demie.
- Une augmentation, statistiquement très significatif ( $p < 0.01$ ), de l'activité de l'AST ( $75.88 \pm 3.45$  U/L chez les rats traités contre  $32.05 \pm 2.85$  U/L chez les témoins), soit une augmentation de l'activité d'environ deux fois et demie.

L'administration intraveineuse de la dose de 10 mg/kg de la doxorubicine aux animaux du lot "EXTRAIT-DOXO", dans le 9<sup>ème</sup> jour qui suit les sept (07) jours du gavage gastrique de l'extrait a conduit à :

- Une faible diminution, statistiquement non significative ( $p > 0.05$ ), de l'activité de la LDH ( $256.79 \pm 75.37$  U/L chez les rats traités contre  $261.63 \pm 68.5$  U/L chez les témoins).
- Une petite augmentation, statistiquement non significative ( $p > 0.05$ ), de l'activité de la CPK ( $178.09 \pm 11.44$  U/L chez les rats traités contre  $145.71 \pm 21.42$  U/L chez les témoins).
- Une augmentation considérable, statistiquement hautement significative ( $p < 0.001$ ), de l'activité de l'AST ( $62.43 \pm 3.81$  U/L chez les rats traités contre  $29.64 \pm 3.71$  U/L chez les témoins), soit une augmentation de l'activité d'environ deux fois.

### II.3. Evaluation de l'activité antilipoperoxydative

- **Dosage du MDA cytosolique cardiaque *in vivo***

Les variations des taux du MDA cytosolique cardiaque après sept (07) jours de la fin du traitement des animaux sont représentés dans le tableau 10 et la figure 32.

Tableau 10. Variations des taux du MDA cytosolique cardiaque après 7 jours de la fin du traitement des animaux.

	Groupes d'animaux			
	"TEMOIN"	"EXTRAIT"	"DOXO"	"EXT-DOXO"
Taux du MDA cytosolique cardiaque (n mole/g de cœur)	3.88 ±0.65	4.91 ±0.5 (ns)	13.64 ±1.49 (**)	7.85 ±0.88 (*)

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ). (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ).

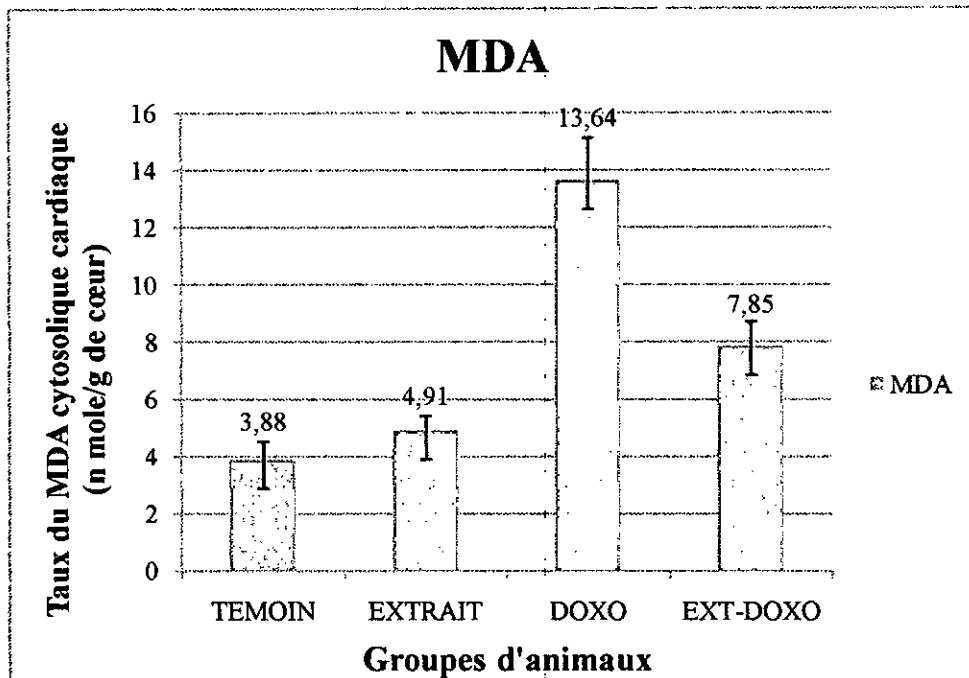


Figure 32. Variations des taux du MDA cytosolique cardiaque après 14 jours de la fin du traitement des animaux.



D'après ces résultats obtenus, on constate que :

Le taux du MDA cytosolique cardiaque mesuré chez le groupe d'animaux "EXTRAIT" (traités uniquement par l'extrait) est faiblement augmenté par rapport au taux enregistré chez les animaux du groupe "TEMOIN" ( $4.91 \pm 0.5$  n mole/g de cœur devant  $3.88 \pm 0.65$  n mole/g de cœur chez les témoins), mais, cette augmentation est statistiquement non significative ( $p > 0.05$ ),

Le taux du MDA enregistré chez le groupe d'animaux "DOXO" atteint  $13.64 \pm 1.49$  n mole/g de cœur. Ce taux est :

- Supérieur, de façon statistiquement significative ( $p < 0.05$ ), à celui enregistré chez le groupe d'animaux "EXTRAIT" ( $4.91 \pm 0.5$  n mole/g de cœur), d'environ trois fois.
- Supérieur et de façon statistique très significative ( $p < 0.01$ ), au taux mesuré chez le groupe d'animaux "TEMOIN" ( $3.88 \pm 0.65$  n mole/g de cœur), de trois fois et demie.

Le taux du MDA enregistré chez le groupe d'animaux "EXTRAIT-DOXO" atteint  $7.85 \pm 0.88$  n mole/g de cœur. Ce taux est :

- Supérieur, de façon statistiquement significative ( $p < 0.05$ ), au taux enregistré chez les animaux du groupe "TEMOIN" ( $3.88 \pm 0.65$  n mole/g de cœur) de deux fois.
- Supérieur, de façon statistiquement significative ( $p < 0.05$ ), au taux enregistré chez les animaux du groupe "EXTRAIT" ( $4.91 \pm 0.5$  n mole/g de cœur) d'environ une fois et demie
- Inférieur, de façon statistiquement significative ( $p < 0.05$ ), à celui mesuré chez les animaux du groupe "DOXO" ( $13.64 \pm 1.49$  n mole/g de cœur) d'environ deux fois.

#### II.4. Dosage du glutathion cytosolique cardiaque *in vivo*

Les taux du glutathion cytosolique cardiaque, mesurés après quatorze (14) jours de la fin du traitement des animaux, sont représentés dans le tableau 11 et la figure 33.

Tableau 11. Variations des taux du GSH cytosolique cardiaque après 14 jours de la fin du traitement des animaux.

	Groupes d'animaux			
	"TEMOIN"	"EXTRAIT"	"DOXO"	"EXT-DOXO"
Taux du GSH cytosolique cardiaque (m mole/g de cœur)	0.46 ±0.005	0.46 ±0.1 (ns)	0.244 ±0.05 (*)	0.58 ±0.1 (ns)

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. (ns) désigne un effet non significatif ( $p > 0.05$ ), (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ).

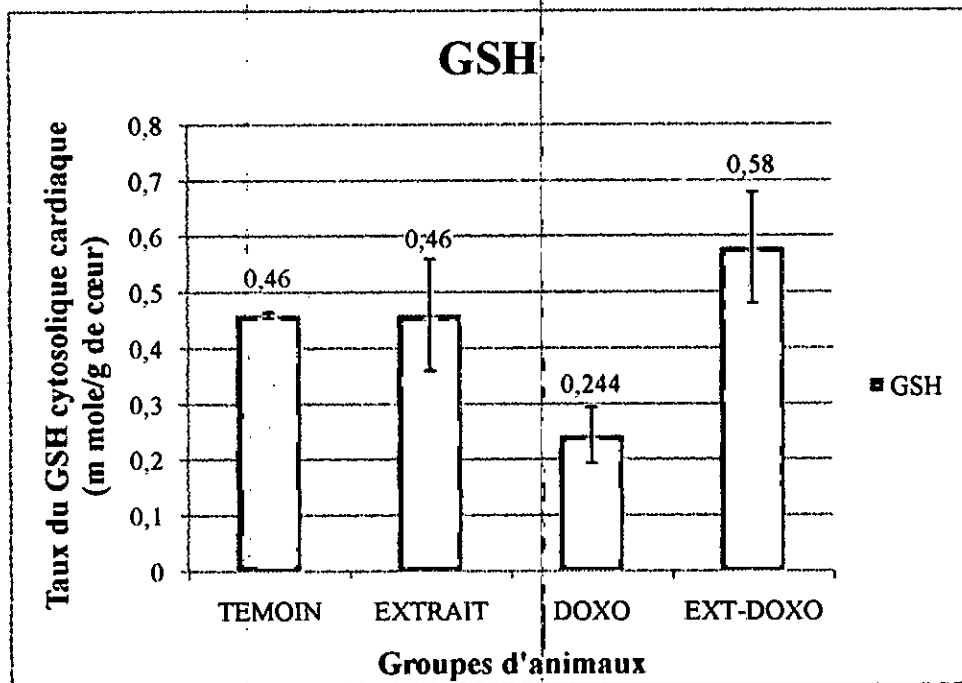


Figure 33. Variations des taux du GSH cytosolique cardiaque après 14 jours de la fin du traitement des animaux.

Après 14 jours de la fin du traitement des animaux des quatre groupes du travail, le taux du GSH cytosolique cardiaque mesuré chez le groupe d'animaux "EXTRAIT" (traité uniquement par l'extrait) était égal à celui mesuré chez les animaux du lot "TEMOIN" (0.46 m mole/g de cœur). Cependant, l'injection intraveineuse de la dose unique de 10 mg/kg de la doxorubicine au groupe d'animaux "DOXO" (traité uniquement par cette dose) a conduit à une diminution, statistiquement significative ( $p < 0.05$ ), du taux de GSH cytosolique cardiaque, atteint  $0.244 \pm 0.05$  m mole/g de cœur, par rapport aux deux taux mesurés chez les deux groupes d'animaux "TEMOIN" et "EXTRAIT".

Le taux du GSH mesuré chez les animaux du lot "EXT-DOXO" (prétraités par l'extrait puis traités par la doxorubicine) ( $0.58 \pm 0.1$  m mole/g de cœur) est :

- Un peu augmenté par rapport au taux mesurés chez les deux groupes d'animaux "TEMOIN" et "EXTRAIT" ( $0.46 \pm 0.005$  m mole/g de cœur) mais, de façon statistiquement non significative ( $p > 0.05$ ),
- Plus grand, de façon statistiquement significative ( $p < 0.05$ ), à celui mesuré chez le groupe d'animaux "DOXO" ( $0.224 \pm 0.05$  m mole/g de cœur) d'environ deux fois et demie.

## Discussion

Notre présente étude vise principalement à évaluer le potentiel cardioprotecteur de l'extrait des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. contre la toxicité cardiaque induite par la doxorubicine. La doxorubicine est le médicament anticancéreux le plus utilisé dans le traitement chimiothérapique des maladies anticancéreuses. Sa toxicité cardiaque sérieuse, qui développe au cours de son métabolisme, constitue le facteur majeur qui limite l'utilisation clinique de ce médicament (75.81.87).

La *Foeniculum vulgare* Mill. est une plante aromatique et médicinale connue par les êtres humains depuis l'antiquité. Elle s'utilise comme un remède naturel pour le traitement de différents problèmes de santé (29).

Le potentiel cardioprotecteur de l'administration orale de la fraction butanolique de l'extrait méthanolique (extrait des flavonoïdes totaux) de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. a été évalué sur des rats *wistar* de laboratoire.

Afin de vérifier la présence des flavonoïdes dans notre extrait préparé et la nature de ses différents constituants, nous avons réalisés une étude chimique analytique comprenant des tests chimiques d'identification de quelques substances qui sont les flavonoïdes, les tanins hydrolysables et les tanins condensés, des dosages photométriques quantitatifs (dosage des flavonoïdes totaux et des phénols totaux) et une étude chromatographique par CCM et HPLC-DAD.

Les tests chimiques d'identification ont montrés que l'extrait contient des composés flavonoïdiques et des tanins hydrolysables et le dosage photométrique des flavonoïdes totaux a donné une valeur significative ( $13.91 \pm 1.22$  mg/g extrait), montrant aussi la présence des flavonoïdes dans l'extrait.

Le dosage des phénols totaux a donné une valeur de  $304.23 \pm 7.9$  mg/g extrait, indiquant la nature phénolique de l'extrait.

L'étude chromatographique a confirmée, de sa part, la présence des flavonoïdes dans l'extrait. Le profil HPLC-DAD a montré la présence de flavonoïdes glycosylés de type flavonols substitués en position 3 et la présence d'acides phénols dérivés de l'acide caféique alors que le profil CCM a montré la présence de plusieurs types de composés flavonoïdiques comme les isoflavones, les flavanonols, les flavones glycosidiques et les anthocyanidines-3-glycosylés et la présence des acides phénols et des coumarines.

Bref, notre extrait préparé des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. contient des composés flavonoïdiques et autres substances phénoliques comme les acides phénols et les tanins hydrolysables.

Le pouvoir antioxydant de l'extrait est testé *in vitro* par sa capacité de piéger le radical libre stable DPPH°. Ce test a clairement montré l'effet réducteur de l'extrait sur ce radical libre et qui est observé par le changement de la couleur de la solution méthanolique du DPPH° du violet (couleur de la forme radicalaire DPPH°) au jaune pâle (couleur de la forme réduite DPPH-H). Ce changement de la couleur explique bien le pouvoir antioxydant de l'extrait.

A la concentration de 1 mg/ml, l'extrait a réduit presque 27.5 % du radical libre DPPH° à 100 µM, au moment où, la quercétine (flavonoïde de référence) a réduit presque 85.8 % de ce radical libre à la même concentration. L'effet piégeur de l'extrait du radical libre DPPH° est faible par rapport à celui de la quercétine mais, il est quand même considérable.

Nos résultats obtenus confirment le rôle antiradicalaire des flavonoïdes, *in vitro*, cité par plusieurs auteurs. Chin-Yuan Hsu, 2006 (12) a trouvé que le (+) catéchine, un flavonoïde de type flavonole piège environ 70% du radical libre DPPH° à 100 µM pour la concentration de 0.1 mg/ml dans l'éthanol 50%, et piège environ 80% de ce même radical libre pour la concentration de 0.5 mg/ml. D'une autre part, Pourmorad et ses collaborateurs, 2006 (2) ont trouvés, lors de leur travail sur les activités antioxydantes de quelques extraits méthanoliques végétaux, que la quercétine à une concentration de 0.01 mg/ml, piège 50% du radical DPPH° à 100 µM.

Ainsi, Singh et ses collaborateurs, 2008 (80) ont trouvés que la fraction butanolique de l'extrait éthanolique des écorces de la *Terminalia arjuna* exerce un effet piègeur contre le radical libre stable DPPH°. Cet effet piègeur a été observé à travers différentes concentrations allant de 0.9 µg/ml à 1 mg/ml, par l'ajout de 100 µl de chaque concentration à 100 µl de la solution du DPPH° à 200 µl. A la concentration de 5.6 µg/ml, la fraction butanolique de l'extrait éthanolique des écorces de cette plante a réduit 50% du radical libre DPPH°.

Le piégeage du radical libre DPPH° par l'extrait s'explique, et de façon majoritaire, par la nature flavonoïdique de l'extrait. Les flavonoïdes, qui sont connus par leur activité antioxydante, ont la capacité de piéger directement les radicaux libres (R°) et les transforment aux espèces non radicalaires (R-H) par donation d'atomes d'hydrogène (13). Dans notre cas, les flavonoïdes neutralisent le radical libre stable DPPH° et le transforme à la forme réduite DPPH-H.

En vue d'évaluer l'effet protecteur de notre extrait des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. contre la cardiotoxicité induite par la doxorubicine, nous avons réalisés une étude biologique sur des rats *wistar* de laboratoire comprenant :

- Des dosages des activités plasmatiques de la LDH, la CPK et l'AST
- Le dosage du MDA cytosolique cardiaque
- Le dosage du GSH cytosolique cardiaque

Les activités plasmatiques (41) ou sériques (32) de la LDH et la CPK sont très utilisées au niveau clinique comme des biomarqueurs dans le diagnostique de la toxicité et la nécrose cardiaques (41.32). Au cours de l'infarctus du myocarde, les cellules cardiaques détruites libèrent leurs contenus dans le courant circulatoire et les activités plasmatiques de la LDH, la CPK et l'AST augmentent. La mesure des activités plasmatiques de ces trois enzymes peut ainsi être d'un grand intérêt diagnostique de l'atteinte du myocarde (41.42).

Les activités des trois enzymes LDH, CPK et AST, mesurées dans le premier prélèvement sanguin chez les rats traité uniquement par l'extrait, n'ont pas changées. Ces activités indiquent que le traitement des animaux par l'extrait seul n'a pas provoqué une atteinte myocardique.

Dans le deuxième prélèvement sanguin, l'injection de la dose unique de 10 mg/kg de la doxorubicine chez le groupe d'animaux traité uniquement par cette dose a provoquée une toxicité cardiaque. Cette toxicité cardiaque est clairement observée par l'augmentation des activités plasmatiques des trois enzymes LDH, CPK et l'AST.

Ces résultats sont en bonne corrélation avec les résultats obtenus par Andreadou et ses collaborateurs, 2007 (32) et aussi avec ceux obtenus par Abdel-Waheb et ses collaborateurs, 2003 (99). Andreadou et ses collaborateurs ont trouvés que les activités sériques de la LDH, la CPK et l'AST augmentent considérablement après 3 jours de l'injection intrapéritonéale d'une dose de 20 mg/kg de la doxorubicine chez le rat, Abdel-Waheb et ses collaborateurs ont trouvés que les activités sériques de la LDH et de l'AST augmentent hautement après 1 jour de l'injection intrapéritonéale d'une dose de 15 mg/kg de la doxorubicine chez le rat.

Les activités plasmatiques de la LDH et la CPK mesurées chez les animaux prétraités par l'extrait puis traités par une seule dose de 10 mg/kg de la doxorubicine n'ont pas changées. Ces activités montrent que l'état cardiaque de ce groupe d'animaux est normal. Cependant, l'activité plasmatique de l'AST mesurée chez ce même groupe d'animaux est nettement augmentée.

L'augmentation de l'activité enzymatique de l'AST peut être due à une toxicité cardiaque ou à une toxicité hépatique ou aux deux au même temps (32). Dans notre cas, et comme les activités plasmatique de la LDH et la CPK, qui sont les plus utilisées dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde, n'ont pas augmentées, indiquant l'état normal du cœur, l'augmentation de l'activité plasmatique de l'AST est très probablement due à une toxicité hépatique ou à une toxicité hépatique majoritaire et une toxicité cardiaque minoritaire. Cette forte considération nous permet de dire que le prétraitement des animaux par l'extrait à une dose de 100 mg/kg/j pendant 7 jours a prévenu contre la cardiotoxicité de la doxorubicine.

Ces résultats obtenus, expliquant l'effet préventif de notre extrait contre la cardiotoxicité de la doxorubicine, sont très proches à ceux obtenus par Chopra et ses collaborateurs, 1995 (64).

Ces derniers ont montrés que le traitement des rats par un extrait méthanolique de la propolis (riche en flavonoïdes) indienne à une dose de 100 mg/kg/j pendant 5 jours suivi par une injection intraveineuse, dans le sixième jour, d'une dose de 10 mg/kg de la doxorubicine prévient contre la toxicité cardiaque induite par ce médicament. Le traitement des rats par la propolis avant l'injection de la doxorubicine a considérablement empêché l'augmentation des activités enzymatiques sériques de la CPK et de l'AST (170 IU/L devant 160 IU/L chez les témoins et 220 IU/L chez les animaux traités uniquement par l'extrait, pour la CPK, et 41 IU/L devant 39 IU/L chez les témoins et 49 IU/L chez les animaux traités uniquement par l'extrait, pour l'AST) et a considérablement empêcher aussi l'augmentation du taux du MDA cytosolique cardiaque par rapport aux animaux traités uniquement par la doxorubicine (1.52 nM MDA/mg protéines devant 1.3 nM MDA/mg protéines chez les témoins et 2 nM MDA/mg protéine chez les animaux traités uniquement par l'extrait éthanolique de la propolis).

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires qui résulte de la coupure, médiée par les radicaux libres, des acides gras polyinsaturés. Le MDA a un temps de demi-vie plus long que ceux des radicaux libres et diffuse facilement (5). Suite à une peroxydation lipidique, le taux du MDA augmente et son dosage permet de déterminer l'étendue de cette peroxydation (190).

La peroxydation lipidique joue un rôle très important dans les dommages et les lésions oxydatifs et pour trois raisons. Premièrement, elle peut amplifier le nombre des réactions radicalaires en chaîne (64) ; deuxièmement, quelques produits de cette peroxydation sont eux même toxiques (64,136) et troisièmement, la peroxydation lipidique met en place une demande des systèmes de détoxification GSH-dépendants (64).

Le taux du MDA cytosolique cardiaque est mesuré chez tous les groupes d'animaux après 7 jours de la fin du traitement. Le groupe d'animaux traité uniquement par l'extrait a marqué un taux normal du MDA par rapport au taux enregistré chez les animaux témoins. Ce taux marqué du MDA indique que notre extrait administré aux animaux à une dose de 100 mg/kg/j pendant 7 jours n'a pas provoquée une peroxydation lipidique après 9 jours de son



administration. Par ailleurs, le taux du MDA enregistré chez le groupe d'animaux traité uniquement par la dose de 10 mg/kg de la doxorubicine est nettement augmenté par rapport à celui enregistré chez les animaux traités uniquement par l'extrait. Ce taux élevé du MDA montre que cette dose administrée de la doxorubicine a clairement provoquée une Peroxydation lipidique des membranes cellulaires cardiaques indiquant l'effet cardiotoxique de ce médicament.

Le groupe d'animaux prétraité par l'extrait puis traité par une seule dose de 10 mg/kg de la doxorubicine a marqué un taux du MDA supérieur à celui mesuré chez les animaux traités uniquement par l'extrait et inférieur à celui mesuré chez les animaux traités uniquement par la doxorubicine. Ce résultat montre que le prétraitement des animaux par l'extrait a considérablement réduit la peroxydation lipidique induite par la dose administrée de la doxorubicine. Cette réduction du taux du MDA explique l'effet préventif de cet extrait contre la toxicité cardiaque de ce médicament.

La toxicité cardiaque de la doxorubicine est fréquemment liée à sa capacité de générer des radicaux libres (64). La génération, potentiel de radicaux libres par la doxorubicine est impliquée à la fois en terme d'effet antitumoral et d'effet cardiotoxique (34). Les radicaux libres générés par ce médicament peuvent affecter les tissus sains, comme le cœur, causant des altérations morphologiques et des dommages fonctionnels (37). L'ADN et les membranes cellulaires constituent les deux cibles les plus favorisées des attaques induites par la doxorubicine (64).

La structure quinonique de la doxorubicine lui permet de se comporter comme accepteur ou donneur d'un électron. L'addition d'un électron libre, en présence d'enzymes d'oxydoréduction, telles que le cytochrome P450 ou la NADPH déshydrogénase, transforme la forme quinonique en radical libre semi-quinonique (33,34) qui aurait un effet toxique direct sur l'ADN (34).

En présence d'oxygène, les espèces radicalaires anthraquinoniques forment des radicaux anions superoxydes, hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène qui seront également toxiques pour l'ADN, les lipides et les protéines cellulaires (31). Les radicaux libres générés par la doxorubicine, et surtout le radical hydroxyle  $\text{OH}^\bullet$  (14) et l'anion peroxytrite  $\text{ONOO}^-$ ,

attaquent le tissu cardiaque et provoquent la peroxydation lipidique des membranes de ses cellules, conduisant à l'augmentation du taux du MDA cytosolique cardiaque (14.32).

La cardiotoxicité de la doxorubicine s'explique aussi par la très grande affinité de ce médicament à une espèce phospholipidique (33) présente principalement dans les membranes mitochondriales cardiaques qui est *la cardiolipine* (33.115).

La peroxydation lipidique provoque une augmentation croissante de la perméabilité des membranes cellulaires induisant une altération irréversible des propriétés fonctionnelles de la cellule, pouvant aller jusqu'à la lyse complète (5). Les cellules cardiaques atteintes par la peroxydation lipidique libèrent leurs contenus dans le courant circulatoire d'où l'élévation des activités de quelques substances enzymatiques comme la LDH et la CPK dans le plasma sanguin.

L'effet préventif observé de notre extrait contre la toxicité cardiaque induite par la doxorubicine est très probablement dû à la présence des flavonoïdes dans l'extrait. Les flavonoïdes sont des piègeurs des radicaux libres formés dans diverses circonstances (1.2.3.12). Leur activité antioxydante est due principalement à leur propriété redox : ils agissent comme agents réducteurs, donneurs de l'hydrogène (12.117). Au cours de leur mécanisme de piégeage des radicaux libres, il se forme des radicaux libres phénoxyles (radicaux libres flavonoïdiques) et qui sont moins réactifs (13.117).

Les flavonoïdes sont connus aussi par leur capacité de chélater et désactiver les ions métalliques des métaux de transition comme le fer et le cuivre. Leurs structures chimiques les permettent de former des complexes légers avec ces ions métalliques, empêchant ces derniers de réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former le radical libre toxique  $\text{OH}^\circ$  à travers la réaction de *Fenton* (117).

Grâce à leur capacité de capturer et neutraliser les radicaux libres générés par la doxorubicine, les flavonoïdes peuvent inhiber la peroxydation lipidique des membranes cellulaires induites par ce médicament (64), empêchant ainsi les dégradations liées à l'intense

réactivité de ces radicaux libres au niveau des phospholipides membranaires, réduisant alors le taux du MDA et des autres produits de la peroxydation lipidique.

L'activité antiradicalaire des flavonoïdes nécessite :

- Une structure orthodiphénolique du cycle B
- Une double liaison 2-3 conjuguée avec la fonction 4-oxo, responsable de la délocalisation d'électron stabilisant le radical aroxyde
- Des hydroxyles en position 3 et 5 qui permettent une activité antiradicalaire maximale (116).

Le glutathion est un tripeptide dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques (49). Sa fonction thiol (-SH) lui confère un rôle d'antioxydant (donneur d'électron ou d'atome d'hydrogène) qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxydées et en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) et des radicaux hydroxyles ( $OH^\bullet$ ) (14).

En situation de stress oxydatif, son rôle protecteur et détoxifiant résulte principalement de sa fonction de cosubstrat des GPx et des GSH-s-transférase. Mais, il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydant tels que la vitamine C, la vitamine E et les superoxydes dismutases (49).

Lors du traitement par la doxorubicine seule, le taux du GSH cytosolique cardiaque mesuré après 14 jours de l'injection de ce médicament est nettement diminué. Cette diminution est très probablement due aux espèces radicalaires toxiques générées par ce médicament et qui sont attaquées et neutralisées par le système de détoxification, provoquant la baisse de la concentration du GSH cytosolique cardiaque qui appartient à ce système de détoxification. Cette diminution du taux du GSH cytosolique cardiaque, dû au traitement par la doxorubicine, a été observée également par Abdel-Waheb et ses collaborateurs, 2003 (99). Ces derniers ont trouvés qu'après 1 jour de l'injection intrapéritonéale d'une dose de 15 mg/kg de la doxorubicine chez le rat, le taux du GSH cytosolique cardiaque diminue considérablement

( $2.7 \pm 0.08 \mu \text{ mole/g}$  de cœur) par rapport aux rats témoins non traités ( $4.2 \pm 0.09 \mu \text{ mole/g}$  de cœur).

Le traitement des animaux par l'extrait avant l'injection de la doxorubicine a empêché la diminution du GSH observée chez les animaux recevant seulement ce médicament, donnant un taux du GSH pratiquement égal à celui mesuré chez les animaux témoins non traités et aussi chez les animaux traités uniquement par l'extrait.

Ce résultat obtenu montre l'effet préventif de l'extrait contre la diminution du taux du GSH cytosolique cardiaque provoquée par la doxorubicine après 14 jours de l'administration de ce dernier. Cet effet préventif est peut être dû à l'effet piègeur puissant des flavonoïdes de l'extrait, qui attaquent et neutralisent les radicaux libres générés par la doxorubicine et les empêchent à réagir avec le glutathion, constituant ainsi une protection de la consommation de ce tripeptide par ces radicaux libres, comme il peut être dû à la capacité de cet extrait à induire la synthèse et/ou la régénération du GSH après sa consommation suite aux attaques radicalaires induites par la doxorubicine, pour maintenir son taux normal, comme il peut être dû aussi à l'association des deux effets, c'est-à-dire à l'effet piègeur des flavonoïdes et l'effet détoxifiant du GSH avec la synthèse et/ou la régénération de ce dernier, sous l'effet de l'extrait, pour le maintien de son taux physiologique normal.

Notre étude confirme l'effet cardiotoxique de la doxorubicine, *in vivo*, qui est prouvé par plusieurs chercheurs : (32,71, 89-113). Nos résultats obtenus à travers le dosage du MDA cytosolique cardiaque sont en bonne corrélation avec ceux obtenus par Singh et ses collaborateurs, 2008 (80). Ce groupe de chercheurs a montré que le traitement des rats *wistar* par une seule dose de 20 mg/kg de la doxorubicine par voie intrapéritonéale a nettement augmenté le taux du MDA cytosolique cardiaque après 48 heures de l'injection du médicament ( $1725 \pm 179.3 \mu \text{ mole /g}$  de cœur contre  $674.7 \pm 174.7 \mu \text{ mole /g}$  de cœur chez les rats témoins) et que le traitement des rats par la fraction butanolique de l'extrait éthanolique des écorces de la *Terminalia arjuna* pendant 24 jours par voie orale aux différentes doses, allant de 0.85 à 6.8 mg/kg, suivi par une injection intrapéritonéale d'une seule dose de 20 mg/kg de la doxorubicine après chaque dose, a marqué un taux de MDA significativement

supérieur à celui enregistré chez les rats témoins non traités et significativement inférieur à celui enregistré chez les rats traités uniquement par la doxorubicine, après 48 heures de l'injection du médicament, indiquant le rôle préventif de la fraction butanolique de l'extrait éthanolique des écorces de cette plante contre la toxicité cardiaque de la doxorubicine.

1

1

1

# Conclusion et perspectives

## Conclusion et perspectives

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des molécules radicalaires, comme le radical anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le radical libre ( $OH^\bullet$ ), ou non radicalaire, comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui sont produites en faibles quantités dans les circonstances quotidiennes normales. Lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène se perturbe, sous l'effet de certains facteurs endogènes ou exogènes, ces espèces sont produites d'une manière accrue caractérisant l'état du stress oxydatif.

Les espèces réactives de l'oxygène sont responsables, de manière directe ou indirecte sur de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...) pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires. Ces espèces ont été impliquées dans un grand nombre de pathologies tant aiguës que chroniques.

La doxorubicine (adryamicine) est un médicament anticancéreux largement utilisé dans le traitement d'un large spectre des cancers. Son utilisation clinique est souvent limitée à cause de sa toxicité cardiaque indésirable, qui peut être due à sa grande affinité à un acide gras polyinsaturé présent principalement dans les membranes mitochondriales cardiaques qui est la *cardiolipine*.

Au cours de son métabolisme, la doxorubicine favorise la formation de radicaux libres qui s'impliquent à la fois en termes d'effet antitumoral et d'effet cardiotoxique. Ces radicaux libres formés peuvent attaquer et endommager l'ADN et les membranes cellulaires cardiaques expliquant la toxicité cardiaque de ce médicament.

Les flavonoïdes, composés naturels largement présents dans les fruits, les légumes et les végétaux supérieurs, sont connus par leur activité antioxydante. Ils sont des piègeurs des radicaux libres, des chélateurs des ions métalliques et également des inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation des radicaux libres.

Le fenouil sauvage (*Foeniculum vulgare* Mill.) est une apiacée médicinale, aromatique et industrielle d'origine méditerranéenne, connue et utilisée par les êtres humains depuis l'antiquité. Cette plante possède plusieurs propriétés thérapeutiques intéressantes; elle est anti-inflammatoire, antispasmodique, antidiarrhéique, stomachique, diurétique, sécrétolytique, expectorante ...

Notre étude effectuée *in vivo* sur des rats *wistar* de laboratoire et *in vitro* par le test au radical libre DPPH°, visant à évaluer l'effet préventif de l'extrait des flavonoïdes totaux de la partie aérienne du fenouil sauvage (*Foeniculum vulgare* Mill.) contre la toxicité cardiaque (stress oxydatif) induite par la doxorubicine, a clairement montrée que :

- L'extrait des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. possède une activité antiradicalaire considérable *in vitro* à travers le test au radical libre DPPH°.
- Administré par voie orale à la dose de 100 mg/kg/j pendant 7 jours, l'extrait a prévenu contre la cardiotoxicité induite par la doxorubicine qui est administré par voie intraveineuse à une seule dose de 10 mg/kg deux jours après la fin de l'administration de l'extrait.

Après 01 jour de l'administration du médicament, l'extrait a totalement empêché l'augmentation des deux biomarqueurs enzymatiques cardiaques LDH et CPK, indiquant son rôle préventif.

Après 7 jours de l'administration du médicament, l'extrait a provoqué la diminution du taux de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires cardiaques induite par la doxorubicine, indiquant aussi son rôle préventif.

Après 14 jours de l'administration du médicament, l'extrait a empêché la diminution du GSH cytosolique cardiaque, indiquant encore son rôle préventif.

En plus des propriétés thérapeutiques déjà connues du fenouil sauvage (*Foeniculum vulgare* Mill.), il ressort clairement de cette étude que l'extrait des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de cette plante possède une activité antioxydante. Son administration par voie orale à 100 mg/kg/j pendant 7 jours, chez des rats *wistar*, a prévenu contre la toxicité cardiaque de la doxorubicine et jusqu'à 14 jours de l'injection intraveineuse de ce médicament à une seule dose de 10 mg/kg, administrée 2 jours après l'administration total de l'extrait.



Les résultats obtenus de notre présente étude sont très considérables car ils ouvrent beaucoup de perspectives cliniques notamment en chimiothérapie anticancéreuse dans le développement des traitements préventifs efficaces contre la toxicité indésirable des médicaments anticancéreux.

Cette étude primaire montrant l'effet antioxydant et l'effet protecteur de l'extrait des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. contre la toxicité cardiaque induite par la doxorubicine, encourage beaucoup à établir une étude complète et plus profonde sur le potentiel cardioprotecteur de cette plante afin de bien déterminer le mécanisme et le site d'action de l'effet, le rapport dose/activité, les substances actives ou les plus actives de l'extrait responsables de l'effet et l'effet à moyen et à long terme.

Des études supplémentaires, pouvant être basées sur la recherche d'autres effets probables de la plante, peuvent être d'un grand intérêt thérapeutique. Ces études peuvent aborder :

- L'effet curatif de l'extrait des flavonoïdes totaux de la plante contre la cardiotoxicité de la doxorubicine
- L'effet préventif et l'effet curatif de la plante sur des modèles d'animaux portant de cellules cancéreuses
- l'effet hépatoprotecteur et l'effet hépatocuratif contre la toxicité hépatique des substances hépatotoxiques comme la lomustine (CCNU)
- l'effet néphroprotecteur et l'effet néphrocuratif contre des substances néphrotoxiques comme l'elliptinium.

# Annexe

**GOT - GPT**

Reitman-Frankel. Colorimetric

**Quantitative determination of transaminases GOT and GPT IVD**

Store at 2-8°C

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

The glutamic transaminase enzymes, serum glutamic oxalacetic (GOT) and serum glutamic pyruvic (GPT), catalyse the transfers of the amino group of glutamic acid to oxalacetic acid and pyruvic acid in reversible reactions. The transaminase activity is proportional to the amount of oxalate or pyruvate formed over a definite period of time and is measured by a reaction with 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) in alkaline sol.<sup>1,2</sup>

**CLINICAL SIGNIFICANCE**

Transaminases GOT and GPT are cellular enzymes, found in highest concentration in heart muscle, the cells of the liver, the cells of the skeletal muscle and in smaller amounts in other tissues. Although an elevated level of GOT and GPT in the serum is not specific of the hepatic disease, is used mainly to diagnostic and to verify the course of this disease.

When GOT is used in conjunction with GPT aid in the diagnosis of infarcts in the myocardium, since the value of the GPT stays within the normal limits in the presence of elevated levels of GOT<sup>1,2,5,6</sup>.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

**REAGENTS**

Ref: 1001165 GOT

<b>R 1 a</b>	DL-Aspartate	pH 7.4	100 mmol/L
Substrate GOT	$\alpha$ -Ketoglutarate		2 mmol/L

Ref: 1001175 GPT

<b>R 1 b</b>	DL-Alanine	pH 7.4	200 mmol/L
Substrate GPT	$\alpha$ -Ketoglutarate		2 mmol/L

<b>R 2</b>	2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH)	1 mmol/L
Developer		
<b>GOT / GPT -R&amp;F CAL</b>	Primary calibrator of pyruvic	1.2 mmol/L

Additional reagent: Sodium hydroxide (NaOH) 0.4 N

**PREPARATION**

All the reagents are ready to use.

**STORAGE AND STABILITY**

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.

**ADDITIONAL EQUIPMENT**

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 505 nm.
- Thermostatic bath at 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ )
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

**SAMPLES**

Serum<sup>1,2</sup>: Stability 7 days at 2-8°C.

**PROCEDURE**

- Assay conditions:  
Wavelength: ..... 505 nm  
Cuvette: ..... 1 cm light path  
Constant temperature ..... 15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled.
- Pipette into a tubes:

	GOT	GPT
<b>R 1 a</b> Substrate GOT	0.5 mL	--
<b>R 1 b</b> Substrate GPT	--	0.5 mL

- Mix, Incubate for 5 min. at 37°C, add.

Sample	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$

- Mix. Return to the bath for: 30 min. 30 min.

R 2 Developer	0.5 mL	0.5 mL

- Mix. Allow to stand for 20 min at room temperature.

NaOH 0.4 N	5.0 mL	5.0 mL

- Mix. Let stand for 5 min. at room temperature.
- Read the initial absorbance (A) against a water blank. The color is stable at least 1 hour.

**CALCULATIONS**

From absorbances, read units of GOT or GPT from the corresponding calibration curves.

**Calibration curve**

- Set up six tubes and pipette (mL):

Tube	1	2	3	4	5	6
Water	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
GOT Substrate	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5
Calibrator	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
DNPH	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Mix. Allow to stand for 20 minutes at room temperature.

NaOH 0.4 N	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0

Mix. Allow to stand for at least 5 minutes.

- Read against a water blank at 505 nm.
- Plot a calibration curve of the absorbances found vs. The corresponding units, on a graph paper, according to the following:

GOT	WU/mL	0	22	55	95	150	215
	U/L	0	11	27	46	72	104
GPT	WU/mL	0	25	50	83	126	--
	U/L	0	12	24	40	62	--

**Units**

- One Wróblewski unit (WU) of GOT or GPT is defined as the amount of enzyme that will form  $4.82 \times 10^{-4}$   $\mu\text{mole}$  of Glutamate/min (25°C).
- To convert WU into international units (U/L), multiply results by 0.482.

**QUALITY CONTROL**

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

**REFERENCE VALUES<sup>1</sup>**

GOT: 8-40 UW / ml (3-18 U/L) GPT: 5-30 UW / ml (2-16 U/L)

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

Measuring range: Up to linearity limit of GOT 180 WU (85 U/L) and GPT 126 WU (62 U/L).

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/10 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 10.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

**INTERFERENCES**

Haemolysis interferes with the assay<sup>1,2</sup>. A list of drugs and other interfering substances with GOT - GOT determination has been reported by Young et al.<sup>3,4</sup>.

**NOTES**

SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

**BIBLIOGRAPHY**

- Murray R. Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1112-116.
- Reitman S, Frankel S.J. Clin Path 1957; 28-56.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burlis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

**PACKAGING**

Ref: 1001165 (GOT)	Cont.	2 x 250 mL
Ref: 1001175 (GPT)		2 x 250 mL

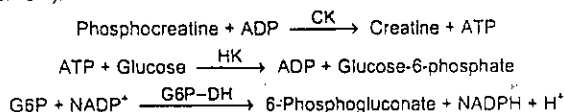
**Quantitative determination of creatin kinase (CK)**

IVD

Store at 2-8°C

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

Creatine kinase (CK) catalyses the reversible transfer of a phosphate group from phosphocreatine to ADP. This reaction is coupled to those catalysed by hexokinase (HK) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH):



The rate of NADPH formation, measured photometrically, is proportional to the catalytic concentration of CK present in the sample<sup>1,2</sup>.

**CLINICAL SIGNIFICANCE**

Creatine kinase is a cellular enzyme with wide tissue distribution in the body. Its physiological role is associated with adenosine triphosphate (ATP) generation for contractile or transport systems.

Elevated CK values are observed in diseases of skeletal muscle and after myocardial infarction<sup>1,5,6</sup>.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

**REAGENTS**

R 1 Buffer	Imidazol pH 7.0	100 mmol/L
	Glucose	20 mmol/L
	Magnesium acetate	10 mmol/L
	EDTA	2 mmol/L
R 2 Substrate	ADP	2 mmol/L
	AMP	5 mmol/L
	di-Adenosine-5- pentaphosphate	10 mmol/L
	NADP <sup>+</sup>	2 mmol/L
	Hexokinase (HK)	2500 U/L
	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P-DH)	1500 U/L
	N-acetyl cysteine	20 mmol/L
Creatine phosphate	30 mmol/L	

**PREPARATION**

Working reagent (WR):

Ref: 1001050. Dissolve (→) 1 tablet of R 2 Substrate with one vial of R 1.

Ref: 1001051. Dissolve (→) 1 tablet of R 2 Substrate with 15 mL of R 1.

Cap vial and mix gently to dissolve contents.

Stability: 5 days at 2-8°C or 24 hours at room temperature (15-25°C).

**STORAGE AND STABILITY**

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use the tablets if appears broken.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 340 nm ≥ 1.60.

**ADDITIONAL EQUIPMENT**

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 340 nm.
- Thermostatic bath at 25°C, 30°C or 37°C (± 0.1°C).
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

**SAMPLES**

Serum or plasma<sup>1</sup>: Stability 7 days at 2-8°C, protected from light.

The creatin kinase activity decreases 10% after 1 day at 2-5°C or after 1 hour at 15-25°C.

**PROCEDURE**

- Assay conditions:  
Wavelength: ..... 340 nm  
Cuvette: ..... 1 cm light path  
Constant temperature ..... 25°C / 30°C / 37°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water or air.
- Pipette into a cuvette:

	25 - 30°C	37°C
WR (mL)	1.0	1.0
Sample (µL)	40	20

- Mix, incubate for 2 minutes.
- Read initial absorbance (A) of the sample, start the stopwatch and read absorbances at 1 minute intervals thereafter for 3 minutes.
- Calculate the difference between absorbances and the average absorbance differences per minute (ΔA/min).

**CALCULATIONS**

$$\begin{aligned} 25^{\circ}\text{-}30^{\circ}\text{C} & \quad \Delta A / \text{min} \times 4127 = \text{U/L CK} \\ 37^{\circ}\text{C} & \quad \Delta A / \text{min} \times 8095 = \text{U/L CK} \end{aligned}$$

Units: One international unit (IU) is the amount of enzyme that transforms 1 µmol of substrate per minute, in standard conditions. The concentration is expressed in units per litre of sample (U/L).

**Temperature conversion factors**

To correct results to other temperatures multiply by:

Assay temperature	Conversion factor to		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1.00	1.56	2.44
30°C	0.64	1.00	1.56
37°C	0.41	0.63	1.00

**QUALITY CONTROL**

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINTROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

**REFERENCE VALUES<sup>1</sup>**

	25°C	30°C	37°C
Men, up to	80 U/L	130 U/L	185 U/L
Women, up to	70 U/L	110 U/L	170 U/L

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

Measuring range: From detection limit of 1.35 U/L to linearity limit of 1000 U/L.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/10 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 10.

Precision:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
Mean (U/L)	166	450	165	446
SD	2.36	3.72	2.26	5.17
CV (%)	1.42	0.82	1.37	1.16

Sensitivity: 1 U/L = 0.0001 ΔA/min.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

**INTERFERENCES**

No interferences were observed with bilirubin up to < 20 mg/dL and hemoglobin up to 10 g/L<sup>1,2</sup>. A list of drugs and other interfering substances with CK determination has been reported by Young et al.<sup>3,4</sup>.

**NOTES**

SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

**BIBLIOGRAPHY**

- Abbot B et al. Creatinine kinase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984: 1112-116.
- Gerhardt W et al. Creatine kinase B-Subunit activity in serum after Immunoinhibition of M-Subunit activity. Clin Chem 1979;(25/7): 1274-1280.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burris A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

**PACKAGING**

Ref: 1001050	Cont.	20 x 2.5 mL
Ref: 1001051		10 x 15 mL

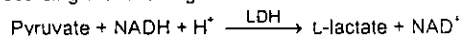


**Quantitative determination of lactate dehydrogenase (LDH) IVD**

Store at 2-8°C

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

Lactate dehydrogenase (LDH) catalyses the reduction of pyruvate by NADH, according the following reaction:



The rate of decrease in concentration of NADPH, measured photometrically, is proportional to the catalytic concentration of LDH present in the sample<sup>1</sup>.

**CLINICAL SIGNIFICANCE**

Lactate dehydrogenase (LDH) is an enzyme with wide tissue distribution in the body.

The higher concentrations of LDH are found in liver, heart, kidney, skeletal muscle and erythrocytes.

Increased levels of the enzyme are found in serum in liver disease, myocardial infarction, renal disease, muscular dystrophy and anemia<sup>1,4,5</sup>.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

**REAGENTS**

R 1 Buffer	Phosphate pH 7.8 Pyruvate	50 mmol/L 0.6 mmol/L
R 2 Substrate	NADH	0.18 mmol/L

**PREPARATION**

Working reagent (WR):

Dissolve (→) 1 tablet of R 2 in one vial of R 1.

Cap and mix gently to dissolve contents.

Stability: 2 days at 2-8°C or 12 hours at room temperature (15-25°C).

**STORAGE AND STABILITY**

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use the tablets if appears broken.

Do not use reagents over the expiration date.

**Signs of reagent deterioration:**

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 340 nm < 1.00.

**ADDITIONAL EQUIPMENT**

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 340 nm.
- Thermostatic bath at 25°C, 30°C o 37°C (± 0.1°C)
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

**SAMPLES**

Serum<sup>1</sup>. Separated from cells as rapidly as possible. Do not use oxalates as anticoagulants since they inhibit the enzyme.

Do not use haemolysed samples.

Stability: 2 days at 2-8°C.

**PROCEDURE**

1. Assay conditions:

Wavelength: ..... 340 nm  
 Cuvette: ..... 1 cm light path  
 Constant temperature ..... 25°C /30°C / 37°C

2. Adjust the instrument to zero with distilled water or air.  
 3. Pipette into a cuvette:

	25° - 30°C	37°C
WR (mL)	3.0	3.0
Sample (µL)	100	50

- Mix, incubate for 1 minute.
- Read initial absorbance (A) of the sample, start the stopwatch and read absorbances at 1 min intervals thereafter for 3 min.
- Calculate the difference between absorbances and the average absorbance differences per minute (ΔA/min).

**CALCULATIONS**

$$25° - 30°C \quad \Delta A/\text{min} \times 4925 = \text{U/L LDH}$$

$$37°C \quad \Delta A/\text{min} \times 9690 = \text{U/L LDH}$$

Units: One international unit (IU) is the amount of enzyme that transforms 1 µmol of substrate per minute, in standard conditions. The concentration is expressed in units per litre of sample (U/L).

**Temperature conversion factors**

To correct results to other temperatures multiply by:

Assay temperature	Conversion factor to		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1.00	1.33	1.92
30°C	0.75	1.00	1.43
37°C	0.52	0.70	1.00

**QUALITY CONTROL**

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

**REFERENCE VALUES<sup>1</sup>**

25°C	30°C	37°C
120-240 U/L	160-320 U/L	230-460 U/L

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**Measuring range:** From detection limit of 5.5 U/L to linearity limit of 1453 U/L. If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/10 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 10.

**Precision:**

Media (U/L)	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
	336	541	343	551
SD	3.81	5.52	4.68	6.66
CV (%)	1.13	1.02	1.36	1.21

**Sensitivity:** 1 U/L = 0,00030 ΔA/min.

**Accuracy:** Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0.99.

Regression equation: y= 1,0031x + 0,8372.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

**INTERFERENCES**

Haemolysis interferes with the assay.

Some anticoagulants such as oxalates interfere with the reaction<sup>1</sup>.

A list of drugs and other interfering substances with LDH determination has been reported by Young et al.<sup>2,3</sup>

**NOTES**

SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

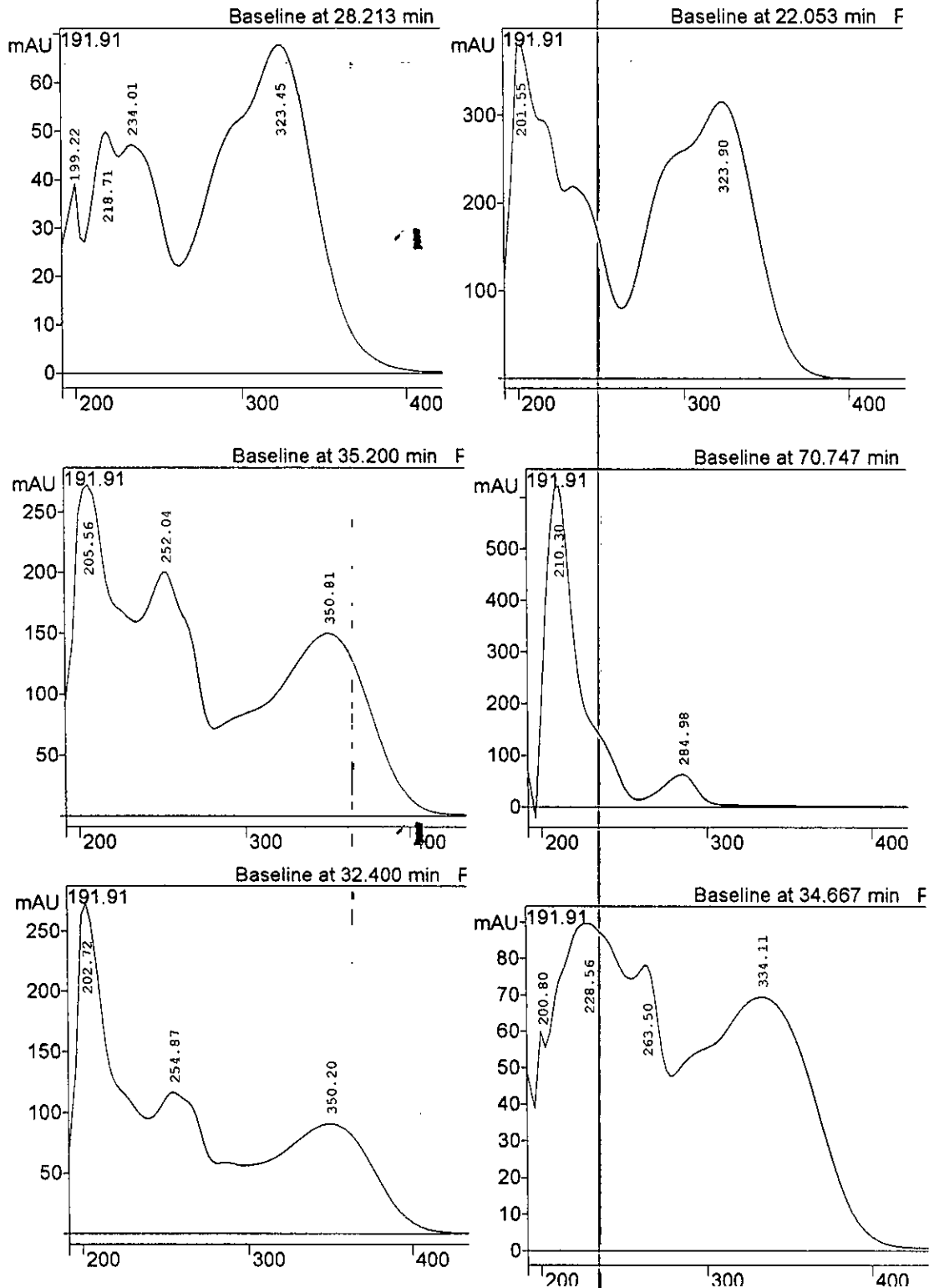
**BIBLIOGRAPHY**

- Pesce A. Lactate dehydrogenase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St-Louis, Toronto, Princeton 1984: 1124-117, 438.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1985.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1985.

**PACKAGING**

Ref: 1001260	Cont.	20 x 3 mL
--------------	-------	-----------





Les spectres UV du profile HPLC-DAD analytique de l'extrait.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- (1) **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Eds *Technique et documentation-lavoisier*, pp : 200-311.
- (2) **Pourmorad F., Hosseinimehr S.J., Shahabimajd N., 2006.** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 5(11): 1142-1145.
- (3) **Dragan A., Dušanka D-A., Drago B., Nenad T., 2003.** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chem. Acta.*, 76(1): 55-61.
- (4) **Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O., 2005.** Phytochemical constituents of some nigerian medicinal plants. *Afr. J. Biotechnol.*, 4(7): 685-688.
- (5) **Milane H., 2004.** La quercetine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat, université de Louis Pasteur, Strasbourg I*, pp : 22-36.
- (6) **Harborne J.B., 1984.** Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis. *Chapman and Hall*, 2<sup>ème</sup> édition, pp: 37-85.
- (7) **Narayana R.K., Reddy M.S., Chaluvadi M.R., Krishna D.R., 2001.** Biflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16.
- (8) **Wagner H., Bladt S., Zgainski E.M., 1984.** Plant drug analysis. Springer-Verlag, page 164.
- (9) **Ishige K., Schubert D., Sagara Y., 2001.** Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.*, 30: 433-446.
- (10) **Middleton E.Jr., Kandaswami C., Theoharis C., 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52: 673-751.



- (11) **Jaakola L., 2003.** Flavonoid biosynthesis in bilberry (*Vaccinum myrtillus* L). *Departement of biology, university of Oulu, Finland*, pp : 1-42.
- (12) **Hsu C-Y., 2006.** Antioxi-dant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. *Biological Research*, 39: 281-288.
- (13) **Marfak A., 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes: étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. *Thèse de doctorat, université de Limoges*, pp : 30-35.
- (14) **Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène, comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *L'Actualité Chimique : novembre-décembre*, pp : 91-96.
- (15) **Fontaine E., Barnand D., Schwebel C., Leverve X., 2002.** Place des antioxydants dans la nutrition du patient septique. *Réanimation*, 11 : 411-420.
- (16) **Naczk M., Shahidi F., 2004.** Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054: 95-111.
- (17) **Ré D.B., Nafia I., Nieoullon A., Kerkerian Le Goff L., Had-Aissouni L., 2005.** Stress oxydatif cérébral : les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24 : 502-509.
- (18) **Bruneton J., 1996.** Plantes toxiques, végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Eds *Technique and Documentation*, page 95.
- (19) **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II. Eds *CNRS*, pp : 643-645.
- (20) **Marinova D., Ribarova F., Atanassova M., 2005.** Total phenolic and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3) : 255-260.

- (21) McDonald S., Prenzler P.D., Antolovich M., Robards K., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73: 73-84.
- (22) Walters C., 1998. Aromathérapie, guide illustré du bien-être. Eds *Element Books Limited*, pp: 82-83.
- (23) Lamarti A., Badoc A., Carde J-P., 1993. Etude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Mill.) ; caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 132 : 73-89.
- (24) Stefanini M.B., Ming L.C., Marques M.O.M., Facanali R., Meireles M.A.A., Moura L.S., Marchese J.A., Sousa L.A., 2006. Essential oil constituents of different organs of fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu*, V 8, n. esp., pp: 193-198.
- (25) Menglan S., Watson M.F., 2005. *Foeniculum* Miller, gard.dict.Abr., ed. 4.1754. *Flora of China*, 14: 134.
- (26) Baba Aissa F., 2000. Encyclopédie des plantes utiles, flore d'Algérie et du Maghreb. Eds *EDAS*, page 105.
- (27) Wichtl M., Anton R., 1999. Plantes thérapeutiques. Eds *Technique and Documentation*, pp : 187-189.
- (28) Choi E-M., Hwang J-K., 2004. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia*, 75: 557-565.
- (29) Oktay M., Gülçin İ., Küfrevioğlu Ö.İ., 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologies*, 36: 263-271.
- (30) Soliman F.M., Shehata A.H., Khaleel A.E., Ezzat S.M., 2002. An acylated kaempferol glycoside from flowers of *Foeniculum vulgare* and *Foeniculum dulce*. *Molecules*, 7: 245-251.

- (31) **Diwakar J., 2000.** Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives (revue). *Journal of Nuclear Cardiology*, 7(1) : 53-62.
- (32) **Andreadou I., Sigala F., Iliodromitis E.K., Papaefthimion M., Sigalas C., Aligiannis N., Savvari P., Gorgoulis V., Papalabros E., Kremastinos D.T., 2007.** Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Nuclear and Cellular Cardiology*, 42: 549-558.
- (33) **Quiles J.L., Huertas J.R., Battino M., Mataix J., Ramirez-Tortosa M.C., 2002.** Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, 180 : 79-95.
- (34) **Association Française des Enseignants de Chimie Thérapeutique (AFECT), 2004.** Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers. Eds *Technique and Documentation, Paris*, pp : 363-397.
- (35) **Mross K., Mayer V., Hamm K., Burk K., Hossfeld D.K., 1990.** Pharmacokinetics and metabolism of iodo-doxorubicin and doxorubicin in humans. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 39: 507-513.
- (36) **Boots A.W., Haenen G.R.M.M., Bast A., 2008.** Health effects of quercetin : From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585 : 325-337.
- (37) **Maluf F.C., Spriggs D., 2002.** Anthracyclines in the treatment of gynecologic malignancies (revue). *Gynecologic Oncology*, 85: 18-31.
- (38) **Lahouel M., 1985.** Etude de la toxicité hématologique, hépatique et rénale de deux médicaments anticancéreux la doxorubicine et le CCNU chez le rat. *Thèse de doctorat, université de Rouen, France*, page 6.

- (39) Zhou Q., Clowbay B., 2002. Determination of doxorubicin and its metabolites in rat serum and bile by LC: application to preclinical pharmacokinetic studies. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30: 1063-1074.
- (40) Hande K.R., 1998. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II (revue). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400: 173-184.
- (41) Kamoun P., Lavoigne A., de Verneuil H., 2003. Biochimie et biologie moléculaire. Eds Flammarion Médecine-sciences, pp : 114-115.
- (42) Campbell P.N., Smith A.D., 2002. Biochimie illustrée. Eds Maloine, pp: 143-145.
- (43) Cuvelier I., 2006. Les marqueurs cardiaques. *Laboratoires Pasteur Cerba, France*, la lettre, n° 61.
- (44) Desjarlais F., 2005. Fiches cliniques, chroniques, lactate déshydrogénase. *Ann. Biol. Clin. Qué.*, 42(3) : 48-50.
- (45) Desjarlais F., 2004. Fiches cliniques, chroniques, créatine kinase. *Ann. Biol. Clin. Qué.*, 41(1) : 28-30.
- (46) Desjarlais F., 2004. Fiches cliniques, chroniques, aspartate aminotransférase. *Ann. Biol. Clin. Qué.*, 43(1) : 40-43.
- (47) Boucharga T., Kessous C., 1990. Enzymologie biochimie métabolique. Eds Office des Publications Universitaires (OPU), pp : 100-101.
- (48) Scheibmeir H.D., christensen K., Whitaker S.H., Jegaethesan J., Clancy R., Pierce J.D., 2005. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 21: 24-28.

- (49) **Januel C., 2003.** Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète, étude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. *Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon*, pp : 41-57.
- (50) **Lu C., Song G., Lin J-M., 2006.** Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(10): 985-995.
- (51) **Savard S., 2005.** Etude de la surexpression *in vivo* de la monoxyde d'azote synthase endothéliale chez le rat urémique : Effets sur la dysfonction endothéliale en insuffisance rénale. *Mémoire de l'université de Laval*, pp : 42-45.
- (52) **Fiorucci S., 2006.** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thèse de doctorat, université de Nice-Sofia Antipolis*, pp : 19-20.
- (53) **Soares A.F., 2005.** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : Adiponectine et prostaglandines. *Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon*, pp : 35-43.
- (54) **Girotti-Chanu C., 2006.** Etude de la lipolyse et de la synthèse de composés du derme sous l'effet de la cirsimarine, flavone extraite de *Microtea debilis*. *Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon*, pp : 36-37.
- (55) **Menvielle-Bourge F.J., 2005.** Superoxyde dismutase (SOD), a powerful antioxidant, is now available orally. *Phytothérapie*, 3: 1-4.
- (56) **Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interaction*, 160: 1-40.
- (57) **Favier A., 2003.** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité Chimique*, novembre-décembre, pp : 108-115.

- (58) **Koechlin-Ramonatxo C., 2006.** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20 : 165-177.
- (59) **Singh R.P., Sharad S., Kapur S., 2004.** Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative diseases: Relevance of dietary antioxidants. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*, 5(3): 218-221.
- (60) **Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., 1979.** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2): 351-358.
- (61) **Ellman G.L., 1959.** Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*, 82: 70-77.
- (62) **Servais S., 2004.** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. *Thèse de doctorat, université Claude Bernard-Lyon 1, France*, page 30.
- (63) **Badoc A., Lamarti A., Bourgeois G., Carde J-P., Deffieux G., 1995.** Hybridation intraspécifique chez le fenouil *Foeniculum vulgare* MILL. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 134 : 107-126.
- (64) **Chopra S., Pillai K.K., Husain S.Z., Giri D.K., 1995.** Propolis protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 62: 190-198.
- (65) **Harborne J.B., 1975.** The flavonoids, Vol. 1. Eds *Chapman and Hall*.
- (66) **Kähkönen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J-P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., 1999.** Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3954-3962.
- (67) **Sadzuka Y., Sugiyama T., Shimoi K., Kinoshita N., Hirota S., 1997.** Protective effect of flavonoids on doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology letters*, 92: 1-7.

- (68) **Abidli N., 2004.** Effect of verapamil on resistance to doxorubicin in mice bearing Ehrlich Ascites Carcinoma cells. Its influence on dox-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity. *Thèse de doctorat d'état de l'université de Constantine*, pp: 28-39.
- (69) **Goh F. Y-M., Kong H.L., Wang C.H., 2001.** Simulation of the delivery of doxorubicin to Hepatoma. *Pharmaceutical Research*, 18(6): 761-770.
- (70) **Jackson T.L., 2003.** Intracellular accumulation and mechanism of action of doxorubicin in a spatio-temporal tumor model. *J. Theor. Biol.*, 220: 201-213.
- (71) **Tokarska-Schlattner M., Zaugg M., Zuppinger C., Wallimann T., Schlattner U., 2006.** New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity : the critical role of cellular energetic. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41: 389-405.
- (72) **Bonilla E., Del Mazo J., 2003.** Deregulation of gene expression in fetal oocytes exposed to doxorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 65: 1701-1707.
- (73) **Mizutani H., Toda-Oikawa S., Hiraku Y., Kojima M., Kawanishi S., 2005.** Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sciences*, 76: 1439-1453.
- (74) **Václavíková R., Kondrová E., Ehrlichová M., Boumendjel A., Kovář J., Stopka P., Souček P., Gut I., 2008.** The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16: 2034-2042.
- (75) **Yilmaz S., Atessahin A., Sahna E., Karahan I., Ozer S., 2006.** Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 218: 164-171.
- (76) **Kaiserová H., Šimůnek T., Van der Vijgh W. J. F., Bast A., Kvasničková E., 2007.** Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity : Role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772 : 1065-1074.

- (77) Han X., Ren D., Fan P., Shen T., Lou H., 2008. Protective effects of naringenin-7-O-glucoside on doxorubicin-induced apoptosis in H9C2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 581 : 47-53.
- (78) Bast A., Kaiserová H., Den Hartog G.J.M., Haenen G.R.M.M., Van der Vijgh W.J.F., 2007. Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity : Flavonoids. *Cell Biol Toxicol*, 23 : 39-47.
- (79) Barnabé N., Zastre J.A., Venkataram S., Hasinoff B.B., 2002. Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 33, No. 2 : 266-275.
- (80) Singh G., Singh A.T., Abraham A., Bhat B., Mukherjee A., Verma R., Agarwal S. K., Jha S., Mukherjee Rama, Burman A.C., 2008. Protective effects of *Terminalia arjuna* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 117: 123-129.
- (81) Choi E.H., Chang H-J., Cho J.Y., Chun H.S., 2007. Cytoprotective effect of anthocyanins against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cardiomyocytes in relation to their antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45 : 1873-1881.
- (82) Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U., 2006. Alterations in myocardial energy metabolism induced by the anti-cancer drug doxorubicin. *C. R. Biologies*, 329 : 657-668.
- (83) Atanasiu R.L., 1996. Etude du mécanisme de cardioprotection de ceruloplasmine contre le stress oxydatif. *Thèse de doctorat de philosophie de l'université de Montréal, Canada*, pages : 16, 23.
- (84) Liu X., 2003. Protection of Pifithrin- $\alpha$  and Melatonin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Thèse de doctorat de philosophie de l'université d'East Tennessee, USA*, pages : 22, 23.
- (85) Hill M.F., 1998. Role of oxidative stress in heart failure subsequent to myocardial infraction. *Thèse de doctorat de philosophie de l'université de Manitoba*, page 27.



- (86) Li T., 2000. Early changes in myocardial antioxidant enzymes due to adriamycin and modulation by probucol. *Thèse de doctorat de philosophie de l'université de Manitoba*, page 7.
- (87) Kelishomi R.B., Ejtemaemehr S., Tavangar S.M., Rahimian R., Mobarakeh J. L., Dehpour A.R., 2008. Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Toxicology*, 243 : 96-104.
- (88) Bagchi D., Sen C.K., Ray S.D., Das D.K., Bagchi M., Preuss H.G., Vinson J.A., 2003. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation research*, 523-524: 87-97.
- (89) Jiang B., Zhang L., Li M., Wu W., Yang M., Wang J., Guo D-A., 2008. Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 46 : 1510-1515.
- (90) Riad A., Bien S., Gratz M., Escherl F., Westermann D., Heimesaat M.M., Bereswill S., Krieg T., Felix S.B., Schultheiss H.P., Kroemer H.K., Tschöpe C., 2008. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *European Journal of Heart Failure*, 10 : 233-243.
- (91) Mitra M.S., Donthamsetty S., White B., Latendresse J.R., Mehendale H.M., 2007. Mechanism of protection of moderately diet restricted rats against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225 : 90-101.
- (92) Mukhopadhyay P., Bátkai S., Rajesh M., Czifra N., Harvey-White J., Haskó G., Zsengeller Z., Gerard N.P., Liauder L., Kunos G., Pacher P., 2007. Pharmacological inhibition of CB<sub>1</sub> Cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(6) : 528-536.
- (93) Ferreira A.L.A., Salvadori F.D.M., Nascimento M.C.M.O., Rocha N.S., Correa C. R., Pereira E.J., Matsubara L.S., Matsubara B.B., Ladeira M.S.P., 2007. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutation Research*, 631 : 26-35.

- (94) **Chen Y., Daosukho C., Opii W.O., Turner D.M., Pierce W.M., Klein J.B., Vore M., Butterfield D.A., St. Clair D.K., 2006.** Redox proteomic identification of oxidized cardiac proteins in adriamycin-treated mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 41 : 1470-1477.
- (95) **Mohan I.K., Kumar K.V., Naidu M. U. R., Khan M., Sundaram C., 2006.** Protective effect of CardiPro against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Phytomedicine*, 13 : 222-229.
- (96) **Mohamed H.E., El-Swefy S.E., Hagar H.H., 2000.** The protective effect of glutathione administration on adriamycin-induced acute cardiac toxicity in rats. *Pharmacological Research*, 42(2) : 115-121.
- (97) **Oliveira P.J., Bjork J.A., Santos M.S., Leino R.L., Froberg M.K., Moreno A.J., Wallace K.B., 2004.** Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 200 : 159-168.
- (98) **Den Hartog G.J.M., Haenen G.R.M.M., Boven E., Van der Vijgh W.J.F., Bast A., 2004.** Lecithinized copper,zinc-superoxide dismutase as a protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 194 : 180-188.
- (99) **Abdel-wahab M.H., El-Mahdy M.A., Abd-Ellah M.F., Helal G.K., Khalifa F., Hamada F.M.A., 2003.** Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. *Pharmacological Research*, 48 : 461-465.
- (100) **Yagmurca M., Fadillioglu E., Erdogan H., Ucar M., Sogut S., Irmak M.K., 2003.** Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacological Research*, 48 : 377-382.
- (101) **Dzięgiel P., Jethon Z., Suder E., Sopel M., Rabczyński J., Surowiak P., Zabel M., 2002.** Role of exogenous melatonin in reducing the cardiotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53 : 433-439.

- (102) Chakrabarti K.B., Hopewell J.W., Wilding D., Plowman P.N., 2001. Modification of doxorubicin-induced cardiotoxicity : effect of essential fatty acids and ICRF-187 (dexrazoxane). *European Journal of Cancer*, 37 : 1435-1442.
- (103) Zhou S., Palmeira C.M., Wallace K.B., 2001. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicology Letters*, 121 : 151-157.
- (104) Sacco G., Bigioni M., Evangelista S., Goso C., Manzini S., Maggi C.A., 2001. Cardioprotective effects of zofenopril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat. *European Journal of Pharmacology*, 414 : 71-78.
- (105) Cao Y., Kennedy R., Klimberg V.S., 1999. Glutamine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Journal of Surgical Research*, 85 : 178-182.
- (106) Kozluca O., Oclay E., Sürücü S., Güran Z., Kulaksiz T., Üskent N., 1996. Prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity by catechin. *Cancer Letters*, 99 : 1-6.
- (107) Kim C., Nam S-W., Choi D-Y., Choi J-H., Park E-S., Jhoo W-K., Kim H-C., 1997. A new antithrombotic agent, Aspalatone, attenuated cardiotoxicity induced by doxorubicin in the mouse; possible involvement of antioxidant mechanism. *Life sciences*, 60(4/5) : 75-82.
- (108) Boucek R.J.Jr., Miracle Ann., Anderson M., Engelman R., Atkinson J., Dodd D. A., 1999. Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 31 : 1453-1446.
- (109) Saito K., Takeda K., Okamoto S., Okamoto R., Makino K., Tameda Y., Nomura Y., Maeda H., Ichihara T., Nakano T., 2000. Detection of doxorubicin cardiotoxicity by using iodine-123 BMIPP early dynamic SPECT : Quantitative evaluation of early abnormality of fatty acid metabolism with the Rutland method. *Journal of Nuclear Cardiology*, 7(6) : 553-561.

- (110) Luo X., Reichetzer B., Trines J., Benson L.N., Lehotay D.C., 1999. L-Carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9/10) : 1158-1165.
- (111) Falcone G., Filippelli W., Mazzarella B., Tufano R., Mastronardi P., Filippelli A., Berrino L., Rossi F., 1998. Cardiotoxicity of doxorubicin : Effects of 21-aminosteroids. *Life sciences*, 63(17) : 1525-1532.
- (112) DeAtley S. M., Aksenov M.Y., Aksenova M.V., Jordan B., Carney J.M., Butterfield D.A., 1999. Adriamycin-induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture. *Toxicology*, 135 : 51-62.
- (113) Al-Nasser I.A., 1998. In vivo prevention of adriamycin cardiotoxicity by cyclosporine A or FK506. *Toxicology*, 131 : 175-181.
- (114) Mross K., Niemann B., Massing U., Dreves J., Unger C., Bhamra R., Swenson C.E., 2004. Pharmacokinetics of liposomal doxorubicin (TLC-D99; Myocet) in patients with solid tumors : An open label, single-dose study. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 54 : 514-524.
- (115) Goormaghtigh E., Ruyschaert J-M., 1984. Role of the cardiolipin-adriamycin complex in mitochondrial toxicity. *Colloids and Surfaces*, 10 : 239-247.
- (116) Lahouel M., Boulkour S., Segueni N., Fillastre J-P., 2004. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*, 52 : 314-322.
- (117) Duarte J., Perez-Vizcaíno F., Jiménez J., Tamargo J., Zarzuelo A., 2001. Flavonoids and cardiovascular diseases. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in natural products chemistry*, 25 : 565-605.

- (118) **Le Marchand L., 2002.** Cancer preventive effects of flavonoids-a review. *Biomed. Pharmacother.*, 56 : 296-301.
- (119) **Outomuro D., Grana D.R., Azzato F., Milei J., 2007.** Adriamycin-induced myocardial toxicity : New solutions for an old problem. *International Journal of Cardiology*, 117 : 6-15.
- (120) **Jiang P., Burczynski F., Campbell C., Pierce G., Austria J.A., Briggs C.J., 2007.** Rutin and Flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F. tataricum*, and *F. homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, 40 : 356-364.
- (121) **Yi Z., Yu Y., Liang Y., Zeng B., 2008.** In vitro antioxidant activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT*, 41 : 597-603.
- (122) **Mariani C., Braca A., Vitalini S., De Tommasi N., Visioli F., Fico G., 2008.** Flavonoid characterization and *in vitro* antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae). *Phytochemistry*, 69 : 1220-1226.
- (123) **Yuan L-P., Chen F-H., Ling L., Dou P-F, Bo H., Zhong M-M., Xia L-J., 2008.** Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology*, 116 : 539-546.
- (124) **Leong C.N.A., Tako M., Hanashiro I., Tamaki H., 2008.** Antioxidant flavonoid glycosides from the leaves of *Ficus pumila* L. *Food chemistry*, 109 : 415-420.
- (125) **Min K., Ebeler S.E., 2008.** Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology*, 46 : 96-104.

- (126) Narváez-Mastache J.M., Novillo F., Delgado G., 2008. Antioxidant aryl-prenylcoumarin, flavan-3-ols and flavonoids from *Eysenhardtia subcoriacea*. *Phytochemistry*, 69 : 451-456.
- (127) Wang B., Peng L., Zhu L., Ren P., 2007. Protective effect of total flavonoids from *Spirodela polyrrhiza* (L.) *Schleid* on human umbilical vein endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60 : 36-40.
- (128) Tan L., Zhang X-F., Yan B-Z., Shi H-M., Du L-B., Zhang Y-Z., Wang L-F., Tang Y-L., Liu Y., 2007. A novel flavonoid from *Lespedeza virgata* (Thunb.) DC.. Structural elucidation and antioxidative activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17 : 6311-6315.
- (129) Estany S., Palacio J.R., Barnadas R., Sabes M., Iborra A., Martínez P., 2007. Antioxidant activity of *N*-acetylcysteine, flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol on endometrial cells in culture. *Journal of Reproductive Immunology*, 75 : 1-10.
- (130) Dufour C., Loonis M., Dangles O., 2007. Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radical Biology and Medicine*, 43 : 241-252.
- (131) Chaudhuri S., banerjee A., Basu K., Sengupta B., Sengupta P.K., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins : Antioxidant and antihemolytic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 : 42-48.
- (132) Kampkötter A., Nkwonkam G.C., Zurawski R.F., Timpel C., Chovolou Y., Wätjen W., Kahl R., 2007. Investigations of protective effects of the flavonoids quercetin and rutin on stress resistance in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*, 234 : 113-123.

- (133) Calgarotto A.K., Miotto S., Honório K.M., da Silva A.B.F., Marangoni S., Silva J.L., Comar Jr. M., Oliveira K.M.T., Da Silva S.L., 2007. A multivariate study on flavonoid compounds scavenging the peroxy nitrite free radical. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 808 : 25-33.
- (134) D'Abrosca B., Pacifico S., Cefarelli G., Mastellone C., Fiorentino A., 2007. 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 104 : 1333-1337.
- (135) Tripoli E., La Guardia M., Giammanco S., Di Majo D., Giammanco M., 2007. Citrus flavonoids : Molecular structure, biological activity and nutritional properties : A review. *Food Chemistry*, 104 : 466-479.
- (136) Susanti D., Sirat H.M., Ahmad F., Mat Ali R., Aimi N., Kitajima M., 2007. Antioxidant and cytotoxic flavonoids from the flowers of *Melastoma malabathricum* L. *Food Chemistry*, 103 : 710-716.
- (137) Pourcel L., Routaboul J-M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I., 2006. Flavonoid oxidation in plants : from biochemical properties to physiological functions. *TRENDS in Plant Science*, Vol. 12, No. 1 : 29-36.
- (138) Kanakis C.D., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., Diamantoglou S., Tajmir-Riahi H.A., 2006. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 798 : 69-74.
- (139) Tsimogiannis D.I., Oreopoulou V., 2006. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7 : 140-146.
- (140) Zhao M., Yang B., Wang J., Li B., Jiang Y., 2006. Identification of the major flavonoids from pericarp tissues of lychee fruit in relation to their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 98 : 539-544.

- (141) Rosenberg Zand R.S., Jenkins D.J.A., Diamandis E.P., 2002. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers –revue. *Journal of Chromatography B*, 777 : 219-232.
- (142) Cos P., Calomme M., Pieters L., Vlietinck A.J., Vanden Berghe D., 2000. Structure-activity relationship of flavonoids as antioxidant and pro-oxidant compounds. *Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry*, 22 : 307-341.
- (143) Manach C., Regerat F., Texier O., Agullo G., Demigne C., Remesy C., 1996. Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutrition Research*, 16(3) : 517-544.
- (144) Formica J.V., Regelson W., 1995. Review of the biology of Quercetin and Related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.*, 33(12) : 1061-1080.
- (145) Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7) : 933-956.
- (146) Li L., Wei D-Q., Wang J-F., Chou K-C., 2007. Computational studies of the binding mechanism of calmodulin with chrysin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358 : 1102-1107.
- (147) Marín F.R., Frutos M.J., Pérez-Alvarez J.A., Martínez-Sánchez F., Del Río J.A., 2002. Flavonoids as nutraceuticals: Structural related antioxidant properties and their role on ascorbic acid preservation. *Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry*, 26 : 741-778.
- (148) Aruoma O.I., Bahorun T., Jen L-S., 2003. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research*, 544 : 203-215.



- (149) **Slade D., Ferreira D., Marais J.P.J., 2005.** Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids-revue. *Phytochemistry*, 66 : 2177-2215.
- (150) **Challem J.J., 1999.** Toward a new definition of essential nutrients: is it now time for a third 'vitamin' paradigm? *Medicinal Hypotheses*, 52(5) : 417-422.
- (151) **Haenen G.R.M.M., Arts M.J.T.J., Bast A., Coleman M.D., 2006.** Structure and activity in assessing antioxidant activity in vitro and in vivo A critical appraisal illustrated with the flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 21 : 191-198.
- (152) **Lee-Hilz Y.Y., Ter Borg S., Van Berkel W.J.H., Rietjens I.M.C.M., Aarts J. M.M.J.G., 2008.** Shifted concentration dependency of EpRE- and XRE-mediated gene expression points at monofunctional EpRE-mediated induction by flavonoids at physiologically relevant concentrations. *Toxicology in Vitro*, 22 : 921-926.
- (153) **Hagen S.F., Solhaug K.A., Bengtsson G.B., Borge G.I.A., Bilger Wolfgang, 2006.** Chlorophyll fluorescence as a tool for non-destructive estimation of anthocyanins and total flavonoids in apples. *Postharvest Biology and Technology*, 41 : 156-163.
- (154) **Arora A., Byrem T.M., Nair M.G., Strasburg G.M., 2000.** Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1) : 102-109.
- (155) **Hayashi H., Hiroaka N., Ikeshiro Y., Yamamoto H., 1996.** Organ specific localization of flavonoids in *Glycyrrhiza glabra* L. *Plant Science*, 116 : 233-238.
- (156) **Scheidt H.A., Pampel A., Nissler L., Gebhardt R., Huster D., 2004.** Investigation of the membrane localization and distribution of flavonoids by high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1663 : 97-107.

- (157) Zhang B., Safa R., Rusciano D., Osborne N.N., 2007. Epigallocatechin gallate, an active ingredient from green tea, attenuates damaging influences to the retina caused by ischemia/reperfusion. *Brain research*, 1159 : 40-53.
- (158) Triantafyllou A., Mylonis I., Simos G., Bonanou S., Tsakalof A., 2008. Flavonoids induce HIF-1 $\alpha$  but impair its nuclear accumulation and activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 44 : 657-670.
- (159) Hayman M.M., Kouassi G.K., Anantheswaran R.C., Floros J.D., Knabel S.J., 2008. Effect of water activity on inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactate dehydrogenase during high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology*, 124 : 21-26.
- (160) Wollenweber E., Dietz V.H., 1981. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry*, 20(5) : 869-932.
- (161) Biolley J-P., Jay M., Viricel M-R., 1994. Flavonoid diversity and metabolism in 100 *Rosa X Hybridia* cultivars. *Phytochemistry*, 35(2) : 413-419.
- (162) Ohgami N., Upadhyay S., Kabata A., Morimoto K., Kusakabe H., Suzuki H., 2007. Determination of the activities of glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase in a microfluidic system. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 : 1330-1336.
- (163) Kuo S-M., 1996. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoids on human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 110 : 41-48.
- (164) Ma G., Yang C., Qu Y., Wei H., Zhang T., Zhang N., 2007. The flavonoid component isorhamnetin in vitro inhibits proliferation and induces apoptosis in Eca-109 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 167 : 153-160.
- (165) Schittko U., Burghardt F., Fiedler K., Wray V., Proksch P., 1999. Sequestration and distribution of flavonoids in the common blue butterfly *Polyommatus icarus* reared on *Trifolium repens*. *Phytochemistry*, 51 : 609-614.

- (166) **Martínez Valderrama J.C., 2000.** Distribution of flavonoids in the Myristicaceae. *Phytochemistry*, 55 : 505-511.
- (167) **Joussem A.M., Rohrschneider K., Reichling J., Kirchof B., Kruse F.E., 2000.** Treatment of corneal neovascularization with dietary isoflavonoids and flavonoids. *Exp. Eye Res.*, 71 : 483-487.
- (168) **Casagrande F., Darbon J-M., 2001.** Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochemical Pharmacology*, 61 : 1205-1215.
- (169) **Tapiero H., Tew K.D., Nguyen Ba G., Mathé G., 2002.** Polyphenols : do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.*, 56 : 200-207.
- (170) **Youdim K.A., Qaiser M.Z., Begley D.J., Rice-Evans C.A., Joan Abbott N., 2004.** Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(5) : 592-604.
- (171) **D'Aniello A., Fisher G., Migliaccio N., Cammisa G., D'Aniello E., Spinelli P., 2005.** Amino acids and transaminases activity in ventricular CSF and in brain of normal and Alzheimer patients. *Neuroscience Letters*, 388 : 49-53.
- (172) **Prasain J.K., Wang C-C., Barnes S., 2004.** Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(9) : 1324-1350.
- (173) **Rusak G., Gutzeit H.O., Müller J.L., 2005.** Structurally related flavonoids with antioxidative properties differentially affect cell cycle progression and apoptosis of human acute leukemia cells. *Nutrition Research*, 25 : 141-153.
- (174) **Abrahamse S.L., Kloots W.J., Van Amelsvoort J.M.M., 2005.** Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. *Nutrition Research*, 25 : 307-317.

- (175) Martens S., Mithöfer A., 2005. Flavones and flavones synthases. *Phytochemistry*, 66 : 2399-2407.
- (176) Moon Y.J., Wang X., Morris M.E., 2006. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism-mini revue. *Toxicology in vitro*, 20 : 187-210.
- (177) Seyoum A., Asres K., El-Fiky F. K., 2006. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67 : 2058-2070.
- (178) Wu T., Guan Y., Ye J., 2007. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chemistry*, 100 : 1573-1579.
- (179) Riihinen K., Jaakola L., Kärenlampi S., Hohtola A., 2008. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry*, 110 : 156-160.
- (180) Naruszewicz M., Łaniewska I., Millo B., Dłużniewski M., 2007. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). *Atherosclerosis*, 194 : e179-e184.
- (181) Mbaveng A.T., Ngameni B., Kuete V., Simo I.K., Ambassa P., Roy R., Bezabih M., Etoa F-X., Ngadjui B.T., Abegaz B.M., Marion Meyer J.J., Lall N., Beng V.P., 2008. Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 116 : 483-489.
- (182) Kuete V., Mbaveng A.T., Tsafack M., Beng V.P., Etoa F-X., Nkengfack A.E., Marion Meyer J.J., Lall N., 2008. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama engleriana* (Melianthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 115 : 494-501.
- (183) Hande K.R., 2008. Topoisomerase II inhibitors. *Update on Cancer Therapeutics*, 3 : 13-26.

- (184) Samaras S.E., Shi Y., Davidson J.M., 2007. Novel actions of cardiac ankyrin repeat protein. *International Congress Series*, 1302 : 53-64.
- (185) Bigioni M., Salvatore C., Bullo A., Bellarosa D., Iafrate E., Animati F., Capranico G., Goso C., Maggi C.A., Pratesi G., Zunino F., Manzini S., 2001. A comparative study of cellular and molecular pharmacology of doxorubicin and MEN 10755, a disaccharide analogue. *Biochemical Pharmacology*, 62 : 63-70.
- (186) Tomaki M., Sugiura H., Koarai A., Komaki Y., Akita T., Matsumoto T., Nakanishi A., Ogawa H., Hattori T., Ichinose M., 2007. Decreased expression of antioxidant enzymes and increased expression of chemokines in COPD lung. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, 20 : 596-605.
- (187) Laguerre M., Lecomte J., Villeneuve P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46 : 244-282.
- (188) Annabi Berrahal A., Nehdi A., Hajjaji N., Gharbi N., El-Fazâa S., 2007. Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead. *Comptes Rendus Biologies*, 330 : 581-588.
- (189) Jeong Choi E., 2006. The prooxidant, rather than antioxidant, acts of daidzein in vivo and in vitro: Daidzein suppresses glutathione metabolism. *European Journal of Pharmacology*, 542 : 162-169.
- (190) Flourie F., Arab K., Rossary A., Steghens J-P., 2006. A model of OH-mediated in vitro lipid peroxidation: application to the evaluation of four antioxidants. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21 : 229-233.
- (191) Çay A., Alver A., Küçük M., Işık O., Eminağaoğlu Selçuk M., Karahan Caner S., Değer O., 2006. The effects of N-acetylcysteine on antioxidant enzyme activities in experimental testicular torsion. *Journal of Surgical Research*, 131 : 199-203.

- (192) Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J-O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et métabolisme*, 16 : 233-239.
- (193) Georgeson G.D., Szóny B.J., Streitman K., Varga I.Sz., Kovács A., Kovács L., László A., 2002. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 103, 136-139.
- (194) Maggi-Capeyron M-F., Cases J., Badia E., Cristol J-P., Rouanet J-M., Besançon P., Leger C.L., Descomps B., 2002. A diet high in cholesterol and deficient in vitamin E induces lipid peroxidation but does not enhance antioxidant enzyme expression in rat liver. *Journal of Nutritional biochemistry*, 13 : 296-301.
- (195) Mialocq P., Oiry J., Puy J.Y., Rimaniol A.C., Imbach J.L., Dormont D., Clayette P., 2001. Métabolisme oxydatif dans les macrophages infectés par le VIH : rôle du glutathion et approche pharmacologique. *Pathol. Biol.*, 49 : 567-571.
- (196) Ghisolfi-Marque A., Boyer M-J., Vellas B., Thouvenot J-P., Albarède J-L., Ghisolfi J., 1996. Activité anti-oxydante, lipoperoxydation et vieillissement chez l'homme. *Nutr. Clin. Métabol.*, 10 : 151-160.
- (197) Tessier F., Marconnet P., 1995. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice-revue. *Science and Sports*, 10 : 1-13.
- (198) Gamieldien K., Maritz G.S., 2008. Influence of maternal nicotine exposure during gestation and lactation on lactate dehydrogenase isoenzyme profile and transcript levels in developing neonatal rat lung. *Pathophysiology*, 15 : 1-8.
- (199) Pereira Oliveira P.R., Rodrigues-Junior V., Rech V.C., Duval Wannmacher C. M., 2007. Cystine inhibits creatine kinase activity in pig retina. *Archives of Medicinal Research*, 38 : 164-169.

- (200) **Feng S., Xu Z., Yan Y-B., 2008.** Blocking creatine kinase refolding by trace amounts of copper ions. *Journal of Inorganic biochemistry*, 102 : 928-935.
- (201) **Abnous K., Storey K.B., 2007.** Regulation of skeletal muscle creatine kinase from a hibernating mammal. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 467 : 10-19.

## Résumé

L'étude chimique analytique (tests d'identification, dosage des flavonoïdes totaux et des phénols totaux, CCM et HPLC-DAD analytiques) effectuée sur l'extrait des flavonoïdes totaux de la partie aérienne de la *Foeniculum vulgare* Mill. a montrée la nature phénolique de cet extrait ( $304.23 \pm 7.9$  équivalent d'acide gallique /g extrait), la présence des flavonoïdes ( $13.9 \pm 1.22$  équivalent de quercetine /g extrait) et des tanins hydrolysables dans l'extrait et la présence très probable d'acides phénols.

Le traitement des rats *wistar* par cet extrait par voie orale à une dose de 100 mg/kg/j pendant 7 jours a prévenu contre la cardiotoxicité (stress oxydatif) induite par la doxorubicine, administré aux rats par voie intraveineuse à une seule dose de 10 mg/kg deux jours après l'administration total de l'extrait.

Après 1, 7 et 14 jours de l'administration de la doxorubicine, l'extrait a empêché l'augmentation des deux activités des deux biomarqueurs cardiaques la lactate déshydrogénase (LDH) et la créatine phosphokinase (CPK), a diminué le taux du malondialdéhyde (MDA) cytosolique cardiaque et il a empêché la diminution du taux du glutathion (GSH) cytosolique cardiaque respectivement, indiquant son rôle préventif dans chaque cas.

Ce même extrait a piéger, *in vitro*, le radical libre stable DPPH° à 100 µM. A la concentration de 1 mg/ml, l'extrait a réduit presque 27.5% de ce radical libre.

**Mots clefs :** flavonoïdes, *Foeniculum vulgare* Mill., doxorubicine, cardiotoxicité, stress oxydatif, effet antioxydant.

## ملخص

بينت الدراسة الكيميائية التحليلية (اختبارات الكشف، معايرة الفلافونويدات الكلية و الفينولات الكلية، CCM و HPLC-DAD تحليليتان) المنجزة علي مستخلص الفلافونويدات الكلية للجزء الهوائي لنبات *Foeniculum vulgare* Mill. الطبيعية الفينولية لهذا المستخلص ( $304.23 \pm 7.9$  مغ مكافئ من حمض قاليك /غ مستخلص)، احتواء المستخلص على الفلافونويدات ( $13.9 \pm 1.22$  مغ مكافئ من كرسيتين /غ مستخلص) و التانينات و احتوائه الجذ محتمل على الأحماض الفينولية.

معالجة فئران ويستار بهذا المستخلص عن طريق الفم بجرعة 100 مغ/كغ/يوم و لمدة 7 أيام لعب دور وقائي ضد السمية القلبية (الإجهاد التأكسدي) المولدة من طرف الدوكسوروبيسين الذي أعطى للفئران داخل الشريان بجرعة وحيدة قدرها 10 مغ/كغ و ذلك بعد يومين من الإغذاء الكلي للمستخلص.

بعد يوم، 7 أيام و 14 يوما من إعطاء الدوكسوروبيسين، قام المستخلص بمنع ارتفاع نشاطية العلامتان الإنزيميتان القلبيتان، اللاكتات ديهيدروجيناز (LDH) و الكرياتين فوسفوكيناز (CPK)، و قام بتخفيض نسبة المألون ثنائي الالدهيد (MDA) السيتوزولي القلبي و قام كذلك بمنع انخفاض نسبة الجلوتاثيون (GSH) السيتوزولي القلبي على الترتيب، مبينا بذلك دوره الوقائي في كل حالة.

و قام هذا المستخلص كذلك بإرجاع الجذر الحر المستقر (DPPH°) ذو 100 ميكرومولاري، *in vitro*، مبينا بذلك خاصيته المضادة للأكسدة. عند التركيز 1 مغ/مل، قام المستخلص بإرجاع نحو 27.5% من هذا الجذر الحر.

**كلمات مفتاحية :** الفلافونويدات، *Foeniculum vulgare* Mill.، الدوكسوروبيسين، السمية القلبية، الإجهاد التأكسدي، الفعل المضاد للأكسدة.

## Abstract

The analytical chemical study (identification tests, quantitative determination of the total flavonoids and the total phenols contents, analytical CCM and HPLC-DAD) carried out on the total flavonoids extract of the *Foeniculum vulgare* Mill. aerial part showed the phenolic nature of this extract ( $304.23 \pm 7.9$  mg gallic acid equivalent /g extract), the presence of flavonoids ( $13.9 \pm 1.22$  mg quercetin equivalent /g extract) and tannins in the extract and the very probable presence of phenolic acids.

Treatment of *wistar* rats by this extract at a dose of 100 mg/kg/day during 7 days prevented against doxorubicin-induced cardiotoxicity (oxidative stress), administrated by intravenous way at a single dose of 10 mg/kg two days after the total administration of the extract.

After 1, 7 and 14 days of the administration of doxorubicin, the extract prevented the increasing of the two cardiac enzymatic biomarkers, lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CPK), decreased the cardiac cytosolic malondialdehyde (MDA) level and prevented the decreasing of cardiac cytosolic glutathion (GSH) level respectively, indicating its preventive role in each case.

This same extract reduced, *in vitro*, the stable free radical (DPPH°) at 100 µM, indicating its antioxidant activity. At the concentration of 1 mg/ml, the extract reduced about 27.5 % of this free radical.

**Key words:** flavonoids, *Foeniculum vulgare* Mill., doxorubicin, cardiotoxicity, oxidative stress, antioxidant activity.



# Discussion