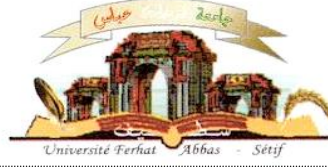


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2014

THÈSE

Présentée par

TIGRINE Chafia

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Effets anticancéreux et chimioprotecteur de l'extrait
polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de *Cléome arabica***

Soutenue publiquement le 11/05/2014

DEVANT LE JURY

Président

Senator Abderrahmane

Pr. UFA Sétif 1

Directeur

Bouriche Hamama

Pr. UFA Sétif 1

Examineurs

Kameli Abdelkrim

Pr. ENS, Vieux Kouba

Abidli Nacira

Pr. ENS, Vieux Kouba

Belaaloui Ghania

MCA. UHL Batna

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Je dédie ce travail à la mémoire de ma chère sœur Hafida...

A la mémoire de Mr le professeur Selloum...

Et à la mémoire de tous mes amis, Mimi, Radhia et Khaled.

Chafia

Remerciements

Premièrement, je remercie Allah, le bon Dieu, qui m'a donné l'ambitieux, le défi, la santé et le courage pour terminer cette thèse.

Deuxièmement, je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements au Professeur Hamama Bouriche qui a accepté de m'encadrer et qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. Je la remercie pour sa disponibilité et son encouragement durant toute la période de la réalisation de cette thèse. Je remercie également Mr le Professeur Senator pour ses conseils, son aide précieux et pour avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je tiens à remercier profondément Mr le Professeur Kameli qui m'a intégré au sein de son laboratoire à l'ENS et qui m'a toujours soutenu. Je le remercie de m'avoir donné confiance à travers sa modestie scientifique et ses qualités humaines. Je le remercie aussi pour son acceptation de juger ce travail.

Je tiens à remercier Madame le Professeur Maria Marino pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de physiologie cellulaire au département de biologie à l'université Roma Tre. Je la remercie pour son intérêt à mon travail, pour ses conseils et l'encadrement de haut niveau qu'elle m'a offert. Sans oublier tous les membres de son équipe surtout Dr Pamela Bulzomi qui m'a initié aux techniques de cultures cellulaires et qui était toujours disponible pour moi. Qu'elle trouve ici mes sincères gratitudes, remerciements et mon amitié.

Je tiens à remercier également les membres du Jury Mme le Professeur Abidli et Mme le Dr Belaaloui qui m'ont honoré pour avoir accepté de juger ma thèse.

Mes remerciements sont aussi dirigés à tous mes enseignants, depuis le primaire, qui ont contribué et influencé dans l'élaboration de ma forte personnalité surtout Mr Bourakba Ismail, Mr Benboubetra Mustapha, Mr Houcheur, Mr Arrar et Mr Gharzouli Kamel. Je remercie aussi les membres des équipes scientifique et pédagogique du laboratoire de Biochimie de l'ENS. Ainsi que tous mes amis, mes étudiants, mes collègues de travail aux universités de Sétif, de M'sila et à l'ENS et toute personne qui me partage les mêmes idées, surtout ma chère sœur et amie Seoussen.

Je remercie mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien et leurs encouragements. Je remercie mes beaux parents et tous les membres de la grande famille « TIGRINE », surtout mes frères, mes beaux frères, mes sœurs et belles sœurs. Sans oublier mon oncle Abdel Madjid qui m'a fait toujours confiance et qui m'a beaucoup encouragé pour y arriver, je lui dis « Merci beaucoup mon cher oncle ».

Enfin, un grand merci du fond du cœur à mon époux « Mourad » qui est toujours à mes côtés, qui m'a aidé, m'a encouragé et m'a soutenu surtout dans les moments difficiles. Un grand merci également, plein d'amour et de tendresse, pour mes deux anges « Hiba et Younes » que Dieu les protège.

Résumé

Cléome arabica L. (Capparaceae) est une plante médicinale saharienne, largement distribuée dans la partie nord de l'Afrique et elle est utilisée pour le traitement des douleurs abdominales et rhumatismales. Dans la présente étude, l'extrait polyphénolique des feuilles de *Cléome arabica* (EFCA) est étudié pour: (i) L'activité antioxydante *in vitro* en utilisant les tests du DPPH', de chélation du fer et du pouvoir réducteur. (ii) Les effets anticancéreux en utilisant cinq lignées de cellules cancéreuses humaines, MCF-7, DLD-1, HepG2, HeLa et SK-N-BE, par la mesure de leur viabilité et la distribution de leur cycle cellulaire en utilisant une chambre d'hémocytomètre et un cytomètre en flux. Le facteur de croissance épidermique (EGF) a été utilisé comme contrôle positif. Un western blot est réalisé pour évaluer les effets de l'extrait sur les voies impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire et l'activation de la cascade apoptotique. (iii) Les effets protecteurs contre la toxicité hématologique induite par l'AraC chez la souris en établissant une formule de numération sanguine et par la mesure de la température corporelle des souris. Les résultats obtenus montrent que l'EFCA a exercé une forte activité antiradicalaire contre le radical libre DPPH' (IC_{50} 4,88 μ g/ml) et un puissant pouvoir réducteur. Cependant, une bonne activité chélatrice n'a été obtenue qu'avec des concentrations élevées (IC_{50} = 377,75 μ g/ml). En outre, les résultats obtenus indiquent que le traitement des 5 lignées de cellules cancéreuses avec les différentes concentrations de l'extrait (1, 5, 10, 25, 50, 100 et 200 μ g/ml) a réduit le nombre cellulaire d'une manière dose-dépendante. Ainsi, la cascade apoptotique impliquant l'activation de la caspase-3 et le clivage de son substrat, la protéine PARP, a été triplé en utilisant des concentrations de 100 et 200 μ g/ml de l'EFCA. Le traitement des cellules cancéreuses par 200 μ g/ml d'extrait a bloqué la croissance cellulaire induite par le facteur de croissance EGF, en empêchant la phosphorylation d'AKT et d'ERK et en diminuant le niveau de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Dans l'ensemble, ces données suggèrent fortement que l'EFCA a exercé des effets anticancéreux sur toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées. Les résultats de cette étude montrent également que l'injection sous-cutanée de 50 mg/kg de l'AraC à des souris pendant 3 jours consécutifs a entraîné une myélosuppression significative. En effet, les nombres des globules rouges et des globules blancs, la quantité d'hémoglobine et le pourcentage de l'hématocrite ont diminué significativement ($p < 0,001$). Cependant, l'injection intrapéritonéale de l'extrait (100 mg/kg) pendant 6 jours consécutifs n'a exercé aucun effet toxique. La combinaison de l'EFCA et d'AraC a protégé les cellules sanguines contre une véritable toxicité. En fait, le nombre des globules rouges, la quantité d'hémoglobine et le pourcentage de l'hématocrite sont significativement plus élevés. Toutefois, le nombre des globules blancs est légèrement protégé. En plus, l'extrait a exercé une activité antipyrétique par le maintien de la température corporelle des souris au tour de 37°C chez le groupe traité par la combinaison l'EFCA/AraC, contre 39°C chez le groupe traité par l'AraC seule. En conclusion, les activités biologiques de l'EFCA, observés *in vitro* ainsi que *in vivo*, sont probablement dues à sa richesse en polyphénols, surtout en flavonoïdes qui ont représenté $322,1 \pm 3,44$ mg équivalent d'acide gallique/g de l'extrait et $245,6 \pm 4,67$ mg équivalent de quercétine/g de l'extrait respectivement.

Mots clés: flavonoïdes, extrait polyphénolique, *Cléome arabica*, activité antioxydante, activité hématoprotective, apoptose, activité anticancéreuse.

Abstract

Cleome arabica L. (Capparaceae) is a medicinal and a desert plant widely distributed in the north part of Africa and it's used for the treatment of abdominal and rheumatic pains. In the present study, the polyphenolic extract from *Cleome arabica* leaves (CALE) was investigated for: (i) The antioxidant activity *in vitro* using DPPH[•], metal chelating and reducing power methods. (ii) The anticancer effects using five different human cancer cell lines, MCF-7, DLD-1, HepG2, HeLa and SK-N-BE, by evaluating cell viability and measurement of cell cycle distribution using hemocytometer chamber and a cytofluorimeter, respectively. The EGF was used as a positive control. A western blot was performed to evaluate the CALE effects on pathways involved in cell growth regulation and on apoptotic cascade activation. (iii) The protective effects against AraC-induced hematological toxicity in mice by establishing the complete blood count test and by measurement of mice body temperature. The obtained results indicated that CALE exhibited a strong scavenging activity against DPPH[•] free radical ($IC_{50} = 4.88 \mu\text{g/ml}$) and a high reducing power, while, the chelating activity was good only at high concentrations ($IC_{50} = 377,75 \mu\text{g/ml}$). Furthermore, the obtained results showed that the subcutaneous injection of 50 mg/kg of AraC to mice during three consecutive days caused a significant myelosuppression. Indeed, the number of the red and white blood cells, the amount of hemoglobin and the percentage of the hematocrit decreased significantly ($p < 0.001$). However, the intraperitoneal injection of the extract (100 mg/kg) during six consecutive days didn't exert any toxicological effects. The combination of CALE and AraC protected blood cells from a veritable toxicity. In fact, the number of the red cells, the amount of hemoglobin and the percentage of the hematocrit were significantly high. However, the number of the white blood cells was slightly protected. In addition, CALE exerted an antipyretic activity by maintaining mice body temperature a round 37°C in the group treated with the combination of CALE and AraC, against 39°C in the group treated with AraC alone. Moreover, the obtained results showed that the treatment of the five cancer cell lines with CALE at different concentrations (1, 5, 10, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$) reduced cell number in a dose-dependent manner. Thus, the apoptotic cascade involving caspase-3 activation and the cleavage of its substrate PARP was increased by three-fold using CALE at 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$. Interestingly, CALE treatment (200 $\mu\text{g/ml}$) also blocked EGF-induced cell growth by preventing the growth factor-triggered AKT and ERK phosphorylation and Bcl-2 levels. As a whole, these data strongly suggest that CALE possesses anticancer effects on all tested cancer cell lines. As a conclusion, the biological activities of CALE, observed *in vitro* as well as *in vivo*, could be due to its richness in polyphenols and flavonoids which represent $322.1 \pm 3.44 \text{ mg}$ equivalent of gallic acid/g of extract and $245.6 \pm 4.67 \text{ mg}$ equivalent of quercetin/g of extract, respectively.

Key words: flavonoids, polyphenolic extract, *Cleome arabica*, antioxidant activity, hematoprotective effects, apoptosis, anticancer activity.

ملخص

النتينة (*Cleome arabica* L) هي نبتة طبية صحراوية منتشرة على نطاق واسع في شمال أفريقيا و تستخدم لعلاج آلام البطن و الروماتيزم. في هذه الدراسة، تم تقدير الأنشطة التالية للمستخلص البوليفينولي المستخرج من أوراق النتينة: (أ) النشاط المضادة للأكسدة في المختبر باستخدام DPPH، التمثل المعدي والقدرة المرجعة. (ب) النشاط المضادة للسرطان باستخدام خمسة أنواع من الخلايا السرطانية البشرية المختلفة: MCF-7، DLD-1، HepG2، HeLa و SK-N-BE، من خلال تقييم الحيوية الخلوية وقياس توزيع دورة الخلية باستخدام غرفة hemocytometer و cytofluorimeter على التوالي، حيث تم استخدام عامل النمو كشاهد موجب. كما تم استخدام تقنية Western blot لتحديد تأثير المستخلص على المسارات التي تدخل في تنظيم نمو الخلايا و تنشيط الموت الخلوي المبرمج. (ج) النشاط الوقائي ضد السمية الدموية التي يسببها دواء AraC في الفئران وذلك بتحديد الصيغة العددية لكريات الدم و كذا قياس درجة حرارة الجسم. أوضحت النتائج المتحصل عليها أن مستخلص النتينة يملك نشاطا مضادا للأكسدة جد فعال ضد الجذر الحر DPPH[•] ($IC_{50} = 4.88$ ميكروغرام/مل) كما يملك أيضا قدرة مرجعة مهمة و قدرة تمخلب جيدة ولكن باستعمال تراكيز عالية (200-1000 ميكروغرام/مل). كما أظهرت النتائج المتحصل عليها أن معاملة الخلايا السرطانية بتركيبة مختلفة لمستخلص النتينة (1، 5، 10، 25، 50، 100 و 200 ميكروغرام/مل) أدت إلى انخفاض عدد الخلايا السرطانية الحية بطريقة تعتمد على الجرعة. إضافة إلى ذلك، تمت زيادة في نسبة أنزيم الكاسباس 3 النشط و ركيزته - PARP بمقدار ثلاثة أضعاف باستخدام 100 و 200 ميكروغرام / مل من المستخلص. كما أوقف المستخلص بتركيز 200 ميكروغرام/مل نمو الخلايا المحفز بعامل النمو و ذلك بمنع فسفرة AKT و ERK و كذا خفض مستوى Bcl-2. من خلال النتائج المحصل عليها فإن مستخلص النتينة يمتلك تأثيرا مضادا للسرطان في جميع أنواع الخلايا السرطانية التي تم اختبارها. كما أظهرت النتائج المحصل عليها أن حقن 50 ملغ/كغ من AraC تحت الجلد لفئران التجربة خلال ثلاثة أيام متتالية أدى إلى كبح نخاعي كبير. حيث انخفض عدد خلايا الدم الحمراء والبيضاء، و كذا كمية الهيموجلوبين ونسبة الهيماتوكريت بصفة معنوية ($P < 0.001$). بينما لم يبدي الحقن داخل الصفاق 100 ملغ/كغ من مستخلص النتينة ولمدة ستة أيام متتالية أي أثر سمي في الدم. إن الحقن المزدوج لكل من مستخلص النتينة/ CarA حمى الخلايا الدموية من سمية حقيقية. حيث كان عدد خلايا الدم الحمراء و كمية الهيموجلوبين ونسبة الهيماتوكريت عالية بشكل ملحوظ. غير أنه لم يتم حماية خلايا الدم البيضاء. بالإضافة إلى ذلك، أثبت المستخلص نشاطا خافضا للحرارة و ذلك من خلال الحفاظ على درجة حرارة جسم الفئران في حدود 37 °م في المجموعة التي تم معاملة بها بمستخلص النتينة/ CarA مقابل 39 °م في المجموعة المعاملة بـ CarA وحدها. ختاماً، يمكن أن تكون الأنشطة البيولوجية لمستخلص النتينة، و التي لوحظت في المختبر وكذلك في الجسم الحي، راجعت إلى غناه الكبير بمادة البوليفينول، خاصة الفلافونويدات و التي قدرت بـ $322.1 \pm$ 3.44 مغ مكافئ لحمض القاليك/غ من المستخلص و 245.6 ± 4.67 مغ مكافئ للكارسنين/غ من المستخلص على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الفلافونويد، البوليفينول، *emoelC acibara*، النشاط المضادة للأكسدة، والتأثير الوقائي، الموت الخلوي المبرمج، دورة الخلية.

Liste des abréviations

AIF: Apoptosis Inducing Factor.

AKT: serine/threonine protein kinase isolated from the retrovirus AKT8.

Apaf-1: Apoptotic Proteases Activating Factor 1.

AraC: 1- β -D-arabinofuranosyl cytosine (Cytarabine).

BAD: BCL-2 Antagonist of cell Death.

BAK: BCL-2-Antagonist/Killer.

BAX: BCL-2-Associated X Protein.

BCL-2: B-Cell Lymphoma Protein.

BCLW: BCL-2 like 2 Protein.

BCLX: BCL-2 like 1 Protein.

BCLXL: BCL-2 related Protein, Long Isoform.

BCLXS: BCL-2 related Protein, Short Isoform.

BH: BCL-2 Homology domain.

BHA: Butylated hydroxyanisole.

BHT: Butylated hydroxytoluene.

BID: BH3-Interacting-domain Death agonist.

BIK: BCL-2 Interacting Killer.

BIM: BCL-2-interacting mediator of cell death.

BSA: Bovine serum albumin.

CAD: Caspase Activated Desoxyribonuclease.

CARD: Caspase recrutement domain.

Caspase: Cystéinyl Aspartate Specific Protease.

CMF: Cytométrie de flux.

CDK: Cyclin-dependant kinase.

CKI: Cyclin dependent Kinase Inhibitor.

CMC: Carboxymethyl cellulose.

CRD: Cystein-rich domain.

DAG: Diacylglycérol .

DAPI: 4,6-diamidino-2-phénylindole.

DD: Death domain.

DED: Death Effector Domain.

DIABLO: Direct Inhibitor of Apoptosis Binding Protein with Low Pi.

DISC: Death inducing signaling complex.

DLD-1: Human colon adenocarcinoma cells (DL. Dexer, name of depositor).

DMEM: Dulbecco modified eagle medium.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

DPPH: 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl.

EC50: The half maximal effective concentration.

EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid.

EFCA: Extrait des feuilles de *Cléome Arabica*.

EGF: Epidermal growth factor.

EGFR: EGF Receptor.

ERK: Extracellular signal-regulated kinase.

FADD: Fas associated death domain.

FAIM: Fas apoptosis inhibitor molecule.

FAP: Fas-associated phosphatase.

FasL: Fas ligand.

FRAP: Ferric Reducing Anti-oxidant Power.

HeLa: Human negroid cervix epitheloid carcinoma cell line (isolated from Henrieta Lacks).

HepG2: Lignée cellulaire d'hépatome humain.

IC50: The half maximal inhibitory concentration.

MCF-7: Human breast cancer cells (Michigan Cancer Foundation-7).

PARP: Poly-ADP-ribose-polymérase.

PI3-K: Phosphatidylinositol 3-kinase.

PKC: Protéine kinase C. .

PTP: Permeability transition pore.

PBS: Phosphate buffered saline.

SB: Sample buffer.

SK-N-BE: Human neuroblastoma cells.

ROS: Reactive oxygen species.

RPMI-1640: Medium for cell culture (Roswell Park Memorial Institute Medium).

SVF: Sérum de veau foetal.

TNF: Tumor Necrosis Factor.

TRADD: TNF Receptor Associated Death Domain

TTBS: Tween-tris-buffered- saline.

UICC: Union of International Cancer Control.

Liste des figures

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figure 1: | Représentation schématique des caractéristiques cytologiques des principaux modes de la mort cellulaire..... | 4 |
| Figure 2: | Phases du processus apoptotique..... | 10 |
| Figure 3: | Les voies d'activation de l'apoptose, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque..... | 11 |
| Figure 4: | Structure et activation des caspases..... | 14 |
| Figure 5: | Les protéines de la famille Bcl-2..... | 16 |
| Figure 6: | Les six caractéristiques d'un cancer..... | 18 |
| Figure 7: | Différentes étapes du cancer..... | 18 |
| Figure 8: | Structure de la cytosine arabinoside (cytarabine; AraC)..... | 27 |
| Figure 9: | Structure générale des flavonoïdes..... | 30 |
| Figure 10: | Effet scavenger des ROS (R^{\bullet}) par les flavonoïdes (FI-OH)..... | 35 |
| Figure 11: | Les sites du flavonoïde proposés pour la chélation des ions métalliques (M^{n+}) | 36 |
| Figure 12: | La plante <i>Cléome arabica</i> | 39 |
| Figure 13: | Un stéroïde isolé à partir des parties aériennes de la plante <i>Cléome arabica</i> | 40 |
| Figure 14: | Etapes principales de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de <i>Cléome arabica</i> | 44 |
| Figure 15: | Droites d'étalonnages de l'acide gallique et de la quercétine..... | 59 |
| Figure 16: | Activité antiradicalaire de l'EFCA, la quercétine, la rutine, le trolox et le BHT..... | 61 |
| Figure 17: | Activité chélatrice de l'EFCA et de l'EDTA envers le fer ferreux (Fe^{+2})..... | 62 |
| Figure 18: | Pouvoir antioxydant réducteur du fer par l'EFCA en comparaison avec le standard antioxydant BHT..... | 63 |

| | |
|--|----|
| Figure 19: Effet de l'EFCA sur la prolifération des lignées cancéreuses DLD-1, Hep-G2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE..... | 65 |
| Figure 20: Répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses DLD-1..... | 66 |
| Figure 21: Répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses Hep-G2..... | 67 |
| Figure 22: Analyse par CMF de la répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses MCF-7..... | 67 |
| Figure 23: Analyse par CMF de la répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses HeLa..... | 68 |
| Figure 24: Analyse par CMF de la répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses SK-N-BE..... | 68 |
| Figure 25: Pourcentages des différentes lignées de cellules cancéreuses en phase sous-G1..... | 69 |
| Figure 26: L'expression des protéines « caspase-3 » et « PARP » dans les lignées de cellules cancéreuses DLD-1, HepG2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE.... | 70 |
| Figure 27: Activité apoptotique de l'EFCA sur les cellules cancéreuses (DLD-1, HepG2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE) dans les conditions de privation / augmentation de sérum en présence ou en l'absence d'EGF..... | 72 |
| Figure 28: Effet de l'EFCA sur l'expression du caspase-3 dans les lignées de cellules cancéreuses DLD-1, HepG2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE..... | 73 |
| Figure 29: Effet de l'EFCA sur le taux des protéines P-AKT et P-ERK et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 induites par la privation/augmentation de sérum en l'absence ou en présence d'EGF | 74 |
| Figure 30: Effet protecteur de l'EFCA ou de la rutine envers la toxicité de l'AraC sur les globules rouges des souris..... | 75 |
| Figure 31: Effet protecteur de l'EFCA envers la toxicité de l'AraC sur la quantité d'hémoglobine (A) et le pourcentage de l'hématocrite (B) chez souris. | 76 |
| Figure 32: Effet protecteur de l'EFCA envers la toxicité de l'AraC sur les globules blancs (GB) des souris en comparaison avec la rutine..... | 77 |

| | |
|---|-----|
| Figure 33: Effet antipyrétique de l'EFCA chez les souris Balb C traités par l'AraC par voie sous cutanée en comparaison avec la rutine..... | 78 |
| Figure 34: Distribution des cellules dans le cycle cellulaire obtenu par cytométrie en flux après marquage par un agent fluorochrome..... | 83 |
| Figure 35: Schéma présentant le mécanisme moléculaire de la transduction du signal intracellulaire sur lequel ont été mentionnés les sites d'action probables de l'EFCA qui semblaient être directement ou indirectement responsables de son effet préventif et apoptotique..... | 88 |
| Figure 36: La courbe d'étalonnage du BSA..... | 113 |

Liste des tableaux

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tableau 1: | Caractéristiques cellulaires et biochimiques des différents types de mort cellulaire | 5 |
| Tableau 2: | Modifications morphologiques et biochimiques de la cellule durant l'apoptose | 9 |
| Tableau 3: | Structure des différentes classes de flavonoïdes et leurs sources alimentaires | 31 |
| Tableau 4: | Activités biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes chez l'homme..... | 34 |
| Tableau 5: | Propriétés anticancéreuses, <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de quelques flavonoïdes..... | 37 |
| Tableau 6: | Classification botanique de <i>Cléome arabica L</i> | 38 |
| Tableau 7: | Les constituants des feuilles et des tiges de <i>Cléome arabica</i> | 40 |
| Tableau 8: | Origine et conditions de culture des lignées cellulaires cancéreuses utilisées | 48 |
| Tableau 9: | Préparation des gels de séparation et de concentration | 54 |
| Tableau 10: | Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot.... | 55 |

| | |
|------------------------------|-----|
| Résumé | i |
| Abstract | ii |
| ملخص | iii |
| Liste des abréviations | iv |
| Liste des figures | vi |
| Liste des tableaux | ix |
| Introduction | 1 |

Revue bibliographique

| | |
|--|----|
| 1. Mort cellulaire | 3 |
| 1.1. Mort cellulaire passive | 3 |
| 1.1.1. Oncose | 3 |
| 1.1.2. Nécrose | 3 |
| 1.2. Mort cellulaire active | 6 |
| 1.2.1. Autophagie | 6 |
| 1.2.2. Paraptose | 6 |
| 1.2.3. Sénescence | 7 |
| 1.2.4. Mitose catastrophique..... | 7 |
| 1.2.5. Apoptose | 8 |
| 1.3. Rôle physiologique et physiopathologie du processus apoptotique | 8 |
| 1.4. Mécanismes moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose | 10 |
| 1.4.1. Phase d'induction | 11 |
| 1.4.1.1. Voie extrinsèque | 12 |
| 1.4.1.2. Voie intrinsèque | 12 |
| 1.4.2. Phase d'exécution et de dégradation | 13 |
| 1.5. Régulation | 15 |
| 2. Cancer | 16 |
| 2.1. Epidémiologie | 17 |
| 2.2. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse | 17 |
| 2.3. Etapes de la cancérogenèse | 18 |
| 2.3.1. Initiation | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.2. Promotion | 19 |
| 2.3.3. Progression | 19 |
| 2.3.4. Invasion | 20 |
| 2.3.5. Angiogenèse | 20 |
| 2.3.6. Métastases ganglionnaires | 20 |
| 2.3.7. Métastases sanguines | 21 |
| 2.4. Types de cancers | 22 |
| 2.4.1. Sarcomes | 22 |
| 2.4.2. Carcinomes | 22 |
| 2.4.3. Hématosarcomes | 22 |
| 2.5. Traitement du cancer | 22 |
| 2.5.1. Méthodes classiques | 22 |
| 2.5.1.1. Chirurgie | 22 |
| 2.5.1.2. Chimiothérapie | 23 |
| 2.5.1.3. Radiothérapie | 24 |
| 2.5.1.4. Immunothérapie | 24 |
| 2.5.1.5. Hormonothérapie | 25 |
| 2.5.2. Traitements alternatives | 25 |
| 2.5.2.1. L'enzymothérapie | 25 |
| 2.5.2.2. La thérapie génique | 25 |
| 2.5.3. Traitements complémentaires | 26 |
| 2.5.4. Phytothérapie | 26 |
| 3. Cytarabine | 27 |
| 3.1. Définition et structure | 27 |
| 3.2. Pharmacocinétique et métabolisme | 27 |
| 3.3. Mécanisme d'action | 28 |
| 3.4. Mécanismes de résistance à la cytarabine | 29 |
| 3.5. Indications thérapeutiques | 29 |
| 3.6. Effets toxiques | 29 |

| | |
|---|----|
| 4. Flavonoïdes | 30 |
| 4.1. Structure chimique et classification des flavonoïdes | 30 |
| 4.2. Distribution et localisation | 32 |
| 4.3. Biodisponibilité et métabolisme des flavonoïdes chez les organismes vivants... | 32 |
| 4.4. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes | 34 |
| 4.4.1. Activité antioxydante des flavonoïdes | 35 |
| 4.4.2. Activité anticancéreuse des flavonoïdes | 36 |
| 5. <i>Cléome arabica</i> L. | 37 |
| 5.1. Classification botanique | 38 |
| 5.2. Description botanique | 38 |
| 5.3. Composition chimique | 39 |
| 5.4. Utilisation de <i>Cléome arabica</i> en médecine traditionnelle | 39 |
| 5.5. Activités biologiques | 41 |

Etude expérimentale

| | |
|---|----|
| 1. Matériel et Méthodes | 42 |
| 1.1. Matériel | 42 |
| 1.1.1. Animaux | 42 |
| 1.1.2. Matériel végétal | 42 |
| 1.1.3. Réactifs et solutions de travail | 42 |
| 1.2. Méthodes | 43 |
| 1.2.1. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de <i>Cléome arabica</i> | 43 |
| 1.2.1.1. Extraction des flavonoïdes et des polyphénols | 43 |
| 1.2.1.2. Dosage des polyphénols totaux | 45 |
| 1.2.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux | 45 |
| 1.2.2. Etude de l'activité anti-oxydante de l'extrait des feuilles de <i>Cléome</i> <i>arabica</i> | 45 |
| 1.2.2.1. Test du DPPH | 45 |
| 1.2.2.2. Chélation du fer ferreux | 46 |
| 1.2.2.3. Pouvoir anti-oxydant réducteur du fer: FRAP..... | 46 |

| | |
|--|----|
| 1.2.3. Effet anticancéreux de l'EFCA | 47 |
| 1.2.3.1. Conditions de la culture cellulaire | 47 |
| 1.2.3.2. Congélation/Décongélation des lignées tumorales | 49 |
| 1.2.3.3. Passage des lignés tumorales | 49 |
| 1.2.3.4. Comptage des cellules | 50 |
| 1.2.3.5. Evaluation de la cytotoxicité | 50 |
| 1.2.3.6. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux | 51 |
| 1.2.3.7. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait contre la croissance des cellules cancéreuses par la méthode de la réduction du sérum | 51 |
| 1.2.3.8. Electrophorèse et immunoblotting | 52 |
| A. Traitement des cellules cancéreuses | 52 |
| B. Préparation des lysats cellulaires | 52 |
| C. Dosage des protéines | 53 |
| D. Western blot | 53 |
| 1.2.4. Etude de l'effet hémato-protecteur de l'extrait des feuilles de <i>Cléome</i> <i>arabica</i> chez la souris Balb C | 56 |
| 1.2.4.1. Répartition des groupes d'animaux | 56 |
| 1.2.4.2. Détermination de la formule de numération sanguine | 57 |
| 1.2.4.3. Mesure de la température corporelle des souris..... | 57 |
| 1.3. Analyse statistique | 57 |
| 2. Résultats | 58 |
| 2.1. Extraction et dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux | 58 |
| 2.2. Activité anti-oxydante de l'extrait | 60 |
| 2.2.1. Effet antiradicalaire | 60 |
| 2.2.2. Chélation du fer ferreux (Fe ⁺²) | 60 |
| 2.2.3. Pouvoir anti-oxydant réducteur du fer | 60 |
| 2.3. Effet anticancéreux de l'extrait sur quelques lignées de cellules cancéreuses. | 64 |
| 2.3.1. Effet cytotoxique sur les lignées de cellules cancéreuses | 64 |
| 2.3.2. Effet de l'extrait sur le cycle cellulaire | 66 |
| 2.3.3. Effet de l'extrait sur la caspase-3 et clivage du PARP dans les 5 lignées cancéreuses | 75 |

SOMMAIRE

| | |
|--|-----|
| 2.3.4. Effet préventif de l'extrait contre la croissance des cellules cancéreuses | 71 |
| 2.3.5. Effet de l'extrait sur les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire | 71 |
| 2.4. Effet hémato-protecteur de l'extrait envers la toxicité de l'AraC chez la souris | 75 |
| 3. Discussion | 79 |
| 3.1. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes | 79 |
| 3.2. Activité anti-oxydante de l'EFCA | 79 |
| 3.3. Effet anticancéreux de l'EFCA sur quelques lignées de cellules cancéreuses | 81 |
| 3.4. Effet hémato-protecteur de l'EFCA contre la toxicité de l'AraC chez la souris | 89 |
| Conclusions et perspectives | 92 |
| Références bibliographiques | 94 |
| Annexe | 110 |

Le cancer représente un problème majeur de santé publique. Il constitue la première cause de mortalité dans le monde entier. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 13 millions de nouveaux cas de cancer, dont 8 millions de décès, sont enregistrés chaque année à l'échelle internationale. Par conséquent, elle estime que cette maladie fera 84 millions de morts entre 2005 et 2015 si aucune mesure n'est prise.

La chimiothérapie anticancéreuse est basée sur l'administration de médicaments ayant le pouvoir d'entraver la prolifération des cellules tumorales en induisant leur apoptose. Cependant, sa toxicité envers les cellules normales à renouvellement rapide, comme les cellules de la moelle osseuse, et le manque de spécificité provoquent un grand nombre d'effets indésirables qui peuvent être fatales. Plusieurs études ont montré que la toxicité et l'échec de la chimiothérapie anticancéreuse s'expriment par la génération des radicaux libres et la peroxydation des lipides membranaires ce qui provoque une toxicité hématologique très sévère d'où la nécessité de chercher de nouveaux médicaments à faible effets secondaires.

Actuellement, des milliers de substances chimiques sont utilisées en médecine moderne à des fins thérapeutiques. En outre, chaque année, de nombreux nouveaux médicaments sont autorisés et mis sur le marché. Pourtant, ces nouveaux médicaments sont rarement innovants, et leurs effets indésirables pas toujours connus et parfois, ils sont moins efficaces et plus nocifs.

Le retour à la médecine traditionnelle, de la plupart des scientifiques s'est intensifié ces dernières années. Cette médecine populaire, pratiquée par l'homme depuis l'antiquité, est basée sur l'utilisation des plantes dites médicinales, des légumes et des fruits comme sources de substances naturelles actives dans le traitement de la plupart des maladies. Selon l'OMS, plus de 80 % de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour traiter les divers problèmes de santé. Plusieurs études ont montré que les plantes médicinales sont très riches en molécules à activité biologique comme les flavonoïdes. Ces composés polyphénoliques sont très répandus dans les aliments d'origine végétale et sont doués de plusieurs activités biologiques y compris les activités antioxydante, anticancéreuse et chimiopréventive. Parmi les plantes médicinales riche en ces molécules prometteuses de grade thérapeutique on trouve *Cléome arabica*. C'est une plante saharienne commune dans quelques régions du Sahara algérien et très utilisée en médecine traditionnelles par les populations locales et les nomades surtout pour ses effets antirhumatismaux.

L'objectif de la présente étude consiste à évaluer les activités antioxydante, anticancéreuse et hématoprotectrice, d'un extrait polyphénolique riche en flavonoïdes, obtenu à partir des feuilles de *Cléome arabica*. Premièrement, l'activité antioxydante de cet extrait est évaluée *in vitro* par le test du DPPH[•], la méthode de la chélation du fer ferreux et la méthode du pouvoir réducteur. Deuxièmement, l'effet anticancéreux de cet extrait est étudié profondément afin d'éclaircir son mécanisme d'action en utilisant cinq lignées de cellules cancéreuses qui représentent les cancers humains les plus répons à savoir les cellules HeLa (lignée cellulaire du carcinome épithéloïde du col de l'utérus humain), les cellules HepG2 (lignée cellulaire du cancer hépatique), les cellules MCF-7 (lignée cellulaire du cancer du sein), les cellules DLD-1 (lignée cellulaire d'adénocarcinome du colon) et les cellules SK-N-BE (lignée cellulaire du cancer du cerveau, neuroblastome). Plusieurs tests ont été utilisé afin d'évaluer l'effet anticancéreux et préventif de l'extrait de *Cléome arabica*, allant du test de viabilité, passant par la cytométrie en flux et enfin, la détection de quelques protéines impliquées dans la cascade apoptotique à savoir la caspase-3, les protéines PARP, Bcl-2, AKT et ERK. Enfin, l'effet hématoprotecteur est évalué *in vivo* vis à vis de la toxicité hématologique de l'anticancéreux cytarabine (AraC) sur des souris Balb C.

1. Mort cellulaire

La mort cellulaire est un phénomène essentiel au bon déroulement de plusieurs processus biologiques afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. Selon les caractéristiques morphologiques et biochimiques de la mort cellulaire on distingue deux grands types : la mort cellulaire passive qui comprend la nécrose et l'oncose et la mort cellulaire active qui comprend la paraptose, l'autophagie, la sénescence, la mitose catastrophique et l'apoptose (Okada & Mak, 2004) (**Figure 1** et **Tableau 1**).

1.1. Mort cellulaire passive

La mort cellulaire passive est une mort cellulaire non programmée, le plus souvent, brutale et ses étapes sont irréversibles. Elle comprend l'oncose et la nécrose.

1.1.1. Oncose

Le terme oncose est dérivé du grec onkos, qui signifie masse ou volume, du fait que la cellule devienne plus volumineuse. Parmi les phénomènes précoces de l'oncose, l'augmentation de la concentration intracellulaire des ions Na^+ qui conduit au changement de volume cellulaire (Majno & Joris, 1995). De même, l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{++} résultant soit d'un influx à partir de l'espace extracellulaire, soit de sa libération à partir des lieux de stockage intracellulaires, provoque un gonflement du cytosol, du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi ainsi que la formation des vésicules aqueuses autour de la surface cellulaire (Bernardi & Rasola, 2007; Weerasinghe & Buja, 2012). Les mitochondries se condensent, puis, se gonflent suite aux lésions de la membrane mitochondriale interne. Enfin, la chromatine finit par se dégrader après avoir subis une condensation, néanmoins, le profil en échelle caractéristique de l'apoptose n'apparaît pas (Weerasinghe & Buja, 2012).

1.1.2. Nécrose

Le terme nécrose fait référence au mot grec « nekros » signifiant cadavre. Elle est considérée comme une mort cellulaire désordonnée et accidentelle, qui survient lors d'un dommage tissulaire (hypoxie, infection, traumatismes, etc.). La nécrose touche un ensemble de cellules d'un tissu, contrairement à l'apoptose qui dans la plupart du temps, n'affecte que des cellules individuelles au sein d'un tissu. Au cours de la nécrose, l'ADN nucléaire est dégradé de manière aléatoire par des endonucléases activées notamment par

des sérines protéases (Bicknell & Cohen, 1995; Dong et al., 1997). La nécrose s'accompagne d'un œdème cellulaire aboutissant à la lyse de la membrane plasmique. Cet éclatement cellulaire entraîne le relargage du contenu cytosolique et notamment d'enzymes dans le milieu environnant, qui sont responsables de la lyse des membranes des cellules voisines. Ce phénomène concourt à une réaction inflammatoire importante, néfaste pour l'organisme (Kerr et al., 1972).

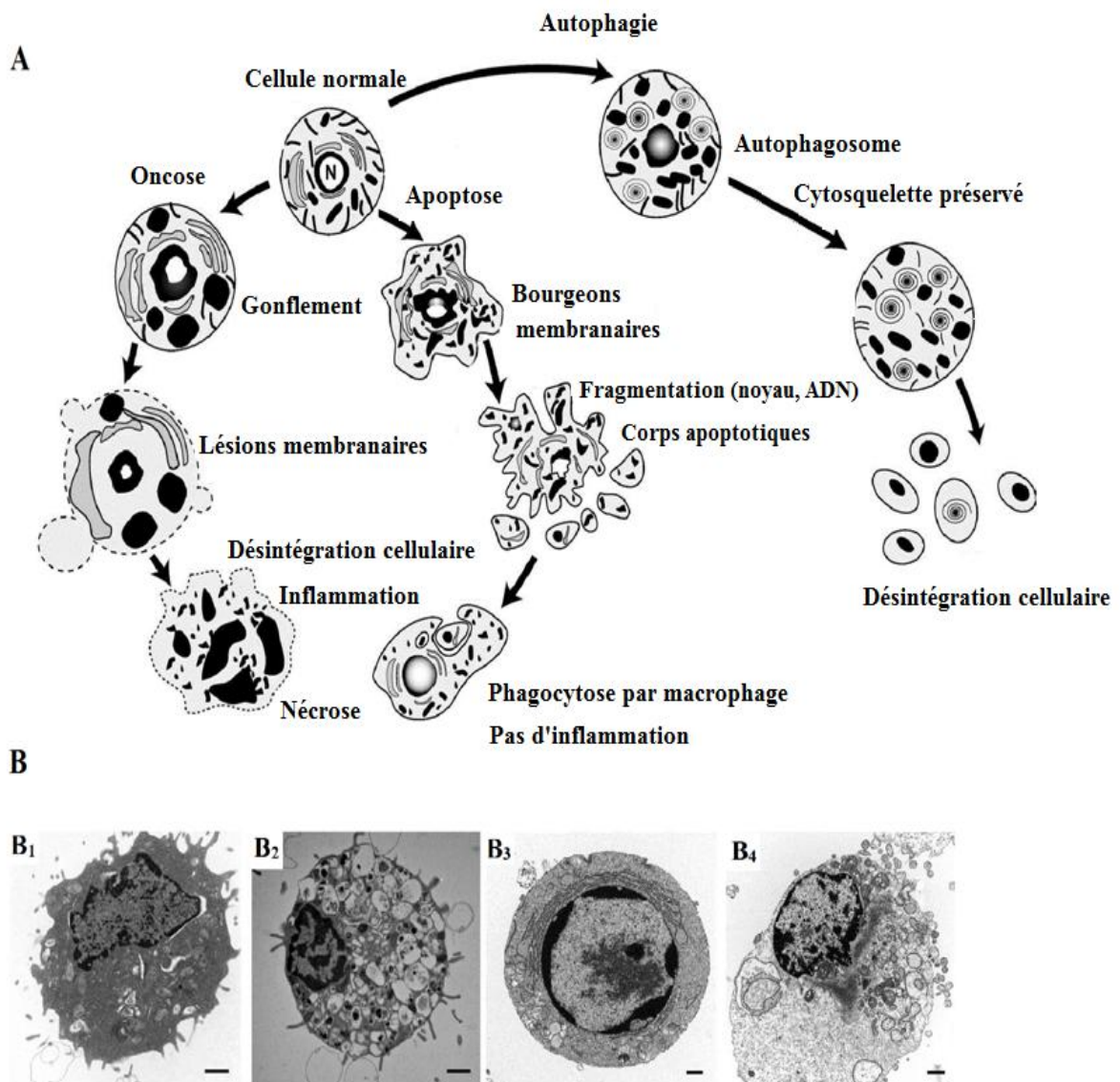


Figure 1: Représentation schématique des caractéristiques cytotogiques des principaux modes de la mort cellulaire (A) (Buja & Vela, 2008). Caractéristiques morphologiques d'une cellule à l'état normale (B₁), nécrose (B₂), apoptose (B₃) et d'autophagie (B₄) (Edinger & Thompson, 2004).

Tableau 1: Caractéristiques cytologiques et biochimiques des différents types de mort cellulaire (Okada & Mak, 2004).

| Type de Mort Cellulaire | Noyau | Membrane Cellulaire | Cytoplasme | Caractéristiques biochimiques |
|--------------------------------|--|---|---|---|
| Apoptose | Condensation de la chromatine. Fragmentation nucléaire ADN en échelle. | Bourgeonnement (blebbing) | Fragmentation et formation de corps apoptotiques | Dépendant des caspases Besoin d'ATP.. |
| Autophagie | Condensation partielle de la chromatine Pas d'ADN en échelle | Bourgeonnement (blebbing) | Augmentation du nombre de vésicules dites autophagiques, des lysosomes, des mitochondries. | Indépendant des caspases. Augmentation de l'activité lysosomale |
| Mitoses Catastrophiques | Fragmentation nucléaire Multiples micro-noyaux | Nd | Nd | Indépendant des caspases (au stade précoce) Activation anormale de CDK1/cycline B |
| Nécrose | Floculation de la chromatine. Agrégation et dégradation au hasard de l'ADN | Gonflement (swelling) et rupture | Augmentation de la vacuolisation. Dégénérescence des organelles. Gonflement des mitochondries. Lyse complète | Pas d'inhibiteurs connus. Pas besoin d'énergie. Perte de l'homéostasie ionique. |
| Sénescence | Structure hétérochromatique caractéristique. | Nd | Aplatissement Augmentation de la granularité | Activité β -galactosidase Indépendant des caspases. |
| Paraptose | Condensation partielle de la chromatine. Pas de fragmentation nucléaire. Pas d'ADN en échelle | Pas de bourgeonnement (blebbing) | Augmentation de la vacuolisation. | Pas d'inhibition par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 Indépendant des caspases. |
| Oncose | Gonflement nucléaire | Conservation de l'intégrité, Pas de rupture. | Gonflement des mitochondries. Augmentation de la vacuolisation. | Nd |

Nd: Non documenté

1.2. Mort cellulaire active

La mort cellulaire active est une mort cellulaire programmée qui peut être subdivisée en deux sous-groupes selon l'implication ou non des caspases. Le premier sous groupe est indépendant des caspases et qui implique l'autophagie (mort cellulaire de type II), la paraptose (mort cellulaire de type III), la sénescence et la mitose catastrophique. Le deuxième sous groupe est dépendant des caspases et qui implique l'apoptose (mort cellulaire de type I).

1.2.1. Autophagie

L'autophagie est une mort cellulaire de type II. Elle correspond à toute voie de dégradation qui nécessite l'acheminement d'un compartiment cytoplasmique vers le lysosome en permettant aux cellules de dégrader les protéines et les organelles non fonctionnelles (Vicencio et al., 2008). L'autophagie a été décrite principalement chez les animaux, les végétaux et la levure, lors d'une carence en nutriments pour les récupérer à des fins de survie. À ce jour, l'autophagie est connue comme moyen de maintien du métabolisme, de la production d'ATP et de la prévention du déclenchement de l'apoptose (Cuervo et al., 2005; Kurz et al., 2007). Sur le plan cellulaire, l'autophagie commence par la formation d'une vacuole initiale (autophagosome) qui permet de séquestrer le matériel cytoplasmique comme l'appareil de Golgi, les ribosomes, le réticulum endoplasmique et le noyau. Ensuite, ces organites vont se transformer en vacuole dégradable en fusionnant avec le lysosome. Ce dernier va apporter un grand nombre d'enzymes servant à dégrader la plupart des macromolécules biologiques et les organelles séquestrés. Cependant, puisque les microfilaments sont préservés, on suppose que le cytosquelette est requis pour l'autophagocytose (Bursch & Ellinger, 2005).

1.2.2. Paraptose

La paraptose, se distingue de l'apoptose par son indépendance des caspases. Elle est caractérisée par l'apparition des vacuoles dans le cytoplasme comme la nécrose, ce qui explique pourquoi on l'aurait longtemps confondue avec la nécrose. Les gènes et les mécanismes impliqués dans la survenue et le contrôle de la paraptose sont encore mal connus (Sperandio et al., 2004).

1.2.3. Sénescence

La sénescence est le synonyme du vieillissement physiologique qui intervient à différents niveaux: organisme entier, organes, tissus, cellule et enfin molécules intracellulaires. Elle a été décrite pour la première fois par Hayflick et Moorhead en 1961. Pour ces auteurs la sénescence cellulaire est génétiquement programmée, c'est une différenciation terminale commandée par des gènes du vieillissement (gérontogènes) qui ne s'expriment qu'à la fin de la vie cellulaire. A l'état normal, la vie cellulaire passe par trois phases (Okada & Mak, 2004):

La phase I: Phase de prolifération rapide durant laquelle la culture cellulaire se développe normalement en une mono-couche cellulaire confluente.

La phase II: Phase de prolifération lente, obtenue à la suite de plusieurs repiquages. Les cellules mettent plus de temps à atteindre la confluence.

La phase III: Phase d'arrêt, obtenue vers le 50^{ème} repiquage. Les cellules subissent un arrêt irréversible et permanent de leur cycle cellulaire, perdent leur pouvoir de transformation ou de clonogénicité et donnent des signes de dégénérescence et meurent.

Ce type de sénescence est appelée (sénescence répllicative). Morphologiquement, les cellules subissant ce type de mort conservent l'intégrité de leur membrane plasmique, mais présentent des changements tels que: un cytoplasme aplati, une augmentation de granularité, des involutions au niveau de la chromatine, présence de l'ADN circulaire extra-chromosomique et le raccourcissement progressif des télomères (Narita *et al.*, 2003).

Cependant, il existe un autre type de sénescence induite par le stress cellulaire. Les cellules ne présentent alors pas de raccourcissement des télomères mais ont le morphotype de cellules sénescents (Campisi, 2001).

1.2.4. Mitose catastrophique

C'est un type de mort cellulaire identifié dans les cellules de mammifères présentant un nombre aberrant de mitoses avec formation des cellules géantes polynuclées contenant des chromosomes non condensés. Ainsi, en cas d'une lésion cellulaire ou endommagement de son ADN, les points de contrôle s'activent avant l'entrée en phase G2 et le cycle cellulaire s'arrête pour permettre la réparation. Si la réparation est impossible, la cellule meurt par apoptose. Cependant, si le point de contrôle G2 est défectueux, la cellule entre en mitose avant que la réplication de l'ADN ne soit complète ou avant que sa

réparation ne soit terminée. Suite à cette mitose aberrante, la cellule meurt par mitose catastrophique (Okada & Mak, 2004).

1.2.5. Apoptose

La mort cellulaire programmée de type I ou apoptose, est un processus de mort cellulaire physiologique qui permet à l'organisme d'éliminer les cellules non désirées ou endommagées et potentiellement dangereuses (Kerr et al., 1972; Schmitt & Bertrand, 2001). Le nom « apoptose » fait référence à la chute programmée des feuilles à l'automne (apo = éloignement et ptose = chute). La notion d'apoptose a été introduite pour la première fois par Kerr et al., (1972) pour désigner une forme de mort cellulaire morphologiquement et biochimiquement différente de la nécrose (Kerr et al., 1972; Kerr, 2002). L'apoptose est impliquée dans plusieurs phénomènes biologiques à savoir le développement embryonnaire et l'homéostasie, le vieillissement cellulaire et la défense de l'organisme contre les cellules tumorales et les infections bactériennes ou virales (Elmore, 2007). La cellule en apoptose subit plusieurs modifications morphologiques et biochimiques au niveau membranaire, cytoplasmique, et au niveau des organites et du noyau. Ces modifications sont résumées dans le tableau 2.

1.3. Rôle physiologique et physiopathologie du processus apoptotique

L'apoptose est une fonction physiologique normale de l'organisme qui a pour but l'élimination des cellules inutiles et/ou potentiellement dangereuses. Elle intervient dans les étapes du développement au cours de l'embryogenèse et l'organogenèse comme la formation des cavités, l'élimination de la peau entre les doigts ou d'autres structures devenues inutiles (Meier et al., 2000). Ainsi que dans la mise en place des systèmes nerveux (Clarke et al., 1998) et immunitaire (Weil et al., 1999). Chez la femme, l'apoptose est impliquée dans l'involution des seins après le sevrage (Strange et al., 2001) ou dans la régression de l'endomètre utérin au cours des menstruations (Vinatier et al., 2001).

Cependant, le dérèglement des mécanismes de régulation de l'apoptose est impliqué dans de nombreuses maladies. Ces dérégulations peuvent conduire à une activation ou à une réduction de l'apoptose. Ainsi, la réduction de l'apoptose est fréquemment associé au développement des maladies auto-immunes et lymphoprolifératives (Rich et al., 1999; Neurath et al., 2001), aux phénomènes de carcinogenèse (Agnantis & Goussia, 1999) ou

Tableau 2: Modifications morphologiques et biochimiques de la cellule durant l'apoptose.

| Sites | Modifications | Référence |
|-------------------|--|--|
| Membrane | <ul style="list-style-type: none"> - Perte du contact avec les cellules avoisinantes. - Altérations des jonctions, en particulier au niveau des desmosomes et des protéines d'adhésion. - Inversion de polarité de la membrane plasmique. - Translocation des résidus phosphatidylsérines du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche phospholipidique (facilitent l'élimination des corps apoptotiques). - Individualisation des bourgeons formés à la surface de la cellule apoptotique pour former des corps apoptotiques. | <ul style="list-style-type: none"> - Meredith et Schwartz, 1997. - Savill et Fadok, 2000. - Gardai et al., 2006. |
| Cytoplasme | <ul style="list-style-type: none"> - Perte d'eau et d'électrolytes. - Forte diminution du volume cellulaire. - Importante condensation du cytoplasme. - Désorganisation du cytosquelette. | <ul style="list-style-type: none"> - Yu et al., 1997 |
| Organites | <ul style="list-style-type: none"> - Destruction des organites intracellulaires. - Relocalisation des organites cytoplasmiques. - Regroupement des mitochondries intactes autour du noyau. - Déplacement du réticulum endoplasmique vers la périphérie de la cellule. - Présence des ribosomes à la surface du réticulum endoplasmique. - Chute tardive du potentiel mitochondrial membranaire. | <ul style="list-style-type: none"> -Feldmann, 1999 |
| Noyau | <ul style="list-style-type: none"> - Transformation du nucléole en un amas granuleux homogène. - Diminution du volume nucléaire. - Condensation de la chromatine. - Margination chromatinienne. - Fragmentation de l'ADN. | <ul style="list-style-type: none"> - Oberhammer et al., 1993. - Earnshaw, 1995. - Stuppia et al., 1996. - Kaufmann et al., 2000. |

aux infections virales pendant lesquelles les virus mettent en place des systèmes d'inhibition d'apoptose afin d'envahir l'hôte (Saikumar et al., 1999). Cependant, l'excès d'apoptose intervient dans les anomalies congénitales du développement, dans certaines maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique, le syndrome myélodysplasique, etc. (Barinaga, 1998) ou dans certaines pathologies provoquées par des infections virales. En effet, le VIH est capable d'induire l'apoptose des lymphocytes T auxiliaires nécessaires pour activer les lymphocytes T cytotoxiques (Saikumar et al., 1999).

1.4. Mécanismes moléculaires et voies de signalisation de l'apoptose

Schématiquement, le processus apoptotique se déroule en trois phases: la phase d'induction, la phase d'exécution et la phase de dégradation (**Figure 2**).

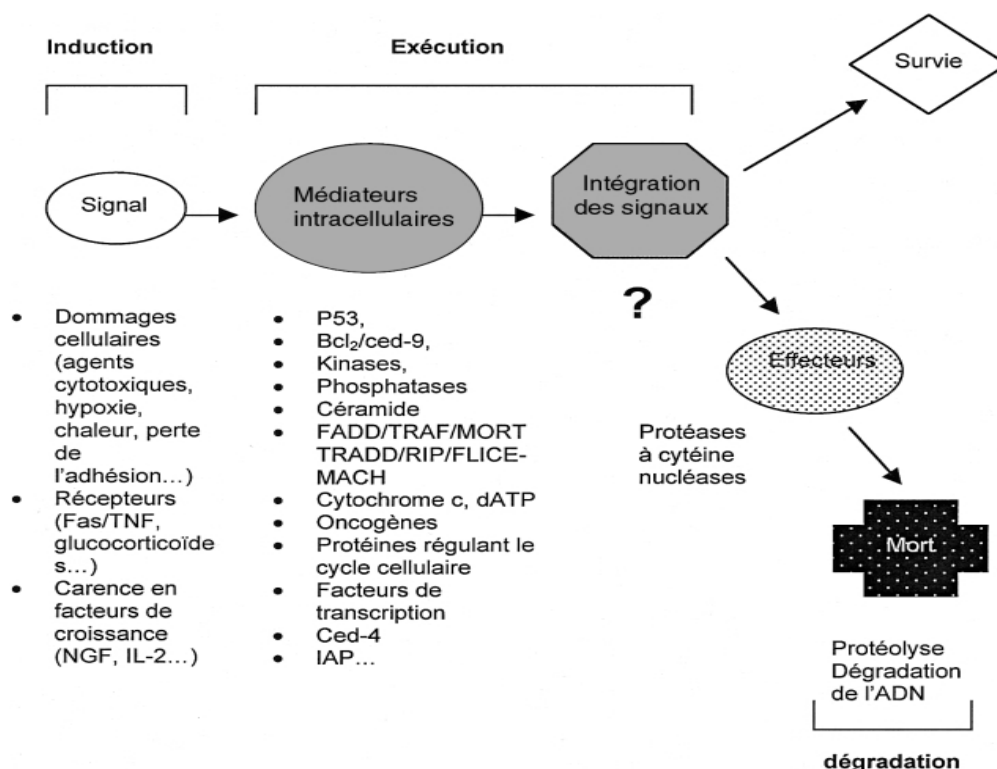


Figure 2: Phases du processus apoptotique. Au cours de la phase d'induction, la cellule reçoit un ensemble de signaux qui peuvent générer différentes réponses. Ces signaux sont alors intégrés par la cellule qui va répondre en fonction de son contexte génétique, de son état et de son environnement. Le processus décisionnel est influencé par une série de médiateurs intracellulaires. La phase de dégradation aboutit aux manifestations visibles de l'apoptose qui sont la condensation et la dégradation de la chromatine (Mercié1 & Belloc, 2001).

1.4.1. Phase d'induction

La phase d'induction peut survenir en réponse à un signal extrinsèque via les récepteurs de la mort cellulaire tels que le Fas et le TNF α (Tumor Necrosis Factor) et TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) ou intrinsèque (**Figure 3**) comme les agents endommageant l'ADN, la privation en facteurs de croissance, les hormones, le choc thermique, les radiations, l'hypoxie via la mitochondrie (Ashkenazi & Dixit, 1998).

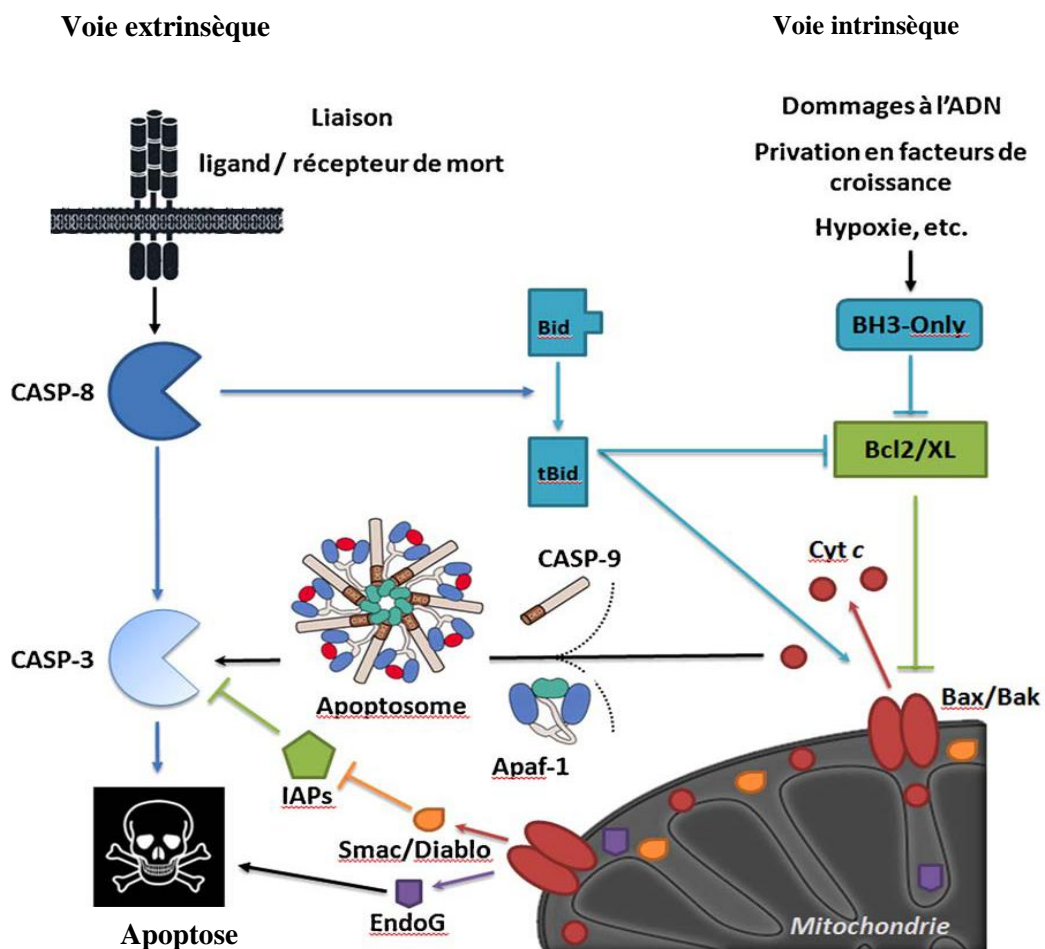


Figure 3: Les voies d'activation de l'apoptose, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie extrinsèque ou la voie des récepteurs à domaine de mort est initiée par des signaux extracellulaires comme le ligand Fas ou le TNF- α , qui activent directement les caspases. La voie intrinsèque ou la voie mitochondriale est initiée par divers signaux comme les lésions de l'ADN, carence en facteurs trophiques, hypoxie et les irradiations qui aboutissent à une modification de la perméabilité de la membrane externe des mitochondries (Boumela et al., 2009).

1.4.1.1. Voie extrinsèque

La voie extrinsèque est appelée également la voie des récepteurs de la mort. Elle est initiée par la fixation d'un ligand de la mort extracellulaire, tel que Fas-L, TNF α ou TRAIL, à son récepteur à la surface de la cellule (Ashkenazi et al. 1998). Les récepteurs de la mort appartiennent à la superfamille des récepteurs du TNF. Ils sont caractérisés par des domaines extracellulaires riches en cystéine impliqués dans la liaison du ligand (Nagata, 1997) et ont la particularité de posséder dans leur portion intracytoplasmique, une région hautement conservée, appelée domaine de la mort (DD pour Death Domain), nécessaire à la transmission du signal de la mort (Tartaglia et al., 1993).

L'activation des récepteurs à DD permet le recrutement à la membrane des protéines adaptatrices cytosoliques nommées FADD (Fas Associated Death Domain) ou TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain). Ces derniers possèdent un DD dans leur partie C-terminale permettant leur interaction avec le récepteur à DD, et un domaine effecteur de la mort dans leur partie N-terminale permettant leur fixation sur la procaspase-8. Le complexe multiprotéique formé par Fas/FADD ou TNFR/TRADD et la procaspase-8 est appelé DISC (Death Inducing Signalling Complex). Le rapprochement des formes zymogènes de la procaspase-8 au sein du DISC permet leur activation par clivage protéolytique et la libération des formes actives de caspas-8 dans le cytosol. La caspase-8 active va à son tour, activer par clivage protéolytique les caspases effectrices 3, 6 ou 7 (Medema et al., 1997; Peter & Krammer, 2003).

1. 4.1.2. Voie intrinsèque

Cette voie est également appelée voie mitochondriale. Elle est associée à des changements de perméabilité des membranes mitochondriales internes et externes. Ainsi, l'activation des caspases se produit comme conséquence de la perméabilisation mitochondriale (Green, 2000; Martinou & Green, 2001). Cette perméabilisation est contrôlée par des protéines de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma leukemia) qui peuvent être pro-apoptotiques comme Bax (Bcl-2 associated X protein) ou Bak (Bcl-2 homologous antagonist/killer) ou anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bcl-xl (longer alternatively spliced form of Bcl-x) (Adams & Cory, 2001). En effet, sous l'influence de différents stimuli intracellulaires (dommages de l'ADN, carence en facteurs trophiques, hypoxie, irradiation, stress oxydant, choc thermique ou osmotique...etc.), les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak s'oligomérisent, s'insèrent à la membrane de la mitochondrie pour former le pore de perméabilité transitoire (PTP). L'ouverture du PTP conduit à la libération dans le

cytoplasme de protéines mitochondriales comme le cytochrome c, SMAC/diablo (Second Mitochondria Derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with Low pI), AIF (Apoptosis Inducing Factor), et l'endonucléase G, qui vont activer des voies apoptotiques dépendantes ou indépendantes des caspases (Kroemer & Reed, 2000). Le cytochrome c libéré va s'associer avec la protéine Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) et la procaspase-9 pour former un grand complexe protéique appelé apoptosome au sein duquel la procaspase-9 va être activée par clivage protéolytique. La caspase-9 va ensuite à son tour activer par clivage les caspases effectrices 3 et 7 qui sont à l'origine des dommages cellulaires conduisant à la mort cellulaire (Rodriguez & Lazebnik, 1999; Riedl & Shi, 2004). La protéine AIF et l'endonucléase G provoquent des dommages cellulaires dans le noyau aboutissant à une condensation chromatinienne et une fragmentation de l'ADN, conduisant à l'apoptose des cellules indépendamment des caspases (Lu et al., 2003).

1.4.2. Phase d'exécution et de dégradation

La phase d'exécution est initiée par les caspases dont leur activation conduit au clivage des protéines vitales pour la cellule comme les protéines impliquées dans les réparations de l'ADN, le cycle cellulaire et la régulation de l'apoptose. Les caspases sont des protéases à cystéine qui clivent leur substrat du côté C-terminal d'un acide aspartique (Alnemri et al., 1996; Margolin et al., 1997). En 1996, Alnemri et ses collaborateurs ont proposé une nouvelle nomenclature qui regroupe les protéases à cystéine sous le nom de CASPASE, où C désigne le résidu cystéine du centre catalytique (QACxG) et «ASPASE» définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un résidu acide aspartique (Alnemri et al., 1996). Toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant, un pro-domaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous unité (17-21 kDa, qui porte le centre actif) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous unité (10-14 kDa). Certains membres de la famille des caspases possèdent un domaine de liaison entre la grande et la petite sous unité. Les pro-domaines sont variables, à la fois dans leur taille et dans leur séquence (**Figure 4**). Ainsi, les caspases 3, 6 et 7 ont un petit pro-domaine alors que les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9,10, 11, 12 et 13 possèdent un grand pro-domaine. Les caspases à petits pro-domaines sont regroupées sous le nom de caspases effectrices. Ces caspases sont activées par des caspases dites initiatrices (Ricci, 2000).

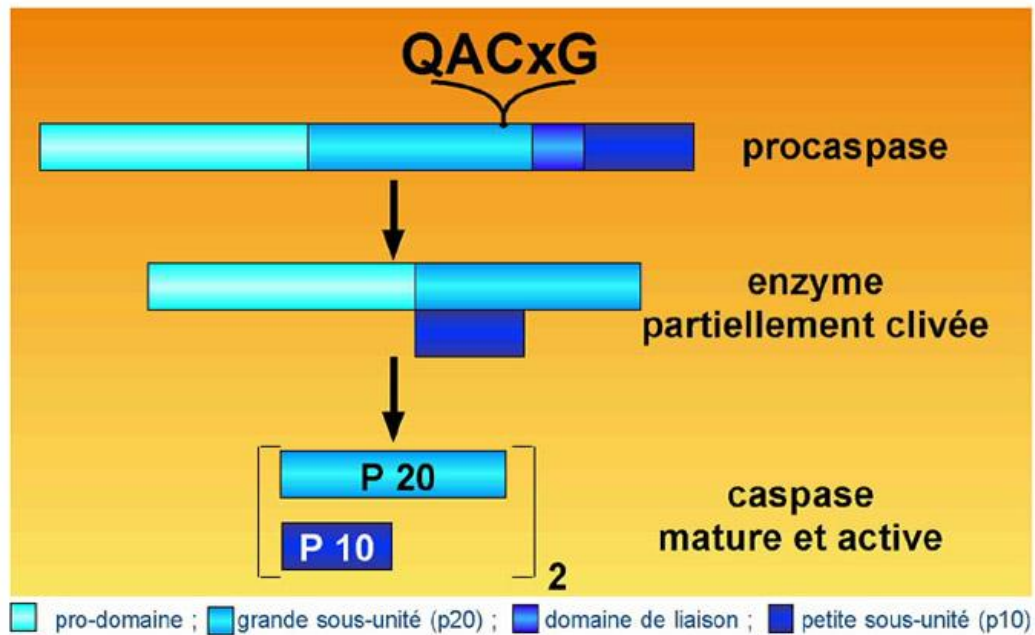


Figure 4: Structure et activation des caspases (Ricci, 2000).

Les pro-domaines semblent jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines. Ainsi, les pro-domaines des caspases-8 et 10 contiennent des domaines effectrices de mort cellulaire (DEDs: Death Effector Domains) qui sont des structures permettant la liaison de la caspase aux molécules adaptatrices FADD ou TRADD (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al, 1995). Certaines autres caspases (caspases-1, 2, 4 et 9) possèdent un domaine de recrutement des caspases (CARD: Caspase Recruitment Domain) (Hofmann et al., 1997). Ces CARDS jouent un rôle dans l'interaction entre caspases ainsi qu'avec une grande variété de molécules adaptatrices ou régulatrices (Ricci, 2000).

La conversion de la caspase à l'état de zymogène en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de la liaison Asp-x. Ces clivages successifs ont lieu de manière séquentielle. La première coupure s'effectue entre la grande et la petite sous-unité ce qui provoque le détachement de cette dernière du reste de la molécule, suivie par la libération de la grande sous-unité. La caspase va alors pouvoir s'assembler sous sa forme active, composée de deux grandes et deux petites sous-unités. La structure générale ainsi obtenue est $(p10/p20)_2$ (Walker et al., 1994). Les caspases vont s'auto activer et/ou être activées par d'autres caspases. Cette remarque introduit la notion de "cascade d'activation". Une fois les caspases initiatrices activées, elles vont pouvoir cliver d'autres caspases encore à l'état de zymogène, notamment les caspases effectrices. Ce type d'activation en cascade permet probablement la régulation et l'amplification du signal

(Rotonda et al., 1996). Après leur activation, les caspases effectrices vont permettre la dégradation de nombreux substrats cellulaires. En effet, La caspase-8/10 activées déclenchent une cascade d'activation d'autres caspases, à savoir la caspase-3, qui clivent à son tour certaines protéines cellulaires essentielles à la survie comme la protéine PARP (Poly-ADP Ribose-Polymerase) qu'est une enzyme intervenant dans les mécanismes de réparation transitoire de l'ADN, la protéine Tau et les protéines du cytosquelette (Hengartner, 2000; Hengartner & Bryant 2000).

1.5. Régulation

La régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire fait intervenir les protéines de la famille Bcl-2 qui jouent un rôle primordial dans la régulation du processus apoptotique mitochondrial. La famille Bcl-2 est ainsi dénommée parce que le premier membre de la famille qui a été identifié est impliqué dans un lymphome des cellules B (B-cell Lymphoma: BCL-2). Depuis, plus d'une vingtaine de protéines de cette famille ont été découvertes. Selon Kelekar et al., (1998), cette famille de protéines est classée en trois catégories distinctes (**Figure 5**):

- Les membres du premier groupe (BCL-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-w et A-1) se caractérisent au niveau fonctionnel par un effet anti-apoptotique et au niveau structural par la présence de 4 domaines BH1 à BH4 (BCL-2 Homology).
- Les membres du second groupe, auxquels appartient la protéine BAX, Bak et Mtd/Bok se caractérisent par un effet pro-apoptotique. Ce groupe possède seulement 3 domaines BH et leur manque le quatrième domaine BH4 amino terminal.
- Les membres du troisième groupe comportent des protéines plus variées (Bik, Hrk, Bim, Bek, Bad et Bid) dont le seul point commun est la présence des domaines BH3. Ces protéines ont aussi un effet pro-apoptotique.

Il est à noter que la plupart de ces protéines possèdent un domaine carboxy terminal hydrophobe. Ce domaine leur permet d'être ancrées dans la membrane de la mitochondrie et parfois dans celle du réticulum endoplasmique, dont la plus grande partie de la protéine, du côté amino-terminal est située dans le cytosol (Korsmeyer et al., 2000).

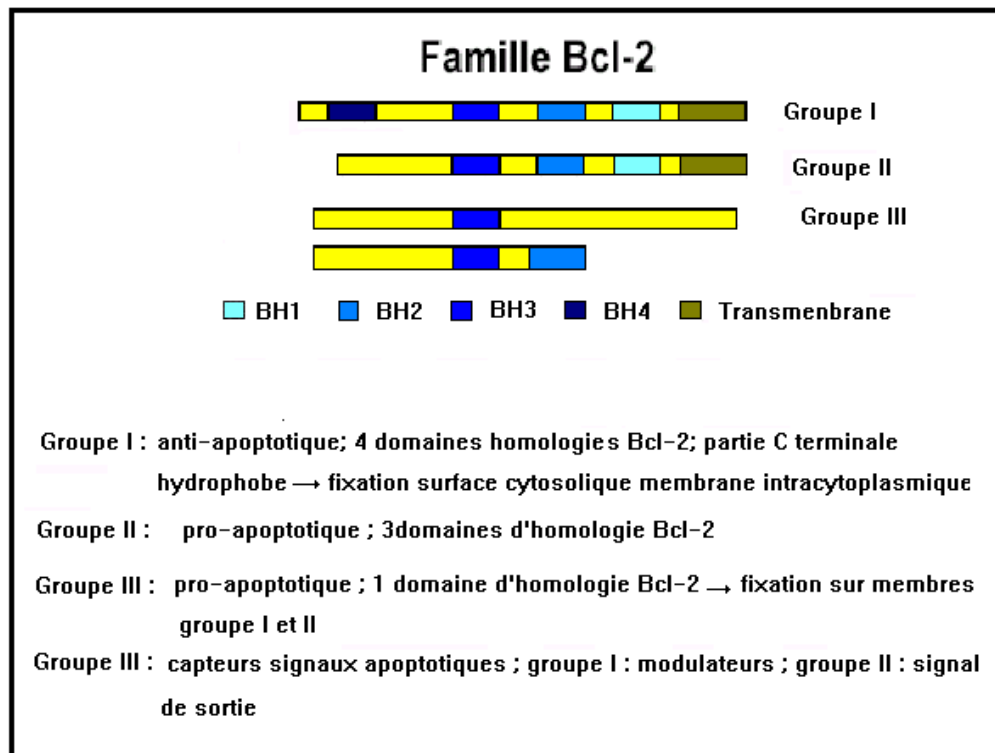


Figure 5: Les protéines de la famille Bcl-2 (Alberts, 2003).

En l'absence de signaux de mort, les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont localisées dans des compartiments subcellulaires différents (Korsmeyer et al., 2000). En effet, au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, les protéines anti-apoptotiques contrôlent la libération des facteurs apoptogènes (tel que le cytochrome c) ainsi que l'activation des caspases dans le cytosol. Au contraire, avant le signal de mort, les membres pro-apoptotiques sont localisés au niveau du cytosol ou du cytosquelette (Hsu et al., 1997; Gross et al., 1998).

2. Cancer

Le cancer est une maladie multifactorielle qui correspond à une multiplication anarchique et incontrôlée de certaines cellules normales de l'organisme. Ces cellules échappent aux mécanismes normaux de différenciation, de régulation de leur multiplication et résistent à la mort cellulaire programmée. Pour qu'un cancer se développe, la cellule doit accumuler plusieurs mutations dans son génome (Macdonald et al., 2003). Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors

de la division cellulaire. Le cancer se développe à partir d'une seule cellule saine en un ensemble de cellules cancéreuses (Macdonald et al., 2003; Mareel & Leroy, 2003).

2.1. Epidémiologie

Le cancer constitue la première cause de mortalité dans le monde. L'OMS estime que le cancer ferait 84 millions de morts entre 2005 et 2015 si aucune mesure n'est prise (Hamdi Cherif et al., 2013). Selon l'union du control international du cancer (UICC), chaque jour 17 personnes en moyenne meurent par le cancer. En effet, sur un total de 58 millions de décès enregistrés au niveau mondial en 2005, 7,6 millions (soit 13 %) étaient dus au cancer. Sachant que plus de 70 % des cas de décès survenus en 2005 concernaient les pays en voie de développement (UICC, 2007).

En Algérie, l'incidence du cancer est en nette augmentation, on compte environ 40.000 nouveaux cas par an. Selon le registre du cancer de la wilaya de Sétif, environ 5000 nouveaux cas par an de cancer sont enregistrés dans la région Sétifienne (Hamdi cherif et al., 2013).

Il est à noter qu'en Algérie la situation est alarmante, les adolescents et les jeunes adultes âgés entre 15 et 39 ans sont de plus en plus affectés par le cancer dont la consanguinité, l'alimentation et l'environnement sont les facteurs les plus incriminés. Les localisations les plus importantes de ces cancers sont le nasopharynx, le sang, le côlon, le rectum et le sein chez la femme (Hamdi Cherif et al., 2013).

2.2. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse

Pour devenir cancéreuse, une cellule doit accumuler certaines altérations précises de sa physiologie qui se résume en six caractéristiques (**Figure 6**):

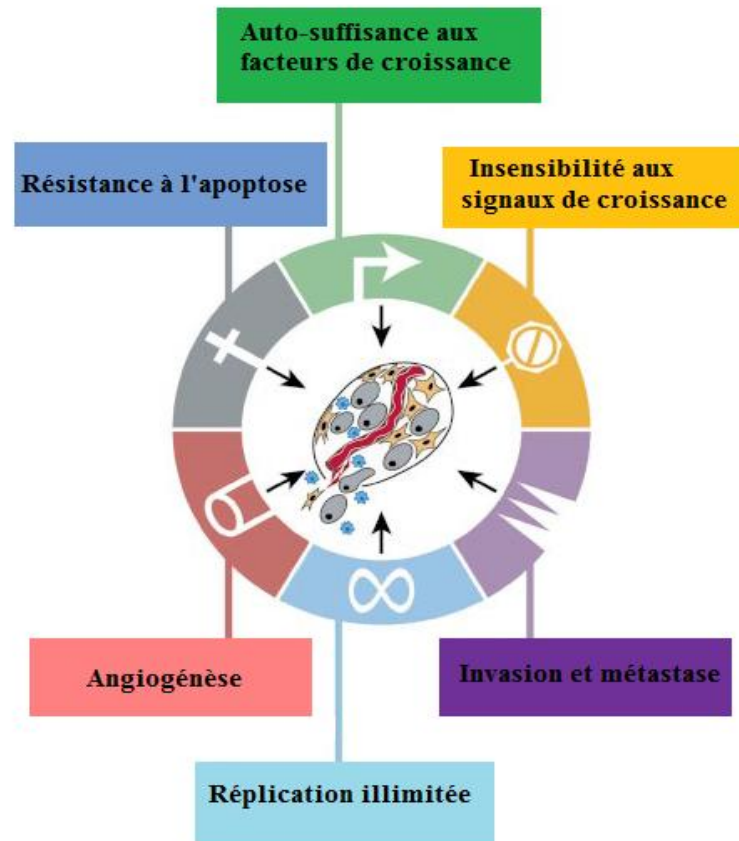


Figure 6: Les six caractéristiques d'un cancer (Hanahan & Weinberg, 2000).

2.3. Etapes de la cancérogenèse

Pour donner lieu à un cancer, la cellule devrait passer par un processus de cancérogenèse se résumant en plusieurs étapes (Figure 7):

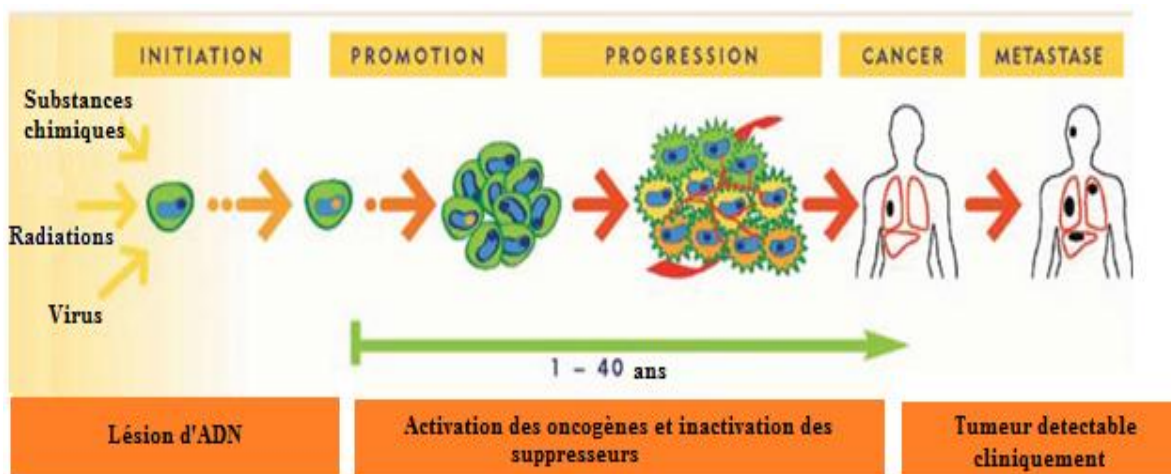


Figure 7: Différentes étapes du cancer (Béliveau & Gingras, 2007).

2.3.1. Initiation

Elle correspond à une lésion rapide et irréversible de l'ADN après une exposition à un agent carcinogène tel que les produits chimiques, les virus et les radiations. L'initiation consiste donc, en une dérégulation au niveau de certains gènes aboutissant à une transformation cellulaire. Cette étape cible les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, les gènes de réparation de l'ADN et les gènes de l'apoptose (Sherbet & Lakshmi, 1997).

2.3.2. Promotion

Elle correspond à une exposition prolongée, répétée ou continue, à une substance qui entretient et stabilise la lésion initiée. Cette étape consiste en une prolifération plus ou moins contrôlée des cellules initiées en processus d'acquérir les caractéristiques lui permettant de générer un cancer. Elle résulte d'une cascade d'interactions entre les cytokines et leurs récepteurs, ce qui amène à la perte de l'homéostasie tissulaire et l'émergence de clones cellulaires transformées. Plusieurs agents dits promoteurs de carcinogenèse sont impliqués dans cette étape. La nutrition et les habitudes alimentaires, l'alcoolisme, le tabagisme, les infections les traumatismes répétés et l'âge sont les plus importants (King, 1996).

2.3.3. Progression

Durant l'étape de la progression, la prolifération des cellules tumorales est incontrôlable et le cancer devient cliniquement détectable (plus de 10^9 cellules). Cependant, du fait du nombre très important de mitoses, les cellules finissent par acquérir certaines propriétés d'autonomie de croissance, une adaptabilité métabolique et une pharmacorésistance. Durant la progression, une perte de fonction caractérise les cellules cancéreuses qui deviennent alors incapables d'effectuer leurs fonctions normales au sein d'un tissu. De même, l'instabilité génétique conduit les cellules cancéreuses à l'acquisition de nouvelles propriétés d'indépendance et de nouvelles caractéristiques fonctionnelles. La tumeur, à ce stade d'évolution du cancer, comporte 3 compartiments cellulaires: les cellules souches en division, les cellules quiescentes et les cellules incapables de se diviser et qui finiront par mourir. Seules les cellules du premier compartiment, et qui sont dotées de pouvoir d'autoreproduction, sont potentiellement dangereuses. Il ne s'agit encore que d'un stade du cancer *in situ* couramment appelé cancers intra-épithéliaux (Liotta, 1992).

2.3.4. Invasion

Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses ne respectent plus les relations structurelles et tissulaires et s'infiltrant puis envahissent les tissus voisins. Le mécanisme le plus important dans l'invasion tumorale est la perte d'adhésion des cellules entre elles à cause de la perte ou la modification des glycoprotéines de surface membranaire qui assurent à l'état normal la reconnaissance des cellules d'un même tissu. De même, la constitution d'épithélium qui est bien organisé, empêchent la congruence des cellules entre elles et préparent les cellules cancéreuses à traverser les membranes basales (structures qui séparent les couches cellulaires de surface et le tissu conjonctif, tissu de soutien) en essayant de les dissoudre soit par elles-mêmes, soit par la stimulation des cellules mésenchymateuses avoisinantes, cela afin d'envahir les tissus voisins (Weinberg, 1998). La rupture et le franchissement de la membrane basale représentent un critère formel pour distinguer les cancers invasifs des cancers *in situ*. Durant ce stade, les cellules vont également acquérir une certaine mobilité pour s'approcher des vaisseaux sanguins (Sherbet & Lakshmi, 1997).

2.3.5. Angiogenèse

Une fois les cellules cancéreuses franchissent les membranes basales, elles passent aux vaisseaux du tissu conjonctif (artères, veines lymphatiques) et aux organes adjacents. La sécrétion des facteurs impliqués dans l'angiogenèse et des facteurs protéolytiques durant cette étape permet aux cellules cancéreuses de constituer leur propre réseau de capillaires nourriciers indispensables à leur prolifération. La stimulation des cellules endothéliales des capillaires voisins par les cellules cancéreuses permet de former des boucles vasculaires en leur direction, pour l'apport en nutriments et en oxygène (McCarthy, 2008). Les cellules cancéreuses vont également stimuler les cellules mésenchymateuses normales, aboutissant à ce qu'on appelle le stroma réaction qui permet le développement d'un tissu de soutien non cancéreux à la tumeur et qui est nécessaire à sa survie. Dans certaines tumeurs, notamment dans le cas des cancers endocriniens différenciés ou des carcinomes hépatocellulaires, le stroma s'adapte à la différenciation de la tumeur et prend un type endocrine (Berstein & Santen, 2008).

2.3.6. Métastases ganglionnaires

La gravité d'un cancer réside dans sa capacité de développer des métastases à distance. Les cellules cancéreuses utilisent les mêmes mécanismes pour envahir les

vaisseaux lymphatiques et sanguins. Ainsi, le drainage lymphatique des tissus normaux explique leur envahissement rapide par les cellules cancéreuses qui sont emportées par le courant lymphatique vers les sinus corticaux du premier relais ganglionnaire. L'arrivée des cellules cancéreuses dans les ganglions est souvent accompagnée d'un état réactionnel, sous forme de lymphadénite chronique non spécifique (Fajardo et al., 1982). Les cellules cancéreuses vont être soit détruites, soit survivent au stress. Dans ce dernier cas, elles peuvent se fixer aux parois en restant quiescentes, ou se multiplier pour donner une métastase ganglionnaire palpable. Les cellules cancéreuses peuvent également soit traverser le ganglion pour gagner les relais ganglionnaires suivants, soit infiltrer tout le trajet des vaisseaux lymphatiques occasionnant ainsi une lymphangite carcinomateuse (August et al., 1985).

2.3.7. Métastases sanguines

Dans cette étape les cellules cancéreuses gagnent de multiples organes via le cœur après leur passage dans la circulation veineuse ou lymphatique. La dissémination hématogène des cellules cancéreuses est particulièrement fréquente pour les sarcomes, ainsi que pour de nombreux carcinomes touchant plusieurs organes à savoir les poumons, l'estomac, les reins, la prostate, les organes endocriniens et colorectaux, avec des localisations préférentielles des métastases selon le type d'organe malade. Ces préférences s'expliquent soit par le drainage habituel de l'organe atteint (le foie par voie portale pour un cancer colique), soit par la présence de glycoprotéines spécifiques d'adhésion des cellules cancéreuses aux capillaires des organes cibles (exemple de l'os dans le cancer de la prostate). Certains cancers, comme celui de la peau, n'ont pas de métastases. D'autres, au contraire, en produisent très souvent: c'est le cas des cancers du sein, de la thyroïde, des bronches ou de la prostate (Barinaga, 1997; Dennis et al., 1999). En plus de la dissémination hématogène et lymphatique, il existe d'autres modes de dissémination qui sont la dissémination par voie cavitaire, connue aussi sous le nom de voie séreuse (cancer de l'ovaire, cancer du colon), la dissémination anatomique le long des conduits naturels par voie canalaire (uretère, vessie) et enfin, la dissémination par le liquide céphalorachidien a été reconnue responsable des métastases leptoméningées ou des métastases dans les ventricules (Bettaieb, 2009).

2.4. Types de cancers

Les cancers diffèrent selon les caractéristiques des tumeurs: tumeur bénigne, maligne ou métastatique, et aussi selon leurs origines tissulaires. Selon le tissu touché, on peut subdiviser les cancers en 3 groupes (Aimé-Genty, 1997):

2.4.1. Sarcomes

Les sarcomes se développent à partir des tissus qui dérivent du mésoderme comme le tissu mésenchymateux (tissu primitif chez l'embryon), conjonctif, cartilagineux, osseux, adipeux, ou de tissus constituant la paroi des vaisseaux sanguins ou les muscles.

2.4.2. Carcinomes

Les carcinomes correspondent à la forme la plus courante des cancers, ils représentent 85 % des cancers qui touchent l'homme. Ils dérivent soit des tissus épithéliaux de revêtement (épiderme, couche superficielle de certaines muqueuses des cavités de l'organisme) on parle dans ce cas de carcinomes épidermoïdes, soit des tissus épithéliaux glandulaires (partie glandulaire des seins et de la prostate, par exemple) et on parle d'adénocarcinomes.

2.4.3. Hématosarcomes

Les hématosarcomes sont des cancers des cellules sanguines comme les leucémies, les myélomes et les lymphomes.

2.5. Traitement du cancer

L'objectif du traitement du cancer est l'élimination de la tumeur cancéreuse ainsi que la prévention de l'apparition d'autres tumeurs localisées ou métastatiques. D'une façon générale, On distingue deux méthodes de traitements du cancer: Les méthodes classiques et les méthodes alternatives.

2.5.1. Méthodes classiques

2.5.1.1. Chirurgie

La chirurgie consiste en l'ablation de la tumeur, soit partiellement (chirurgie limitée), soit dans sa totalité (chirurgie monobloc radicale). Son but est de permettre de soulager les symptômes et de réduire les risques de propagation du cancer chez le patient (Auckland, 2008; Lefferts et al., 2008). De plus, la diminution de la quantité de cellules cancéreuses

dans le corps accroît souvent l'efficacité des autres formes de traitement. L'inconvénient de la chirurgie est qu'elle ne s'utilise pas pour des cellules cancéreuses diffuses qui se trouvent dans toute la circulation sanguine. De même, le risque d'infection peut être élevé chez des patients à système immunitaire fragile (Givel et al., 2007).

2.5.1.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'administration de substances chimiques, cytotoxiques pour les cellules souches, dans le but d'arrêter ou de ralentir l'évolution de la multiplication des cellules tumorales, ainsi que pour limiter ou prévenir la formation des métastases. La chimiothérapie est également utilisée pour réduire la taille d'une tumeur trop volumineuse et faciliter ainsi son traitement par la chirurgie (Chabner & Roberts, 2005).

Les médicaments anticancéreux sont maintenant prescrits systématiquement dès la prise en charge du patient. Souvent, ils sont prescrits en association avec la radiothérapie ou la chirurgie. Selon le niveau respectif auquel ils interviennent, ils sont classés en: les antimétabolites, les alkylants, les antibiotiques anticancéreux et les antimitotiques (Chabner & Roberts, 2005).

Les antimétabolites: Les antimétabolites sont des analogues des bases ou des métabolites qui entrent dans la constitution des acides nucléiques en inhibant leur synthèse par antagonismes compétitifs (Lechat et al., 1982; Cohen, 1997). Parmi les antimétabolites, on cite: les antifoliques (le méthotrexate), les analogues des purines (le 6-mercaptopurine, l'azathioprine et la thioguanine) et les antagonistes des pyrimidines comme la cytarabine (Lechat et al., 1982).

Les agents alkylants: Les alkylants sont des agents capables de remplacer un proton d'une molécule par un groupement alkyle. Les substrats biologiques de l'alkylation sont l'eau, les groupes thiols, les hydroxyles, les carboxyles, les ions phosphates et les amines. Cependant, seule l'alkylation des bases hétérocycliques des acides nucléiques semble intervenir dans leur activité cytotoxique (Schorderet & Dayer, 1992).

Les antibiotiques anticancéreux: Les antibiotiques anticancéreux sont des agents capables de se fixer à l'ADN et former des complexes qui empêchent sa transcription. Parmi les antibiotiques anticancéreux, l'actinomycine D, l'adriamycine, la daunorubicine et la bléomycine sont les plus utilisés (Lechat et al., 1982).

Les antimitotiques: Les antimitotiques sont des produits ayant la capacité de se fixer de manière spécifique sur la tubuline en inhibant leur polymérisation pour former le fuseau

mitotique. Ainsi, ils bloquent la cellule en une métaphase prolongée, ce qui déclenche l'apoptose. Les représentants de cette classe sont les vinca-alcaloïdes (vinblastine, vincristine) et les taxanes (Paclitaxel, Docétaxal) (Lechat et al., 1982; Chabner & Roberts, 2005).

Malheureusement, la plupart de ces agents chimiothérapeutiques sont aussi cytotoxiques pour les tissus sains, surtout si la méthode d'administration est intraveineuse. Ceci explique les nombreux effets secondaires de la chimiothérapie, qui sont pour la plupart du temps tardifs et qui touchent certains organes en particulier, le sang, le cœur, le foie et les reins (Zelnak, 2007; Gerber, 2008). De plus, plusieurs types de résistance à la chimiothérapie ont été observés dans la pratique clinique et ils représentent à leur tour un grand obstacle pour la chimiothérapie. La résistance intrinsèque, la chimiorésistance acquise suite à la surexpression de protéines membranaires les P-glycoprotéines (Pgp 170) et les protéines associées à la multidrogue résistance ou l'amplification de gènes codant pour des protéines de réparation de l'ADN sont des obstacles couramment rencontrés (Perez-Tomas, 2006; Kappelmayer et al., 2007).

2.5.1.3. Radiothérapie

La radiothérapie est une méthode de traitement qui utilise les rayonnements ionisants. Elle vise à éradiquer localement toute trace de cancer. Elle peut être utilisée seule, ou en association avec la chirurgie, soit en pré-opératoire, mais le plus souvent en postopératoire. La radiothérapie s'applique à la fois sur la tumeur primitive et sur les territoires ganglionnaires (Meyer et al., 2007). Comme la chimiothérapie et la chirurgie, la radiothérapie peut être dangereuse en cas de complications. Les effets secondaires dépendent souvent de la zone irradiée et de la dose de radiations appliquée.

2.5.1.4. Immunothérapie

L'immunothérapie anti-tumorale est une méthode qui vise à renforcer les défenses naturelles, spécifiques ou non spécifiques, de l'individu contre la tumeur. On distingue trois formes d'immunothérapies (Paul & Étienne, 2002):

L'immunothérapie spécifique: Elle consiste à injecter un ou plusieurs antigènes tumoraux (antigène de télomérase, antigène de différenciation mélanocytaire), sous différentes formes, afin de stimuler une réponse immunitaire spécifique via les lymphocytes T *in vivo*.

L'immunothérapie non spécifique: Elle consiste en l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale indépendante d'un antigène spécifique. Ce type de stratégie permet de cibler

la majorité des tumeurs sans nécessiter l'identification d'antigènes spécifiques. De plus, elle permet la stimulation d'une réponse immunitaire préexistante souvent bloquée par les mécanismes d'immunosuppression développés par la tumeur.

L'immunothérapie cellulaire adoptive: Elle implique le transfert de cellules immunocompétentes à des patients atteints de cancer. Les cellules T, les macrophages, les cellules NK ont été utilisées dans ce type d'approche.

2.5.1.5. Hormonothérapie

L'hormonothérapie est souvent utilisée pour traiter plusieurs types de cancers hormono-dépendants, notamment le cancer de la prostate, le cancer du col de l'utérus, le cancer de la thyroïde et le cancer du sein. Elle agit sur la production des hormones responsables de la prolifération des cellules tumorales, soit par prise de médicaments pour la supprimer temporairement, soit par ablation de l'organe sécréteur de l'hormone impliquée. De même, l'action directe ou indirecte sur l'hormone stimulante peut être effective suite à l'utilisation soit des anti-hormones, soit des inhibiteurs de leur synthèse (Bershtein et al., 2004).

2.5.2. Traitements alternatives

2.5.2.1. L'enzymothérapie

C'est une thérapie à base de combinaison d'enzymes protéolytiques jouant un rôle majeur dans le traitement biologique du cancer. Il s'agit d'une nouvelle approche thérapeutique très prometteuse, encore expérimentale.

2.5.2.2. La thérapie génique

Cette technique consiste en l'introduction dans une cellule, dite cible, d'un matériel génétique constitué d'un gène sous la dépendance d'une séquence de régulation. Cette séquence de régulation est habituellement un promoteur. Le gène est introduit soit directement sous forme d'ADN nu, soit grâce à un vecteur, dans le génome de la cellule cible. L'expression de ce gène modifiera les propriétés fonctionnelles de la cellule. En cancérologie, il s'agit d'une méthode thérapeutique visant à traiter la maladie en modifiant la séquence d'ADN des gènes impliqués dans la prolifération tumorale (Ardailou, 2002).

2.5.3. Traitements complémentaires

L'objectif de ces traitements est d'éviter les effets secondaires et l'immunosuppression des thérapies classiques. Parmi les traitements complémentaires on peut citer:

La thérapie orthomoléculaire: Elle consiste à optimiser l'environnement cellulaire avec un bon régime alimentaire équilibré de molécules naturelles, en particulier, les antioxydants naturels comme les vitamines, les minéraux et huiles (Lesser, 1987).

L'ozonothérapie: Elle consiste à utiliser l'ozone pour traiter les différentes affections et symptômes. L'ozone est connu pour stimuler la production d'antioxydants et prévient donc les agressions cytotoxiques des radicaux libres sur les protéines, les lipides et l'ADN, ce qui ralentit le développement et la progression des tumeurs (Menabde et al., 2006).

L'hyperthermie (thermothérapie): L'hyperthermie est une nouvelle méthode utilisée dans le traitement de certains types de cancers comme les cancers du cerveau, de la vessie, du rectum et de l'œsophage, ainsi que des pathologies urogénitales chroniques. Cette méthode peut être utilisée seule ou en combinaison avec la radiothérapie, la chimiothérapie et la thérapie génique. Le principe de ce traitement consiste à envoyer de la chaleur grâce à des ondes électromagnétiques jusqu'à la tumeur. Ces dernières étant mal vascularisées, elles sont incapables d'évacuer la chaleur ce qui induit leur mort (Basile et al., 2008). Souvent, l'application de la chaleur aboutit aussi à l'activation de l'ensemble du système immunitaire et à la lutte contre toutes les infections dissimulées (Manjili et al., 2002).

2.5.4. Phytothérapie

La phytothérapie consiste à utiliser des plantes comme médicaments pour rétablir et conserver le corps en bon état. Plus de 80 % de la population mondiale l'utilisent pour les divers problèmes de santé (Farnsworth & Kass, 1986). Plusieurs études scientifiques ont confirmés les biens faits des plantes médicinales dans la guérison ou le soulagement de plusieurs maladies y compris le cancer. En effet, un nombre importants d'études *in vitro* ont montré que les extraits bruts, aqueux ou hydro-alcooliques, de quelques plantes médicinales exercent un effet cytotoxique sur différentes lignées de cellules cancéreuses (Jo et al., 2008; Ray et al., 2010; Rakhi et al., 2011). Les flavonoïdes sont considérés parmi les molécules bioactives les plus importantes.

3. Cytarabine

3.1. Définition et structure

La cytarabine (1- β -D-arabinofuranosyl cytosine; AraC; Cytostar-U) appartient à la famille des antimétabolites, elle est isolée à partir de l'éponge Caribéen *Cryptotheca crypta* (Arif et al., 2004). La cytarabine, analogue du 2'-désoxy-cytidine, est un nucléotide anormal caractérisé par la présence de l'arabinose à la place du ribose dont le 2'-hydroxyle est en position trans par rapport au 3'-hydroxyle (**Figure 8**) (Chabner al., 1998).

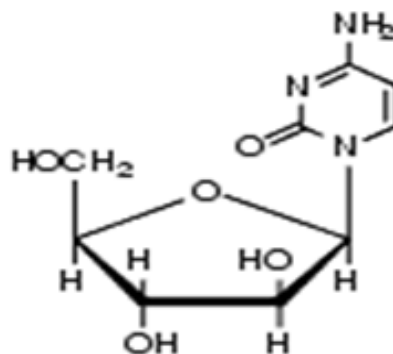


Figure 8: Structure de la cytosine arabinoside (cytarabine; AraC; Cytostar-U) (Chabner et al., 1998).

3.2. Pharmacocinétique et métabolisme

La pharmacocinétique de L'AraC chez l'homme varie en fonction de la dose et surtout des modalités d'administration. Suite à une administration orale, l'Ara-C est dégradé dans le tube digestif dont 20% seulement de la dose atteint la circulation générale. Mais, après une administration intraveineuse, l'AraC est rapidement disparue avec un temps de demi-vie de 10 minutes. Cependant, lors de l'administration intrarachidienne de l'AraC, il a été démontré qu'un peu de désamination se produit même après 7 heures. Quand à l'injection intrathécale, le temps de demi vie de l'AraC dans le LCR est d'environ 2 heures (Chabner et al.,1998).

Une fois au niveau tissulaire, le passage de l'AraC à travers les membranes cellulaires dépend de sa concentration plasmatique. A haute concentration, il se fait par diffusion facilitée, et à faible concentration, il fait intervenir le transport actif. Puis, l'AraC

subi une activation enzymatique par phosphorylations successives. Dont les enzymes, qui activent l'ARA-C, sont celles qui assurent l'activation du ribonucléoside naturel, la déoxycytidine. Deux enzymes jouent un rôle important: la déoxycytidine kinase (ARA-C Y ARA-CMP) et la déoxycitidilate kinase (ARA-CMP Y ARA-CDP). Ceci aboutit à la formation du métabolite actif l'ARA-CTP (arabinofuranosylcytosine tri-phosphate) qui joue un rôle déterminant dans la cytotoxicité du produit (Schorderet et al., 1992; Chabner & Roberts, 2005).

L'Ara-C est principalement métabolisée au niveau hépatique (Schorderet et al., 1992). Moins de 10 % de la dose injectée est excrétée sous forme inchangée dans les urines dans les 12 à 24 heures, alors que la majorité est transformée en un produit désaminé et inactif, l'arabinofuranosyl uracile (AraU) par la cytidine déaminase, enzyme présente dans de nombreux tissus mais principalement dans le foie et aussi dans les cellules leucémiques et la moëlle. Les concentrations plasmatiques, d'AraU sont plus élevées que celles de la l'AraC et leur décroissance plasmatique est lente. Son élimination se fait exclusivement par voie urinaire sous forme inactive (AraU). La dose ne semble pas devoir être réduite en cas d'insuffisance rénale (Lechat et al., 1982; Schorderet et al., 1992; Chabner et al., 1998).

3.3. Mécanisme d'action

Comme la plus part des antimétabolites, la cytarabine doit être activée par conversion en nucléotide 5'-mono-phosphate (Ara CMP), qui est catalysée par la desoxycytidine kinase au détriment de la desoxycytidine (Lechat et al., 1982). L'Ara CMP peut alors réagir avec les kinases nucléotidiques appropriées pour former les nucléotides di et triphosphate (Ara-CDP et Ara-CTP). L'Ara-CTP inhibe l'ADN-polymerase α et β de façon compétitive et peut être incorporée dans la chaîne d'ADN en inhibant son élongation et empêchant les mécanismes de réparation. Par conséquent, ces mécanismes aboutissent à un blocage de la phase S du cycle cellulaire (Schorderet et al., 1992; Braess et al., 1999; Chabner & Roberts, 2005). De même, au cours de la réplication, l'incorporation de l'AraC dans le brin d'ADN inhibe l'extension des fragments d'Okazaki et provoque leur instabilité et empêche l'élongation de l'ADN ce qui déclenche la mort de la cellule (Gmeiner et al., 1998). Selon Braess et ses collaborateurs (1999), l'incorporation de l'AraCTP et de l'AraUMP dans l'ADN et l'ARN respectivement, inhibe la réplication de l'ADN et la transcription de l'ARN ce qui déclenche le suicide programmé des cellules. En plus,

d'autres études ont montré que l'AraC peut activer quelques voies de la signalisation cellulaire à savoir les voies de la PKC et du MAPK (Kharbanda et al., 1994), et inhiber d'autres voies à savoir les voies AP-1 et NF- κ B (Brach et al., 1992 a, b). Sreenivasan et ses collaborateurs (2003) ont montré également que l'AraC induit l'apoptose au niveau des cellules qui expriment le NF- κ B qui est connu pour son activité inductrice de leur prolifération et inhibitrice de leur l'apoptose. Enfin, l'AraC peut induire l'apoptose au niveau des cellules cibles indirectement via la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Kanno et al., 2004).

3.4. Mécanismes de résistance à la cytarabine

Plusieurs mécanismes biochimiques ont été identifiés dans des sous populations de lignées tumorales murines ou humaines résistantes à l'AraC, dont le plus fréquent est un déficit en desoxycytidine kinase (Flasshove et al., 1994). Un autre mécanisme de résistance est l'expansion marquée du pool de dCTP due à l'augmentation de l'activité de la CTP synthase (Chabner et al., 1998). Les concentrations accrues de dCTP intra cellulaire bloquent probablement les actions de l'AraC sur la synthèse d'ADN. De même, d'autres mécanismes concernent une augmentation de l'activité de la cytidine désaminase et une affinité réduite de l'ADN polymérase pour l'Ara-CTP. Cependant, au niveau clinique il est difficile d'interpréter la résistance à l'Ara-C (Chabner et al., 1998).

3.5. Indications thérapeutiques

L'AraC est essentiellement indiquée dans le traitement des leucémies aiguës, principalement les leucémies aiguës myéloblastiques de l'adulte et de l'enfant. Elle est utilisée à doses conventionnelles lors du traitement d'induction de la rémission et du traitement d'entretien, et à hautes doses lors des rechutes. De même, L'AraC peut être utilisée, le plus souvent à des doses conventionnelles, dans certains cas de lymphomes non hodgkiniens voire d'autres tumeurs solides (Chabner & Roberts, 2005).

3.6. Effets toxiques

La toxicité de l'Ara-C dépend de sa dose et de son mode d'administration (Schorderet et al., 1992). La cytarabine est avant tout un puissant agent myélosupresseur. Son administration entraîne une aplasie ou une hypoplasie médullaire, responsable d'anémie, granulopénie, thrombopénie, mégaloblastose et chute du taux des réticulocytes.

La sévérité de l'aplasie dépend de la dose administrée et du schéma thérapeutique utilisé. En relation avec l'aplasie, des complications hémorragiques ou infectieuses graves peuvent venir compliquer secondairement la cure de chimiothérapie. L'AraC peut entraîner d'autres manifestations toxiques comme les troubles gastro-intestinaux, les stomatites, les conjonctivites, les hépatites cholestatiques réversibles, une pneumonie, une fièvre et une dermatite (Herzig et al., 1983).

La toxicité neurologique, aux doses usuelles, est minime, elle est marquée par des céphalées. Mais à forte dose, on dénote chez 10 à 30 % des malades une toxicité cérébelleuse importante, exprimée par une ataxie et une dysarthrie (Schorderet et al., 1992). Les manifestations neurologiques ne sont pas constamment réversibles. On observe des hépatites chroniques persistantes voire cirrhotiques, d'étiologie complexe, après traitement d'induction et de réinduction contenant de l'AraC, au cours des leucémies aiguës (Schorderet et al., 1992; Chabner et al., 1998).

4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes qui appartiennent à la famille des polyphénols qui compte presque 8000 composés polyphénoliques naturels (Stalikas, 2007).

4.1. Structure chimique et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des phénylbenzo-pyrones (phénylchromones). Leur structure moléculaire, C₆-C₃-C₆, comprend deux noyaux aromatiques, A et B, liés par un hétérocycle oxygéné C (**Figure 9**).

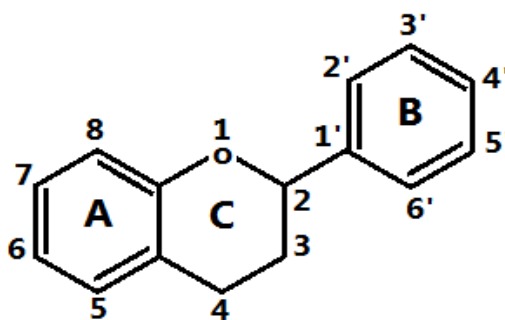
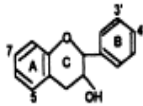
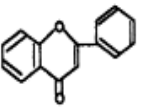
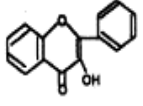
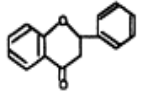
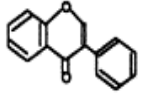
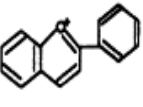


Figure 9: Structure générale des flavonoïdes (Heim et al., 2002).

Leur cycle A est synthétisé par la condensation de 3 molécules du malonyl-coenzyme A, issue du métabolisme du glucose. Les cycles B et C ont comme précurseur immédiat l'acide cinnamique qui est formé par la voie de l'acide shikimique. Ce dernier, lui-même, dérivé du métabolisme du glucose (Markham, 1982; Formica & Regelson, 1995).

Plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés à partir de sources végétales (Harborne & Williams, 2000; Boumendjel et al., 2002). Structurellement, ils se répartissent en quinze familles, dont les plus importants sont (**Tableau 3**): les flavanols, les flavones, les flavanones, les flavannonols, les isoflavones, les isoflavannones, les chalcones et les anthocyanes (Formica & Regelson, 1995; Bruneton, 2009).

Tableau 3: Structures des différentes classes de flavonoïdes et leurs sources alimentaires (Heim et al., 2002).

| Classe | Structure générale | Flavonoïde | Substitution | Sources alimentaires |
|------------------------------|---|--------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Flavanol |  | (+)-catechin | 3,5,7,3',4'-OH | Thé (<i>Camellia sinensis</i>) |
| | | (-)-epicatechin | 3,5,7,3',4'-OH | Thé |
| | | Epigallocatechin gallate | 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallate | Thé |
| Flavone |  | chrysin | 5,7-OH | Peau de fruit |
| | | apigenin | 5,7,4'-OH | Persil, céleri |
| | | rutin | 5,7,3',4'-OH, 3-rutinosose | Vin rouge, sarrasin |
| | | luteolin | 5,7,3',4'-OH | Agrumes, peau de tomate |
| Flavonol |  | luteolin glucosides | 5,7,3'-OH, 4'-glucose | Poivron rouge |
| | | kaempferol | 3,5,7,4'-OH | Poireau, brocoli, endives |
| | | quercetin | 3,5,7,3',4'-OH | pamplemousse, thé noir |
| Flavanone (dihydroflavon) |  | myricetin | 3,5,7,3',4',5'-OH | Raisins de canneberge, vin rouge |
| | | tamarixetin | 3,5,7,3'-OH,4'-OMe | |
| | | naringin | 5,4'-OH,7-rhamnoglucose | Agrumes, pamplemousse |
| | | naringenin | 5,7,4'-OH | Pamplemousse |
| | | taxifolin | 3,5,7,3',4'-OH | Pamplemousse |
| Isoflavone |  | eriodictyol | 5,7,3',4'-OH | Citron |
| | | hesperidin | 3,5,3'-OH,4'-OMe, 7-rutinosose | Orange |
| | | genistin | 5,4'-OH, 7-glucose | Soja |
| | | genistein | 5,7,4'-OH | Soja |
| Anthocyanidin |  | daidzin | 4'-OH, 7-glucose | Soja |
| | | daidzein | 7,4'-OH | Soja |
| | | apigenidin | 5,7,4'-OH | Fruit coloré |
| | | cyanidin | 3,5,7,4'-OH,3,5-OMe | Cerise, framboise, fraise |

Les flavonoïdes se rencontrent dans la nature, soit sous forme libre aglycone (génine) ou de glycoside. Ils peuvent se lier à un sucre au niveau du carbone C₃ ou C₇ pour former des dérivés hétérosides (De Groot & Rauen, 1998). Le sucre peut être un glucose, un rhamnose, un glucorhamnose, un galactose ou même, un arabinose (Spanos & Wrolstad, 1992).

4.2. Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont des constituants caractéristiques des plantes vertes. Ils se répartissent dans toutes les parties de la plante comme les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce. Ils prédominent surtout au niveau des organes aériens jeunes comme les jeunes feuilles et les boutons floraux (Benavente-Garcia et al., 1997).

Les flavonoïdes sont largement distribués chez les bryophytes, les ptéridophytes, les chlorophytes et les angiospermes (Markham, 1982). Les formes hétérosidiques des flavonoïdes hydrosolubles s'accumulent dans les vacuoles et, selon l'espèce, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se répartissent entre l'épiderme et le mésophile. Dans le cas des fleurs, ils sont concentrés dans les cellules épidermiques (Bruneton, 2009). Par conséquent, les légumes et les fruits consommés quotidiennement sont très riches en flavonoïdes. De même, ils se trouvent en quantité importante dans nombreuses plantes médicinales et aromatiques (Remesy et al., 1996).

4.3. Biodisponibilité et métabolisme des flavonoïdes

Les effets biologiques bénéfiques des flavonoïdes sur la santé des êtres vivants ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Une meilleure connaissance de cette dernière est indispensable pour expliquer leurs effets protecteurs contre plusieurs maladies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, cancers... (Stoclet & Schini-Kerth, 2011). En effet, les études de Vanessa et al. (2003) ont montré que la biodisponibilité des flavonoïdes dépend de la capacité de transport à travers les entérocytes, de l'intensité de la sécrétion intestinale des flavonoïdes conjugués vers la lumière intestinale et vers le sang et enfin de la sécrétion biliaire.

La plupart des flavonoïdes entrent dans l'alimentation sous forme de glycosides, dont les plus consommés sont la rutine et la quercitrine (Bokkenheuser & Winter, 1988). Brown (1980) a montré que les glycosides de la quercétine ne s'absorbent pas au niveau de

l'intestin grêle, à cause de leur nature hydrophile et leur poids moléculaire relativement élevé. Cependant, Hollman et ses collaborateurs (1995; 1996) ont montré, une absorption rapide des glycosides de la quercétine en comparaison avec des flavonoïdes aglycones chez l'homme. Selon ces auteurs, c'est la partie glycosidique qui a facilité le passage du flavonoïde à travers la paroi intestinale via la voie d'absorption des sucres. Day & Williamson (1999), ont rapporté que la rapidité dans l'absorption des glycosides dépend de la nature chimique de leurs sucres. Ils ont mentionné que les glycosides de l'oignon (La quercétine 4'-glucoside et la quercétine 3, 4'-diglucoside) sont mieux absorbés que les glycosides des pommes, du thé et même des suppléments de la rutine. Ils ont montré également, qu'après l'absorption de ces glycosides et leur passage dans les entérocytes, ils subissent une déglycosylation via la β -glucosidase cytosolique, ainsi que via la lactase phlorizine hydrolase. Ensuite, ils se convertissent en glucuronides ou en sulfates. Ce phénomène a été démontré pour la phloridzine (Mizuma & Awazu, 1998), la luteolin 7-O-glucoside (Shimoi et al., 2000), la quercétine glycoside (Crespy et al., 1999) et le kaempférol 3-O-glucoside (Spencer et al., 1999).

De même, il a été prouvé l'existence de la quercétine 3-O-rhamnoglucoside dans le plasma des volontaires, après consommation de la tomate (Mauri et al., 1999). Aussi, Wakui et ses collaborateurs (1992), ont noté la présence de la baicaléine et la baicaline, le glycoside de baicaléine, dans le plasma des rats. En outre, une étude sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme, en utilisant de la diosmine, le 7-rhamnoglucoside de la diosmétine, a permis la détection de la diosmétine seul dans le plasma avec une absence totale dans les urines (Cova et al., 1992).

Le reste des flavonoïdes qui ne sont pas absorbés au niveau de l'intestin grêle, passent dans le colon où ils subissent une déglycosylation via la β -glucosidase sécrétée par la flore intestinale (Formica & Regelson, 1995). De même, cette flore bactérienne peut couper le cycle pyrone, cycle C, en produisant de l'acide phénylacétique et de l'acide phénylpropionique, ainsi que d'autres dérivés (Brown, 1980). Les métabolites obtenus peuvent avoir plusieurs destinés. Ils peuvent retourner vers la lumière intestinale, comme ils peuvent passer dans le foie pour subir d'autres modifications. Enfin, ils se secrètent dans la vésicule biliaire ou dans le sang pour être éliminer dans les urines (Day & Williamson, 1999).

4.4. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes qui sont des métabolites synthétisés en grande quantité par les plantes représentent un système de défense contre les microorganismes pathogènes (Bruneton, 2009). De même, les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV en absorbant à la fois ces radiations et en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène formées (Shirley, 1996).

Chez l'homme, les flavonoïdes possèdent de remarquables activités biologiques et pharmacologiques qui sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4: Activités biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes chez l'homme.

| Activité biologiques des flavonoïdes | | Références |
|---|------------------------------|---|
| Activité antioxydante | | Rice-Evans et al., 1995; Heim et al., 2002. |
| Activité anticancérogène | | Virgili & Marino, 2008; Galluzzo et al., 2009; Bulzomi et al., 2010, 2012; Marino et al., 2011. |
| Activité anti-ulcéreuse | | La Casa et al., 2000; Sannomiya et al., 2005; De Barros et al., 2008; Gurbuz et al., 2009. |
| Activité anti-inflammatoire | | Selloum et al., 2003; Nowakowska, 2007; Sutradhar et al., 2008; Rao et al., 2009; Vafeiadou et al., 2009. |
| Activité analgésique | | Küpel & Yesilada, 2007; Sutradhar et al., 2008. |
| Activité antiparasitaire | <i>Leishmania</i> | Nowakowska, 2007; Ganapaty et al., 2008. |
| | <i>Trypanosoma</i> | Prytyk et al., 2005; Güida et al., 2007; Ganapaty et al., 2008. |
| | <i>Plasmodium falciparum</i> | Froelich et al., 2005; Nowakowska, 2007 ; Portet et al., 2007. |
| Activité antivirale | | Choi et al., 2009. |
| Activité antibactérienne | | Sohn et al., 2004. |
| Ostéogène | | Trivedi et al., 2008; Maurya et al., 2009. |
| Vasodilatateur | | Padilla et al., 2005. |
| Anti-atherogénique, Antithrombotique, Anti-allergénique | | Wollgast & Anklam, 2000. |

Parmi les activités les plus étudiées des flavonoïdes leurs activités antioxydante et anticancéreuse.

4.4.1. Activité antioxydante des flavonoïdes

Les propriétés anti-oxydantes des flavonoïdes sont en partie responsables de leurs nombreuses activités biologiques, y compris leur activité antitumorale. Ces composés naturels ont la capacité de réagir avec la majorité des espèces réactives de l'oxygène (Fuhrman et al., 1995). Cependant, leur action anti-oxydante ne s'exerce pas seulement par le piégeage et la désactivation des radicaux libres, mais aussi par l'inhibition des enzymes oxydantes et la chélation des ions métalliques responsables de la production des ROS (Halliwell, 1994). Les flavonoïdes possèdent un faible potentiel redox, ils sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoïde phenoxy (FI-O^\bullet) qui en résulte peut réagir avec un autre radical libre pour former une structure quinone stable (Procházková et al., 2011) (**Figure 10**).

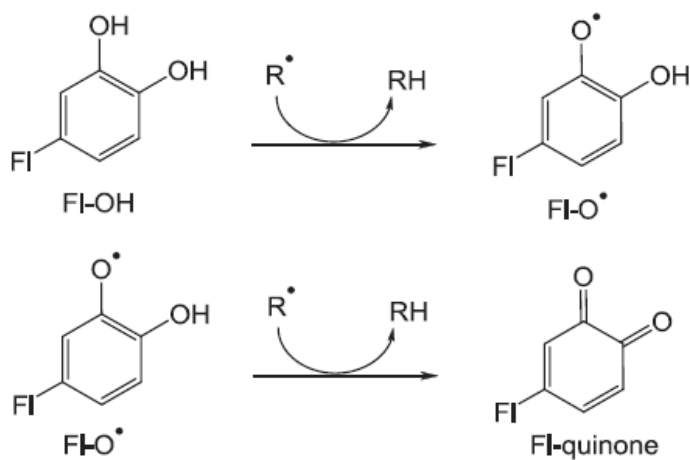


Figure 10: Effet scavenger des ROS (R^\bullet) par les flavonoïdes (FI-OH) pour former un radical flavonoïde phenoxy (FI-O^\bullet), qui à son tour réagit avec un autre ROS pour donner une structure quinone stable (Pietta, 2000).

De nombreuses autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres d'une manière directe en inhibant la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde, ou indirecte en inhibant la NADPH-oxydase via la PKC (Hanasaki et al., 1994; Ursini et al., 1994).

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques (Brown et al., 1998; Dacosta, 2003), à savoir les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^{2+}) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Cependant, leur excès est responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène (Procházková et al., 2011) (**Figure 11**).

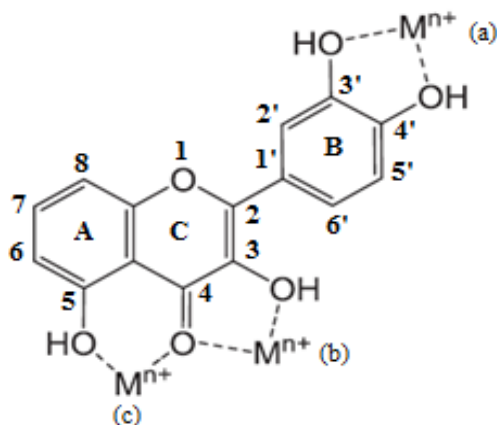


Figure 11: Les sites du flavonoïde proposés pour la chélation des ions métalliques (M^{n+}): (a) un noyau catéchol sur le cycle B, (b) les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (c) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C (adapté de Pietta, 2000).

L'activité antioxydante des flavonoïdes est liée principalement à leurs structures chimiques. Ainsi, plusieurs travaux décrivent les relations structures-activités des flavonoïdes (Rice-Evans et al., 1996; Van Acker et al., 1995; Harborne & Williams, 2000). En fait, leur activité antiradicalaire nécessite d'une part la présence de la double liaison entre les carbones C2 et C3, le groupement hydroxyle en C3 et un groupement carbonyle en C4. D'autre part, la présence de la structure ortho-diphénolique du cycle B (les groupements hydroxyles en position C3'-C4'). En plus, l'existence d'un nombre important de résidus hydroxyles augmente le potentiel antioxydant des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé (Fuhrman et al., 1995; Woodman et al., 2005).

4.4.2. Activité anticancéreuse des flavonoïdes

Plusieurs études *in vitro* ont montré l'effet antiprolifératif et cytotoxique des flavonoïdes vis-à-vis de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses ainsi qu'*in vivo* (**Tableau 5**). En plus, l'effet anticancéreux des flavonoïdes observé *in vitro* a été confirmé par plusieurs études épidémiologiques. Ainsi, il a été démontré que la consommation des

flavonoïdes diminue le risque et l'incidence de plusieurs types de cancers à savoir le cancer du sein (Bosetti et al., 2005; Fink et al., 2007), le cancer du poumon (Le Marchand et al., 2000), le cancer de la prostate (Knekt et al., 2002), le cancer de l'estomac (Garcia-Closas et al., 1999) et le cancer du rectum (Arts et al., 2001). Ces études ont montré que les composés polyphénoliques peuvent inhiber les différents stades du cancer (initiation, promotion et progression) en déclenchant la cascade proapoptotique par augmentation de l'expression de certains composants apoptotiques.

Tableau 5: Propriétés anticancéreuses, *in vitro* et *in vivo* de quelques flavonoïdes.

| Flavonoïdes | Cibles | Actions | Références |
|--|--|---|-----------------------|
| Quercétine, kaempférol, apigénine, lutéoline. | Cellule Jurkat T, MDA-MB-231. | - Mort par apoptose des Cellule Jurkat T. - Inhibition de la croissance des cellules MDA-MB-231 xénogreffées dans des souris et inhibition de la croissance des tumeurs. | Chen & Dou, 2008. |
| Quercétine | Cellules cancéreuses SK-Br3, MDA-MB-453, HeLa. | - Activité antiproliférative et arrêt de cycle cellulaire en phase G1. | Jeong et al., 2009. |
| Quercétine, fisétine, myricétine, lutéoline naringine. | - Cellules cancéreuses HEP2 et CK2. | - Effet cytotoxique. | Durgo et al., 2007 |
| Rutine | - Cellules leucémiques murines WEHI-3. | - Inhibition de la croissance des cellules WEHI-3 à des souris BALB C. | Lin et al., 2009. |
| Kaempférol, Kaempférol-3-O-D-glucoside, naringénine. | - Cellules cancéreuses MCF-7 | - Activité antiproliférative. | Susanti et al., 2007. |

5. *Cléome arabica* L.

Le nom *Cléome* vient du grec 'kleio' qui signifie entourer. Le genre *Cléome* contient 250 espèces dont 7 seulement sont utilisées en médecine traditionnelle (Wollenweber & Dorr, 1992). Dans ce travail l'espèce *Cléome arabica* est étudiée.

C'est une espèce septentrionale poussant au Maghreb et dans les régions sahariennes, commune dans la Hodna (M'sila) et dans quelques régions du Sahara algérien: *Cléome arabica ozenda* (Ozenda, 1991; Beniston, 1984). Elle est dénommée localement « Netten » et « Netteina » (Baba Aissa, 2000).

5.1. Classification botanique

La classification botanique de *Cléome arabica L.* est présentée dans le tableau 6.

Tableau 6: Classification botanique de *Cléome arabica L.* (Guy, 1979).

| | |
|---------------------------|----------------------------|
| Règne | Plantes |
| Sous règne | Plantes vasculaires |
| Embranchement | Spermaphytes |
| Sous embranchement | Angiospermes |
| Classe | Dicotylédones |
| Sous classe | Dialypétales |
| Ordre | Pariétales |
| Famille | Capparidacées |
| Genre | <i>Cléome</i> |
| Espèce | <i>Cléome arabica</i> |

5.2. Description botanique

Cléome arabica est une plante herbacée, annuelle, glanduleuse, visqueuse, fétide, d'aspect général vert grisâtre. Ces feuilles sont à 3 folioles ovales et alternes portant à leur aisselle des fleurs jaunes bordées de brin pourpré. Ces périanthes possèdent quatre pétales, quatre sépales verts et six étamines. Elle possède aussi des fruits en forme de capsules oblongues, de 1 à 2 cm de long environ, dont la particularité est d'apparaître avant que les pétales ne flétrissent et qui ressemble à des haricots et ils portent des graines à poils très courts (Baba Aissa, 2000) (**Figure 12**).

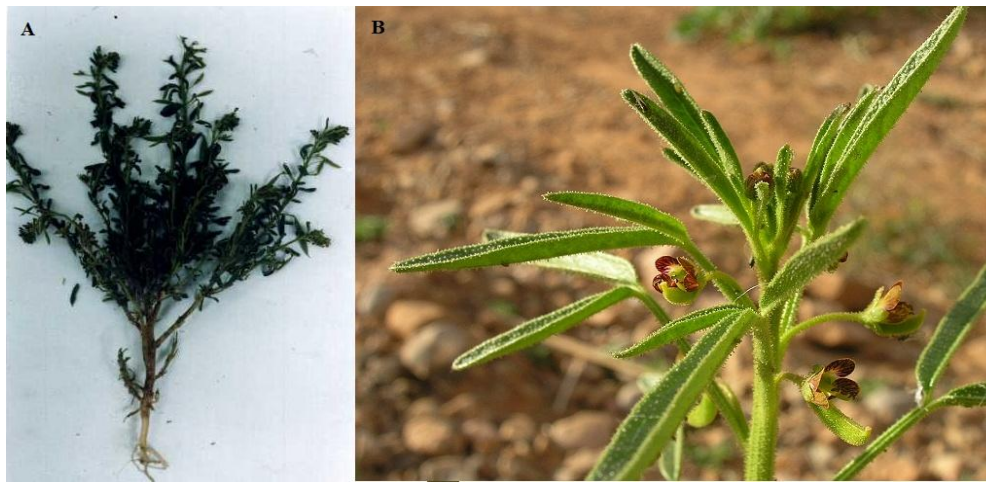


Figure 12: Photographie de *Cléome arabica*. (A) Plante collectée d'Oued Maiter, Boussaâda après séchage à l'ombre. (B) La formes des feuilles et des fleurs à l'état frais. (<http://www.iffrittran.net/monde/spip.php?article816>).

5.3. Composition chimique

La famille des capparidacées est riche en flavonoïdes. Ces derniers sont présents dans plusieurs plantes du genre *Cléome* y compris *Cléome arabica* (Touil et al., 1998; Bouriche et al., 2003), *Cléome spinosa*, *Cléome ampicarpa*, *Cléome brachycarpa*, *Cléome chrysantha* et *Cléome droserifolia* (Wollenweber & Dorr, 1992).

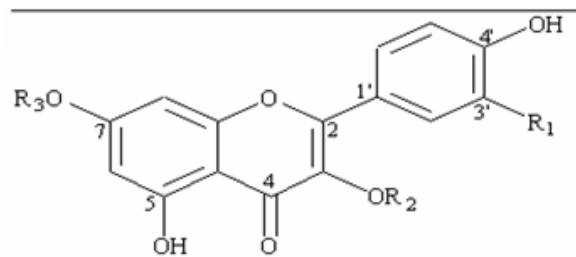
Selon Ismail et ses collaborateurs (2005), l'extrait des feuilles et des tiges de *Cléome arabica* est très riche en flavonoïdes glucosylés et rhamnosylés (**Tableau 7**). En plus, Djeridane et al., (2010) ont isolé un stéroïde à partir des parties aériennes de la plante (**Figure 13**) doté d'activité antioxydante très remarquable.

5.4. Utilisation de *Cléome arabica* en médecine traditionnelle

Cléome arabica est utilisée en médecine traditionnelle par les populations locales et les nomades du Sahara comme analgésique des douleurs névralgiques et rhumatismales et comme diurétique (Sharaf et al., 1992).

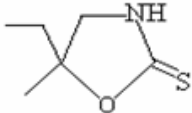
Dans le Hoggar les feuilles séchées de *Cléome arabica* ou leur poudre sont ajoutés à l'alimentation comme un diurétique, pour le traitement des rhumatismes, ou pour provoquer la transpiration (Burkill, 1985). Les habitants de la région de Boussaâda, utilisent les feuilles de *Cléome arabica* dans des cataplasmes à application externe, sur la peau, pour traiter certaines formes rhumatismales. (Djeridane et al., 2010). Il s'agit de:

Tableau 7: Les constituants des feuilles et des tiges de *Cléome arabica* (Ismail et al., 2005).



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|----------|------------------|----------------|----------------|
| 1 | OH | Glucosyl | Rhamnosyl |
| 2 | H | Glucosyl | Rhamnosyl |
| 3 | OCH ₃ | Glucosyl | Rhamnosyl |
| 4 | OH | Rhamnosyl | Rhamnosyl |
| 5 | H | Rhamnosyl | Rhamnosyl |
| 6 | OCH ₃ | Rhamnosyl | Rhamnosyl |
| 7 | OH | Glucosyl | H |
| 8 | H | Glucosyl | H |
| 9 | OCH ₃ | Glucosyl | H |

10



Cléomine

1-3: 3-O-glycosyl-7-O-rhamnopyranosides de quercétine
 4-6: 3,7-O-di-rhamnopyranosides de kaempferol
 7-9: 3-O-glycopyranoside de isorhamnetine

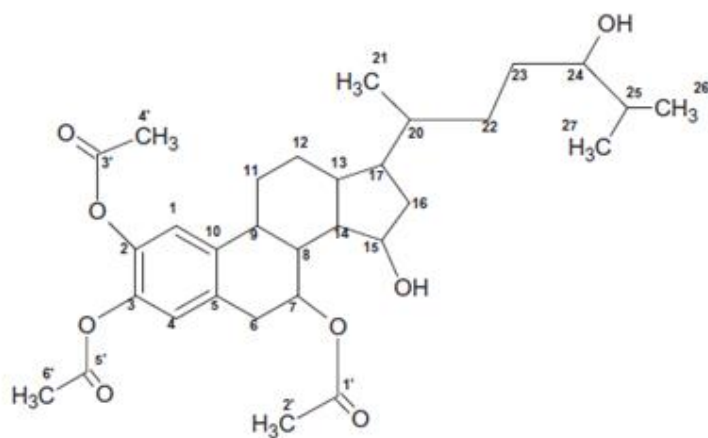


Figure 13: Un stéroïde isolé à partir des parties aériennes de la plante *Cléome arabica*

- Faire chauffer les feuilles hachées de la plante au bain-marie puis les presser pour éliminer l'excès du liquide.
- Recouvrir la partie douloureuse, préalablement lubrifiée par l'huile d'olive, avec la plante encore chaude.
- Laisser agir pendant 2 à 3 heures, le cataplasme est renouvelé plusieurs fois.

En Mauritanie, les femmes ajoutent la poudre de la plante entière au lait et aux boissons, pour obtenir un aliment d'engraissement. De même, elles mélangent les feuilles grillées avec la nourriture pour traiter les affections rénales et dorsales et pour donner la virilité aux hommes (Burkill, 1985).

5.5. Activités biologiques

Les activités biologiques de *Cléome arabica* sont peu étudiées. Selon Bouriche et ses collaborateurs (2003, 2004), un précipité jaune obtenu à partir des feuilles de cette plante, en utilisant le système d'extraction méthanol/eau suivie d'acétate d'éthyle, a exercé un effet anti-inflammatoire remarquable *in vivo*, en réduisant l'œdème des pattes des rats, et *in vitro* en modulant l'activité de la lipo-oxygénase et la génération du leukotriène B4 et la prostgandine E2 par les polymorphonucléaires neutrophiles stimulés par le calcium ionophore. Ainsi que, en inhibant leur chimiotactisme. De même, Selloum et ses collaborateurs (2004) ont montré que ce précipité inhibe la flambé respiratoire des neutrophiles stimulés détectée par chemiluminescence. Djeridane et ses collaborateurs (2010), ont indiqué que l'extrait hydrométhanolique de *Cléome arabica* est doté d'activité antioxydante remarquable, un stéroïde isolé à partir des parties aériennes de cette plante semble en être le responsable.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

1.1.1. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris de l'espèce Balb C obtenues de l'Institut Pasteur d'Alger, pesant entre 20 et 40 g. Ces souris sont logées dans des cages en polypropylène à une température de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture (Office National des Aliments de Bétails, El-Kssar). Après une semaine d'adaptation les souris sont pesées, marquées et réparties en groupes.

1.1.2. Matériel végétal

La plante *Cléome arabica*, identifiée par le Pr Kaâbache M. (laboratoire de botanique, université de Sétif), a été collectée de la région de Boussaâda (Oued Maïter) au Sud-Est de l'Algérie, au mois de Mars 2007. Les feuilles de la plante ont été séchées à l'ombre à température ambiante. Après leur séchage, elles ont été broyées et stockées dans des flacons opaques à l'abri de la lumière.

1.1.3. Réactifs et solutions de travail

Carboxymethyl cellulose (CMC) et cytarabine (AraC) sont obtenus de Sigma (Germany) et Pfizer respectivement. Les antibiotiques (gentamicine et penicilline), les milieux de cultures DMEM et RPMI-1640 avec rouge de phénol, sérum de veau foetal (SVF) sont obtenus de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Le réactif de Bradford est obtenu des laboratoires BIO-RAD (Hercules, California, USA). Les anticorps: anticaspase-3, antipoly (ADP-ribose) polymerase (PARP), anti-Bcl-2, anti-phospho-ERK, anti-ERK2 et anti-AKT1 sont obtenus de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA). L'anticorps anti- β -tubuline est obtenu de MP Biomedicals (Solon, Ohio, USA). Les anticorps polyclonaux anti-phospho-AKT sont obtenus de New England Biolabs (Beverly, Massachusetts, USA). La solution d'arrachage d'anticorps «Restore Western Blot Stripping Buffer» est obtenue de Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois, USA). Le réactif de chemiluminescence pour western blot est obtenu d'Amersham Biosciences, (Little Chalfont, UK). Tous les autres produits sont de Sigma-Aldrich et sont de grade analytique.

Les solutions de travail: tampon phosphate salin (PBS), bleu de trypan, la solution de solubilisation et de lyse « sample buffer: SB », la solution du bleu de bromophénol/ β -mercapto-éthanol/glycérol (BMG), la solution de migration « running buffer », le tampon de transfert « transfert buffer », la solution du rouge ponceau, la solution TTBS (Tween-Tris-Buffered Saline) et la solution du BSA (Bovine Serum Albumin) 3 % sont préparées selon les protocoles cités dans l'annexe.

1.2. Méthodes

1.2.1. Extraction et dosage des flavonoïdes et des polyphénols des feuilles de *Cléome arabica*

1.2.1.1. Extraction des flavonoïdes et des polyphénols

La préparation de l'extrait polyphénolique des feuilles de *Cléome arabica* est réalisée selon la méthode de Markham (1982), **Figure 14**. Une solution de méthanol/eau (7/3 : V/V, 300 ml) est ajoutée à 100 g de la poudre des feuilles de *Cléome arabica*. Après 20 minutes d'agitation à 40°C, une filtration est faite. Cette étape est répétée 3 fois en gardant le dernier filtrat pendant 24 heures à l'obscurité pour extraire le maximum de polyphénols. Après récupération des 3 filtrats, une concentration sous vide est réalisée par un rotavapeur (Rotavapor, Buchi) à 40°C. Ensuite, 100 ml d'eau bouillante sont ajoutés et le mélange est gardé à 4°C pendant 24 heures. Puis, 150 ml d'acétate d'éthyle sont additionnés en agitant le mélange énergiquement ce qui provoque après quelques minutes la formation d'un précipité jaune au fond de l'ampoule à décantation. Après répétition de cette étape 3 fois, les précipités récupérés sont lavés par l'eau distillée plusieurs fois, puis, congelés et lyophilisés à l'aide d'un lyophilisateur (Phywe Chvisa) pendant 24 heures. La poudre obtenue est stockée dans un flacon en verre opaque à l'abri de la chaleur et de la lumière.

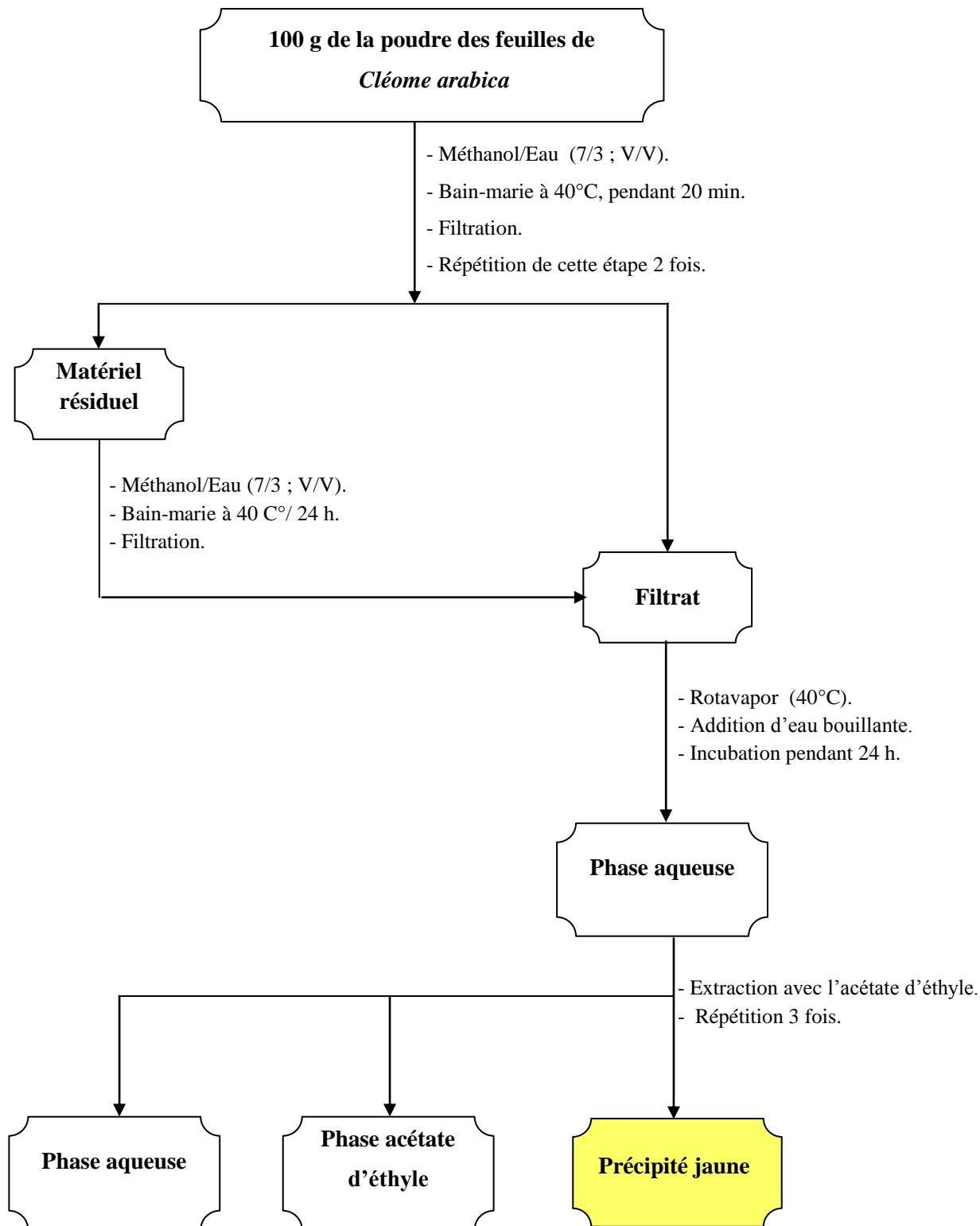


Figure 14: Principales étapes de l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes des feuilles de *Cléome arabica* (Markham, 1982).

1.2.1.2. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation des polyphénols totaux contenus dans l'extrait des feuilles de *Cléome arabica* (EFCA) est déterminée par une méthode colorimétrique (Bahorun et al., 1996). Brièvement, 0,25 ml de l'échantillon (50 et 100 µg/ml concentrations finales) sont ajoutés à 3,5 ml d'eau distillée et 0,25 ml du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 3 minutes, 1 ml de Na₂CO₃ 20 % est ajouté. Les tubes sont chauffés à 100°C dans un bain-marie pendant une minute, puis refroidis à l'obscurité. L'absorbance est lue à 685 nm contre le blanc.

La quantité des polyphénols totaux est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique. Les résultats sont exprimés en g équivalent d'acide gallique par 100 g de matière sèche.

1.2.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux

L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux contenus dans l'EFCA est réalisée en suivant une méthode colorimétrique (Bahorun *et al.*, 1996). Un volume de 1 ml de la solution méthanolique de l'échantillon est ajouté à 1 ml d'une solution de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) 2 %, préparée dans du méthanol. Après 10 minutes, l'absorbance est lue à 430 nm contre le blanc.

La quantité des flavonoïdes contenue dans l'extrait est calculée à l'aide d'une gamme d'étalonnage en utilisant la quercétine comme standard. Les résultats sont exprimés en g équivalent de la quercétine par 100 g de matière sèche.

1.2.2. Etude de l'activité anti-oxydante de l'extrait des feuilles de *Cléome arabica*

Afin d'évaluer la capacité antioxydante de l'extrait *in vitro*, trois méthodes sont utilisées:

- Test du radical libre DPPH•.
- Chélation du fer ferreux.
- Pouvoir antioxydant réducteur du fer: FRAP (Ferric Reducing Anti-oxidant Power).

1.2.2.1. Test du DPPH•

L'évaluation de l'effet scavenger de l'extrait envers le radical DPPH• est réalisée selon la méthode de Blois (1958), avec une légère modification, en comparaison avec la quercétine, la rutine, le trolox, et le BHT. Pratiquement, un volume de 1 ml de la solution méthanolique du DPPH• (0,004 %) est ajouté à 1 ml de l'extrait (1-20 µg/ml, concentrations finales). Le mélange est mixé rigoureusement, puis, incubé à l'obscurité

pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc sans DPPH•. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation suivante:

$$\% \text{ d'activité anti-radicalaire} = [(A_{517}^{\text{contrôle}} - A_{517}^{\text{échantillon}}) / A_{517}^{\text{contrôle}}] \times 100$$

1.2.2.2. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice de l'extrait est estimée selon la méthode de Dinis et al. (1994) en comparaison avec l'EDTA. Différentes concentrations de l'extrait (100–1000 µg/ml concentrations finales) sont ajoutées à une solution de 0.6 mM FeCl₂ (0,1 ml). Après 5 minutes, une solution de 5 mM de la ferrozine (0,1 ml) est ajoutée et le volume total est ajusté à 1,6 ml avec du méthanol. Le mélange obtenu est bien agité et laissé réagir pendant 10 minutes à température ambiante. La complexation de la ferrozine avec le fer résiduel conduit à la formation d'un chromophore rouge (Fe⁺²-ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Le pourcentage d'inhibition de la formation du complexe ferrozine-Fe²⁺ est calculé en utilisant la formule suivante:

$$\text{Chélation (\%)} = [(A_{562}^{\text{contrôle}} - A_{562}^{\text{échantillon}}) / A_{562}^{\text{contrôle}}] \times 100$$

Sachant que l'absorbance est mesuré contre un blanc qui contient tous les réactifs sauf la ferrozine.

1.2.2.3. Pouvoir anti-oxydant réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir antioxydant par réduction du fer, communément connu par FRAP pour Ferric Reducing Antioxidant Power de notre extrait est déterminé selon la méthode d'Oyaizu (1986) en comparaison avec le BHT. Cette méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe⁺³ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe⁺². La réaction est révélée par le changement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe⁺³) vers la couleur bleu vert du fer ferreux (Fe⁺²). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm. Pratiquement, des différentes concentrations de l'extrait (2 à 12 µg/ml) diluées dans 1ml d'eau distillée sont mélangées avec 2,5 ml du tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferrocyanure de potassium [K₃Fe(CN)₆] à 1 %. Ensuite, le mélange est incubé à 50°C pendant 20 minutes. Puis, 2,5 ml d'acide trichloroacétique (10 %) sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes.

Après, 2,5 ml de la phase supérieure sont aspirés et mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml du FeCl_3 (0,1 %) et l'absorbance est mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel est un indicateur de l'augmentation du pouvoir réducteur.

1.2.3. Effet anticancéreux de l'extrait des feuilles de *Cléome arabica*

1.2.3.1. Conditions de la culture cellulaire

Afin d'évaluer l'activité anticancéreuse de l'extrait, 5 lignées de cellules tumorales sont utilisées :

- HeLa, lignée cellulaire du carcinome épithéloïde du col de l'utérus humain (human cervix epitheloid carcinoma cell line).
- HepG2, lignée cellulaire du cancer hépatique (human hepatoma cell line).
- MCF-7, lignée cellulaire du cancer du sein (human breast cancer cells).
- DLD-1, lignée cellulaire d'adénocarcinome du colon (human colon adenocarcinoma cells).
- SK-N-BE, lignée cellulaire du cancer du cerveau (human neuroblastoma cells).

Ces cellules se développent régulièrement dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO_2 à 37°C et dans un milieu de culture modifié DMEM, pour HeLa et MCF-7, ou RPMI-1640, pour HepG2, DLD1 et SK-N-BE. Le milieu de culture utilisé pour le développement de HeLa, HepG2, DLD1 et SK-N-BE doit contenir 10 % du SVF inactivé pendant 1 heure dans un bain-marie à 56°C. Cependant, pour MCF-7 le SVF utilisé reste active. Tous les milieux contiennent également du L-glutamine (2 mM), de la gentamicine (10 mg/ml) et de la pénicilline (100 U/ml) comme le montre le tableau 8.

Tableau 8: Origine et conditions de culture des lignées cellulaires cancéreuses utilisées.

| Lignée cellulaire Cancéreuse | Origine | Milieu de culture | Additives |
|---|--|------------------------------|---|
| HeLa : Carcinome épithéloïde du col utérin. | Dérivée d'un carcinome du col utérin d'une négresse de 31 ans. | DMEM | - SVF inactivé 10 % (v/v). - L-glutamine (2 mM). - Gentamicine (10 mg/ml). - Pénicilline (100 U/ml). |
| HepG2: Lignée cellulaire d'hépatome humain. | HepG2 a été isolée à partir d'une biopsie du foie d'un garçon de race blanche âgé de 15 ans | RPMI-1640 | - SVF inactivé 10 % (v/v). - L-glutamine (2 mM). - Gentamicine (10 mg/ml). - Pénicilline (100 U/ml). |
| MCF-7 : Cellules humaines du cancer du sein. | Obtenue à partir de l'épanchement pleural d'une femme de race blanche âgée de 69 souffrant d'un adénocarcinome du sein. | DMEM | - SVF activé 10 % (v/v). - L-glutamine (2 mM). - Gentamicine (10 mg/ml). - Pénicilline (100 U/ml). |
| DLD-1: Cellules humaines d'un adénocarcinome du côlon. | Dérivée de l'adénocarcinome colorectal humain. | RPMI-1640 | - SVF inactivé 10 % (v/v). - L-glutamine (2 mM). - Gentamicine (10 mg/ml). - Pénicilline (100 U/ml). |
| SK-N-BE: Cellules de neuroblastome humain. | Établie à partir d'une biopsie de moelle osseuse d'un bébé de sexe masculin âgé de 22 mois. | RPMI-1640 | - SVF inactivé 10 % (v/v). - L-glutamine (2 mM). - Gentamicine (10 mg/ml). - Pénicilline (100 U/ml). |

1.2.3.2. Congélation/Décongélation des lignées tumorales

Les cellules cancéreuses sont conservées dans un milieu de conservation dans une ampoule qui contient 1 ml de la suspension cellulaire. Le milieu de conservation est composé de 40 % (V/V) de milieu de culture complet, 50 % (V/V) de SVF et 10 % de DMSO (V/V), utilisé pour son effet cryoprotecteur. Ensuite, l'ampoule est conservée à - 80°C pendant 48 heures, puis dans l'azote liquide à - 196°C.

La décongélation des cellules cancéreuses commence par l'incubation de l'ampoule dans un bain-marie à 37°C pour une décongélation rapide car la décongélation lente provoquera un contacte lent avec le DMSO qui est cytotoxique à température ambiante. Ensuite, le contenu de l'ampoule est transféré vers un tube de 15 ml contenant 7 ml de milieu de culture complet froid et est homogénéisé délicatement. Puis, une centrifugation est pratiquée pendant 5 minutes à 1000 rpm et les cellules sont resuspendues dans 5 ml du milieu de culture complet. Un léger tapotage du fond du tube est effectué pour remettre en suspension le culot. Les cellules sont transférées vers des flacons de culture, sauf pour les cellules MCF7 qui sont cultivées dans des boites de pétri, et incubées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂.

1.2.3.3. Passage des lignés tumorales

Après 24 heures de culture des cellules, un contrôle quotidien de leur état est nécessaire afin de s'assurer que la culture n'a pas été contaminée durant le processus de congélation/décongélation, ainsi que pour vérifier leur confluence et leur viabilité. Si leur confluence est adéquate un passage des cellules est réalisé avec une fréquence de 48 heures pour HeLa, DLD-1 et SK-N-BE et de 72 heures pour HepG2 et MCF-7.

Le passage des cellules doit se faire sous la hôte et il consiste à l'aspiration de l'ancien milieu de culture et lavage des cellules par du PBS. Puis, 0,5 ml de la trypsine-EDTA sont additionnés et les cellules sont incubées pendant 2 à 3 minutes à 37°C. Après détachement des cellules de la surface de la boite de culture, un volume de 2,5 ml du milieu de culture est ajouté et une homogénéisation est pratiquée pour bien séparer les cellules encore en agrégats. Après comptage et dilution convenable, les cellules sont transférées dans un nouveau flacon. Une homogénéisation est pratiquée pour répartir uniformément les cellules. Le reste des cellules est centrifugé, le milieu est éliminé, puis 1 ml du milieu de congélation est ajouté. Ensuite, les ampoules sont congelées

rapidement à - 80°C pendant 48 heures puis dans l'azote liquide à - 196°C. Les cellules cancéreuses doivent subir 2 passages avant d'être utilisées dans les expérimentations.

1.2.3.4. Comptage des cellules

La détermination du nombre cellulaire est une étape nécessaire qui précède chaque expérience. La méthode du bleu de trypan a été utilisée pour faire le dénombrement des cellules cancéreuses. Cette méthode permet de distinguer entre les cellules vivantes qui apparaissent claires entourées d'un halo bleu, et les cellules mortes qui apparaissent totalement bleues. Pratiquement, un volume de 10 µl de la suspension cellulaire est mélangé avec 10 µl de la solution du bleu de trypan 0,4 %. La solution obtenue est incubée pendant 5 minutes à température ambiante. Puis, les 2 chambres de l'hémocytomètre sont remplies et les cellules sont comptées à l'aide d'un microscope à phase inverse sous un objectif X10. Le nombre de cellules est déterminé selon la formule suivante:

$$\text{Concentration cellulaire par ml} = \text{nombre de cellules par carré} \times \text{facteur de dilution} \times 10^4$$

1.2.3.5. Evaluation de la cytotoxicité

Après passage et dénombrement des différentes lignées cellulaires utilisées dans cette étude, un nombre de 75×10^4 cellules/ml/puits estensemencé dans des microplaques de 24 puits. Une incubation pendant 4 heures à 37°C est faite afin que les cellules adhèrent à la surface des puits. Ensuite, les cellules sont traitées par le véhicule (DMSO 2 %, v/v considéré comme contrôle), l'EGF (20×10^3 µg/ml, concentration finale) ou les différentes concentrations de l'EFCA (1, 5, 10, 25, 50, 100 et 200 µg/ml, concentrations finales). Trois réplicas ont été réalisés pour chaque concentration avec une répétition de la même expérience 3 fois. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le milieu de culture est éliminé et un lavage avec du PBS est pratiqué 3 fois/puits et un volume de 250 µl de trypsine est ajouté. Une fois les cellules sont détachées du fond du puits, un volume de 750 µl/puits du milieu de culture est ajouté et le nombre de cellules dans chaque puits est déterminé en utilisant la méthode du bleu de trypan.

Le pourcentage des cellules/puits est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{moyenne du nombre des cellules avec extrait}}{\text{moyenne du nombre des cellules contrôles}} \times 100$$

1.2.3.6. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) a été utilisée afin de démontrer l'effet de l'extrait sur le cycle cellulaire des différentes lignées cancéreuses étudiées en utilisant comme marqueur le 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorate (DAPI). Le DAPI est une molécule fluorescente de couleur bleu capable de se lier fortement aux régions AT de l'ADN. Quand le DAPI absorbe la lumière UV, il émet une fluorescence bleue brillante, ce qui permet de détecter et quantifier l'ADN.

Pratiquement, les cellules cancéreuses sontensemencées à une concentration de 10^6 cellules/flacon et traitées par le véhicule considéré comme contrôle ou par l'extrait (100 et 200 $\mu\text{g/ml}$, concentration finale). Trois réplicas ont été réalisés pour chaque concentration avec une répétition de la même expérience 3 fois. Après 24 heures, le milieu de culture dans chaque flacon est aspiré et centrifugé à 1500 rpm pendant 5 minutes afin de récupérer les cellules flottantes. Puis, les cellules attachées sont récupérées par trypsination. Ensuite, les cellules flottantes et les cellules attachées sont mélangées, lavées par du PBS et fixées par l'ajout de 1 ml d'éthanol 70 % glacé, puis, congelées à -20°C pendant au minimum 24 heures. Après, les cellules sont décongelées, centrifugées pour éliminer l'éthanol et lavées deux fois par 5 ml de PBS. Puis, 1 ml de la solution DAPI/PBS (2 mg/ml) est ajouté et une incubation à température ambiante est effectuée pendant 15 minutes. Enfin, la fluorescence de l'ADN est mesurée avec un cytomètre en flux DAKO Galaxy équipé d'une lampe de mercure HBO et le pourcentage des cellules en phase "sous-G1" est calculé en utilisant le logiciel FloMax ©.

1.2.3.7. Evaluation de l'effet préventif de l'extrait contre la croissance des cellules cancéreuses par la méthode de la réduction du sérum

A l'état normal, les cellules cancéreuses en culture nécessitent 10 % (v/v) du SVF qui les maintient dans un milieu favorable à leur multiplication. La diminution de cette concentration à 2 % (v/v) va créer un état de stress métabolique, ce qui perturbe leur croissance. L'augmentation à nouveau de la concentration du SVF à 10 % (v/v) va stimuler la multiplication des cellules d'une façon anormale. L'objectif de ce protocole est de vérifier si l'extrait exerce un effet préventif contre la croissance des cellules cancéreuses suite à la stimulation de leur multiplication par la réduction/augmentation du SVF. Pratiquement, 75×10^4 cellules/ml/puits sontensemencées dans des microplaques de 6 puits et incubées pendant 24 heures à 37°C . Ensuite, les cellules sont dénombrées dans 3 puits différents en utilisant la méthode du bleu de trypan et la moyenne de ces nombres est

considérée comme « t° ». Les milieux de culture dans les autres puits sont changés par de nouveaux milieux contenant 2 % de SVF. Après 6 heures, la concentration du SVF est augmentée à 10 % et les cellules sont traitées par le véhicule (DMSO 2 %, v/v), l'EGF (20×10^3 µg/ml, concentration finale) ou l'EFCA (200 µg/ml, concentration finale) et incubées à nouveau pendant 24 heures à 37°C dont 3 réplicas sont réalisés pour chaque concentration avec une répétition de la même expérience 3 fois. Passé le temps d'incubation, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées par du PBS. Ensuite, un volume de 250 µl de trypsine est ajouté. Une fois les cellules sont détachées du fond des puits, un volume de 750 µl/puits du milieu de culture est additionné et le nombre de cellules/puits est déterminé

1.2.3.8. Electrophorèse et immunoblotting

Afin d'éclaircir le mécanisme moléculaire d'action de l'EFCA sur les cellules cancéreuses étudiées, la détection de certaines protéines impliquées dans l'apoptose à savoir la caspase-3, PARP, Bcl-2, phospho-AKT, AKT-1, phospho-ERK et ERK-2 a été effectuée par Western blot.

A. Traitement des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses sontensemencées dans des microplaques de 6 puits. Après 24 heures d'incubation à 37°C et après que les cellules atteignent une confluence de 80 %, les milieux de culture sont changés et les lignées cancéreuses sont traitées par le véhicule, l'EGF (20×10^3 µg/ml, concentration finale) ou l'EFCA (100 et 200 µg/ml, concentrations finales). Trois réplicas sont réalisés pour chaque concentration avec une répétition de 3 fois.

B. Préparation des lysats cellulaires

Après 24 heures, le milieu de culture dans chaque puits est aspiré, mis dans un eppendorf de 1,5 ml, et centrifugé à 1000 rpm pendant 2 minutes à 4°C pour récupérer les cellules flottantes. Les cellules attachées sont récupérées par trypsination comme cité précédemment. Ensuite, les cellules flottantes et les cellules attachées sont mélangées et lavées par du PBS. Après le dernier lavage, un volume d'environ 70 µl/eppendorf de la solution de lyse et de solubilisation est ajouté au culot cellulaire obtenu. Les lysats sont laissés pendant 15 minutes sur un bac de glace. Après dénaturation par chauffage pendant 5 minutes, une centrifugation (1000 rpm/minutes) de 2 minutes à 4°C est appliquée pour

éliminer la phase insoluble. Un volume de 5 μ l est prélevé pour faire le dosage des protéines et pour le reste des lysats, 10 % (v/v) d'une solution de BMG est ajouté et le mélange est bouilli pendant 2 minutes pour lui faire agir. Enfin, les lysats sont conservés à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

C. Dosage des protéines

Afin de déposer la même quantité de protéines sur le gel de séparation, un dosage des protéines dans chaque lysat est effectué par la méthode de Bradford. Le dosage consiste à diluer 5 fois le réactif de Bradford et d'en prendre 995 μ l et d'ajouter 5 μ l de lysat cellulaire. Après une ébullition de 5 minutes, le mélange est incubé pendant 10 minutes à l'obscurité et l'absorbance (A) est lue à 595 nm.

La concentration protéique de chaque échantillon est calculée selon l'équation obtenue de la courbe d'étalonnage du BSA (voir annexe).

D. Western blot

Le Western blot consiste à :

- Préparation des gels de séparation avec les concentrations 7 ou 15 % et du gel de concentration avec une concentration de 3% en suivant les instructions du fournisseur (**Tableau 9**). Puis, ces gels sont coulés et placés dans la cuve d'électrophorèse.
- Dépôt de 20 μ g de l'échantillon protéique dans chaque puits avec les marqueurs de tailles.
- Remplissage de l'appareil d'électrophorèse par la solution de migration, puis connecté au courant électrique à 30 Ampères. Lorsque les échantillons protéiques forment une ligne droite entre le gel de concentration et le gel de séparation, le voltage est changé à 100 volts et les protéines sont laissées migrées pendant 1heure à 24°C.
- Passé le temps de migration, ces protéines sont transférer électriquement à l'aide du tampon de transfert sur une membrane de nitrocellulose à 100 volts pendant 45 minutes et à 4°C.

Tableau 9: Préparation des gels de séparation et de concentration (Laemmli, 1970).

| | Gel de séparation | | Gel de concentration |
|----------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|
| | 7 % (PARP, 86Da) | 15 % (caspase-3, 17D) | 3 % |
| H₂O (ml) | 9.13 | 3.8 | 5.52 |
| Solution A (ml) | 4.67 | 10 | 0.8 |
| Solution B (ml) | 5 | 5 | - |
| Solution C (ml) | - | - | 1 |
| Solution D (ml) | 0.2 | 0.2 | 0.08 |
| Solution E (ml) | 1 | 1 | 0.6 |

BN: Pour la composition des solutions A, B, C, D et E voir annexe (6).

- Afin de détecter la bonne migration et le bon transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, une visualisation est effectuée en utilisant le rouge Ponceau. Ensuite, la membrane est lavée 1 fois par l'eau distillée, puis 2 à 3 fois par du TTBS jusqu'à l'élimination totale des traces du rouge Ponceau.
- Blocage des sites libres sur la membrane en l'incubant dans une solution de BSA 3%, préparée dans du TTBS pendant 1heure. Durant cette étape, les protéines dans la solution de BSA se lient à la membrane dans tous les sites non-occupés par la protéine-cible et lorsque les anticorps sont appliqués lors de l'étape suivante, ils ne peuvent plus s'attacher à la membrane que sur les sites de liaison de la protéine-cible, ce qui réduit le bruit de fond. Après l'incubation, 3 lavages de 10 minutes chacun, par du TTBS sont effectués pour éliminer l'excès du BSA.
- Incubation de la membrane avec l'anticorps primaire dilué dans du TTBS pendant 24 heures à 4°C. Passé le temps d'incubation, l'anticorps primaire non lié est éliminé et la membrane subi 3 lavages par du TTBS de 10 minutes chacun à température ambiante. Puis, incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase, pendant 1heure à

température ambiante. Ensuite, l'anticorps secondaire non lié est éliminé et la membrane est lavée par du TTBS 3 lavages de 10 minutes chacun (**Tableau 10**).

Tableau 10: Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en western blot.

| Type d'anticorps | Anticorps primaire | Anticorps secondaire conjugué | |
|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|---------|
| | Dilution | Dilution | Origine |
| Anti-PARP | 1:500 | 1:10000 | Souris |
| Anti-Caspase-3 | 1:1000 | 1:10000 | Souris |
| Anti-pERK | 1:500 | 1:10000 | Souris |
| Anti-ERK ₂ total | 1:500 | 1:10000 | Lapin |
| Anti-pAKT ₁ | 1:500 | 1:3000 | Lapin |
| Anti-AKT ₁ total | 1:500 | 1:10000 | Souris |
| Anti-Bcl-2 | 1:500 | 1:10000 | Souris |
| Anti-β-actin | 1:100000 | 1:10000 | Souris |

➤ Détection de la protéine d'intérêt (les sondes marquées) grâce à la technique de la chimiluminescence amplifiée (Enhanced Chemiluminescence) en utilisant le réactif de détection de la chimiluminescence de Western Blot (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). Cette technique se déroule dans une chambre obscure et qui consiste à mettre un mélange d'une solution composé de luminol et d'H₂O₂ (1 ml/1 ml, v/v) dans le tube qui contient la membrane. Un léger mouvement de rotation est pratiqué pendant 2 minutes pour que ce mélange touche la totalité de la surface membranaire. Puis, la membrane est retirée de la solution et l'excès du réactif de détection est éliminé. Ensuite, la membrane est protégée par du film plastique et placée dans une cassette pour film sensible aux rayons X, côté protéines vers le haut, et au dessus un film sensible aux rayons X est mis avec précaution. Ce dernier doit rester sec pendant l'exposition qui dure 2 à 5 minutes. Après, le film photosensible est mis dans une solution du développement jusqu'à apparition des bandes, qui représentent les protéines qui ont migrées, puis fixé par une solution de fixation jusqu'à qu'elle devienne transparente.

➤ Arrachage d'anticorps et réutilisation de la membrane : Cette membrane peut être réutilisée pour plusieurs marquages, à condition d'éliminer les anticorps attachés en

utilisant la solution d'arrachage d'anticorps « Restore Western Blot Stripping Buffer ». Tout d'abord, la membrane est lavée par du TTBS 3 fois pendant 10 minutes à température ambiante, pour éliminer le reste du réactif de chemiluminescence, ensuite par l'eau distillée pendant 5 minutes pour éliminer le Tween du TTBS. Puis, elle est introduite dans la solution d'arrachage d'anticorps (stripping solution) pendant 10 minutes à température ambiante. Après, un lavage par TTBS est pratiqué et ainsi, la membrane est prête pour être utilisée une autre fois après blocage par 3 % du BSA.

Il est à noter que l'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences du fait que, sa concentration est la même au niveau de toutes les cellules (contrôle interne). Ainsi, la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. Cette pratique permet la correction par rapport au taux de protéines totales sur la membrane, en cas d'erreur ou de transfert incomplet.

1.2.4. Etude de l'effet hémato-protecteur de l'extrait des feuilles de *Cléome arabica* chez la souris

1.2.4.1. Répartition des groupes d'animaux

Les animaux sont classés en 6 groupes selon la répartition suivante:

- **Groupe 1 (témoin négatif):** les animaux de ce groupe reçoivent quotidiennement le carboxy-méthyl-cellulose 1 % (CMC 1 %) comme véhicule par voie intrapéritonéale durant 6 jours. A partir du 4^{ème} jour jusqu'au 6^{ème} jour ces souris sont injectées par du NaCl 9 g/l par voie sous cutanée. Le 7^{ème} jour, ces souris sont sacrifiées et le sang est collecté dans des tubes contenant l'EDTA.
- **Groupe 2 et 3 (témoin EFCA et rutine respectivement):** les souris de ces groupes reçoivent chaque jour une dose de 100 mg/kg d'extrait ou de la rutine respectivement par voie intrapéritonéale durant 6 jours. A partir du 4^{ème} jour et jusqu'au 6^{ème} jour, elles sont injectées par du NaCl 9 g/l par voie sous cutanée. Au 7^{ème} jour, ces souris sont sacrifiées et le sang est collecté dans des tubes contenant l'EDTA.
- **Groupe 4 (témoin AraC) :** les souris de ce groupe reçoivent une dose quotidienne du véhicule (CMC 1 %) par voie intrapéritonéale pendant 6 jours. De même, une injection sous cutanée de la cytarabine (50 mg/kg) est effectuée du 4^{ème} jusqu'au 6^{ème} jour. Au 7^{ème} jour les souris sont sacrifiées et le sang est collecté dans des tubes contenant l'EDTA.

➤ **Groupe 5 et 6 (Combinaison AraC/extrait et AraC/rutine respectivement):** les souris de ces groupes reçoivent une dose quotidienne d'extrait ou de la rutine (100 mg/kg) par voie intrapéritonéale pendant 6 jours. Du 4^{ème} jour jusqu'au 6^{ème} jour, une injection sous cutanée de l'AraC (50 mg/kg) est effectuée. Au 7^{ème} jour ces souris sont sacrifiées et le sang est collecté dans des tubes contenant l'EDTA.

1.2.4.2. Détermination de la formule de numération sanguine

La formule de numération sanguine (FNS) est déterminée à l'aide d'un compteur automatique d'hématologie (Beck Man coulter).

1.2.4.3. Mesure de la température corporelle des souris

La température corporelle des souris de tous les groupes est prise quotidiennement par voie auditive en utilisant un thermomètre électronique (THERMOVAL[®]).

1.3. Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ou SEM. Les IC₅₀ sont calculées par la méthode de la régression linéaire. L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test t de Student pour la comparaison de deux échantillons, ou l'analyse de la variance (one-way ANOVA) suivie par le post-test de Turkey-Kramer pour la comparaison de plusieurs échantillons par le logiciel GraphPad INSTAT pour Windows. Les valeurs de $P < 0,05$ sont considérées comme significatives.

2. Résultats

2.1. Extraction et dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux

L'extraction des polyphénols par le système méthanol/eau et acétate d'éthyle a permis d'obtenir d'environ 1g d'un précipité jaune brut à partir de 100 g de poudre des feuilles de *Cléome arabica*.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux contenus dans ce précipité, en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu, a montré que cet extrait est relativement riche en polyphénols, avec un taux de $322,1 \pm 3,44$ mg équivalent d'acide gallique/g de l'extrait (**Figure 15, A**). L'estimation quantitative des flavonoïdes totaux, en utilisant la méthode du trichlorure d'aluminium, a montré que cet extrait est aussi riche en flavonoïdes qui sont estimés à $245,6 \pm 4,67$ mg équivalent de quercétine/g de l'extrait (**Figure 15, B**).

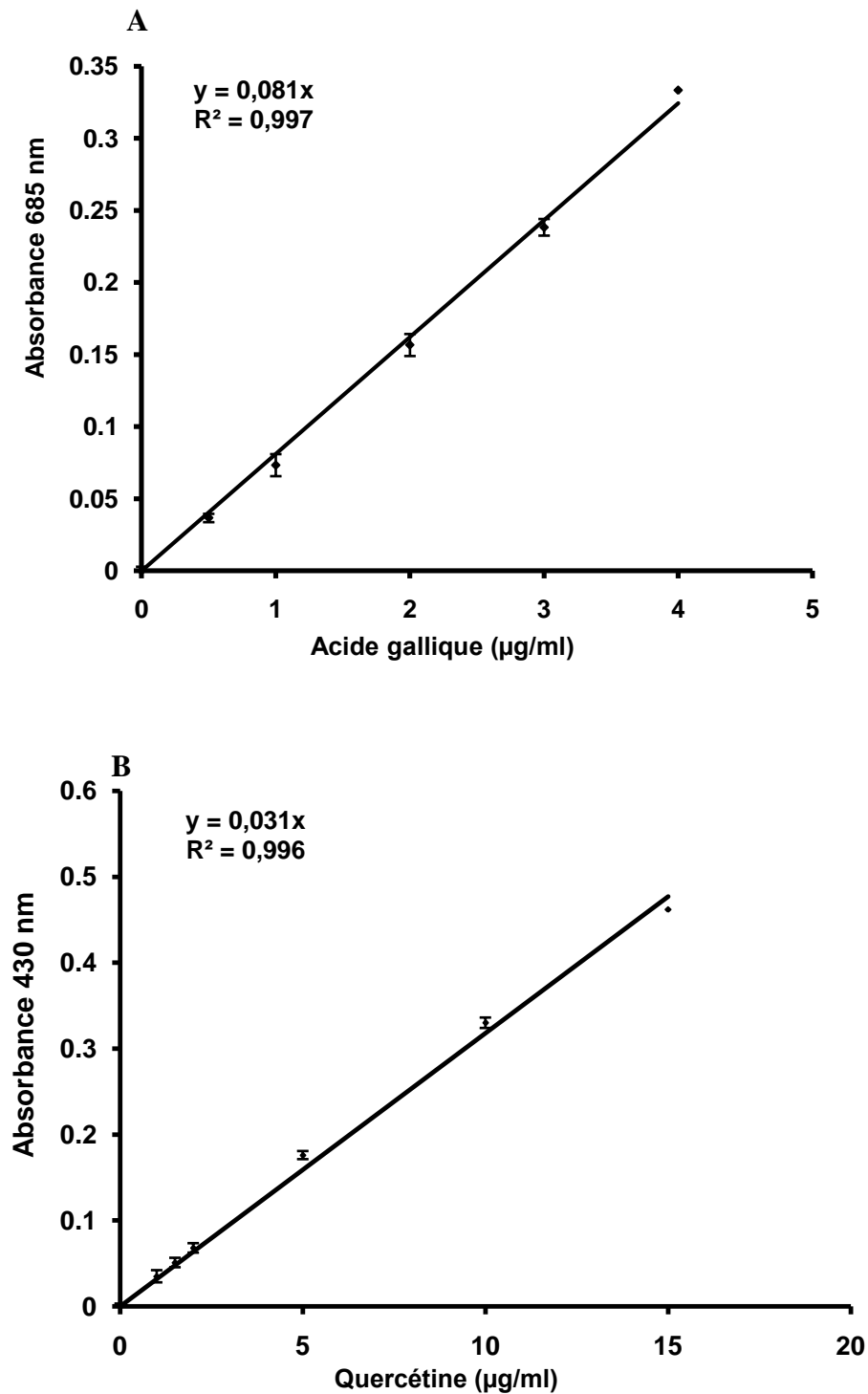


Figure 15: Droites d'étalonnages de l'acide gallique pour la détermination quantitative des polyphénols totaux (A), et de la quercétine pour la détermination quantitative des flavonoïdes totaux (B), contenus dans l'extrait des feuilles de *Cléome arabica*. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3).

2.2. Activité anti-oxydante de l'extrait des feuilles de *Cléome arabica*

2.2.1. Effet antiradicalaire

Les résultats de la présente étude ont indiqué que tous les composés testés ont exercé un effet scavenger remarquable ($P < 0,001$) contre le radical DPPH• et d'une manière dose-dépendante. En effet, l'utilisation d'une gamme de concentration entre 2 et 20 µg/ml a montré que l'EFCA, la quercétine et le trolox ont exercé un effet similaire dont les courbes sont presque superposées avec un effet dose dépendant entre 2 et 10 µg/ml. A partir de 20 µg/ml les courbes forment un palai avec un pourcentage d'inhibition d'environ 94 %. Par contre, la rutine a exercé un effet plus efficace en atteignant presque le 100 % d'inhibition à seulement 6 µg/ml. L'IC₅₀ obtenue pour l'EFCA est estimé à 4,88 µg/ml. Cette valeur est comparable à celles de la quercétine (4,78 µg/ml) et du trolox (4,77 µg/ml) et meilleure que celle du BHT (16 µg/ml) et plus faible que celui de la rutine (2,30 µg/ml) (**Figure 16**).

2.2.2. Chélation du fer ferreux

L'EFCA a donné une activité chélatrice vis-à-vis le fer ferreux (Fe⁺²) d'une manière dose dépendante en utilisant des concentrations élevées entre 200 et 1000 µg/ml. Ainsi, un maximum de chélation de 93,9 % est obtenu à une concentration de 1000 µg/ml. En revanche, l'EDTA, le chélateur standard, a exercé un effet chélateur de 98 % à 20 µg/ml (**Figure 17**). Les valeurs des IC₅₀ sont estimées à 377,75 et 6,46 µg/ml pour l'EFCA et l'EDTA respectivement.

2.2.3. Pouvoir anti-oxydant réducteur du fer

Les résultats de cette étude ont indiqué que l'EFCA a exercé un puissant effet réducteur et d'une manière dose-dépendante (**Figure 18**).

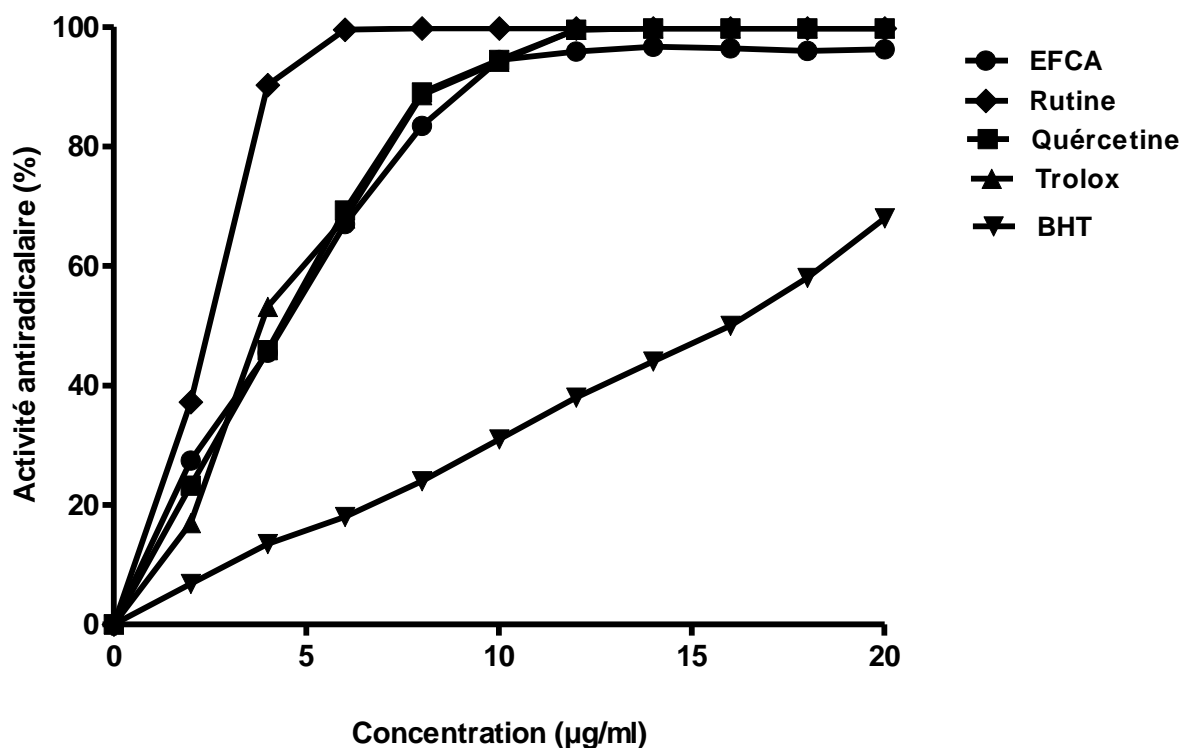


Figure 16: Activité antiradicalaire de l'EFCA, la quercétine, la rutine, le trolox et le BHT. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du radical libre DPPH \cdot par rapport au contrôle. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3).

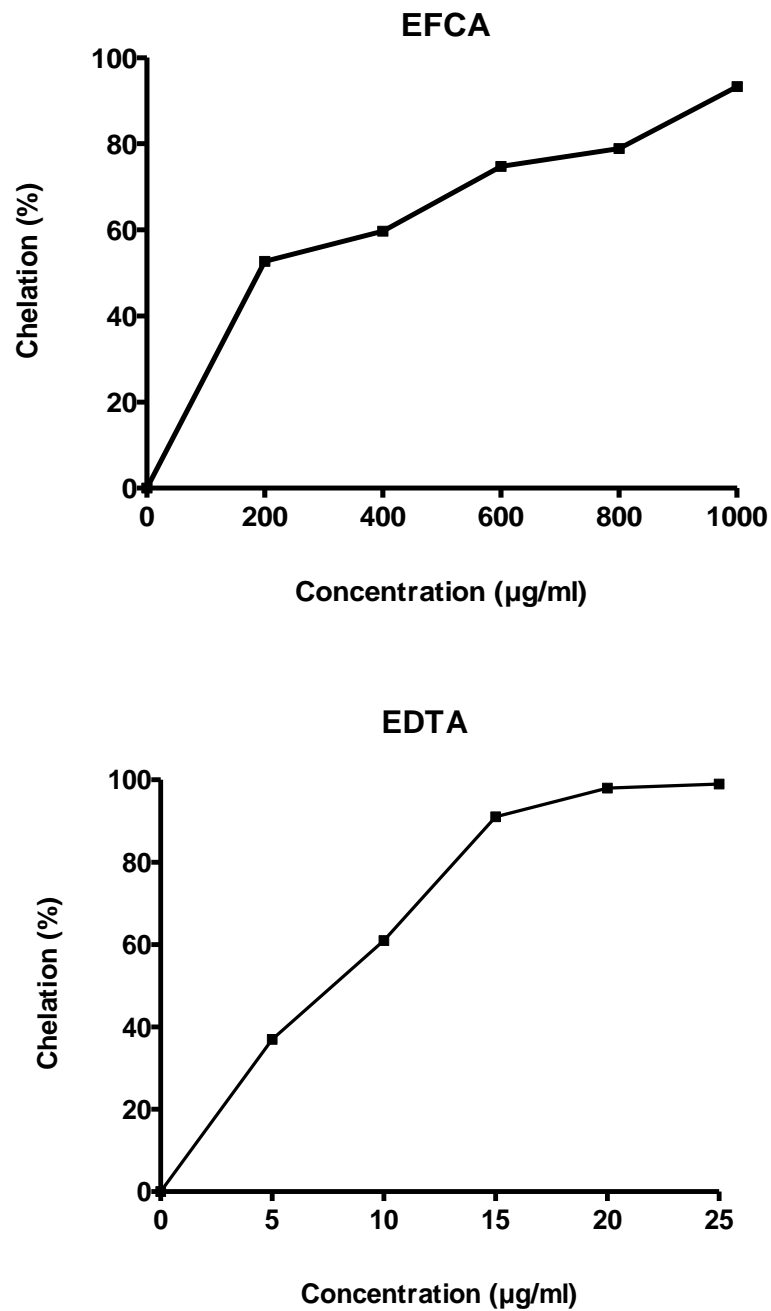


Figure 17: Activité chélatrice de l'EFCA et de l'EDTA envers le fer ferreux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de chélation par rapport au contrôle. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3).

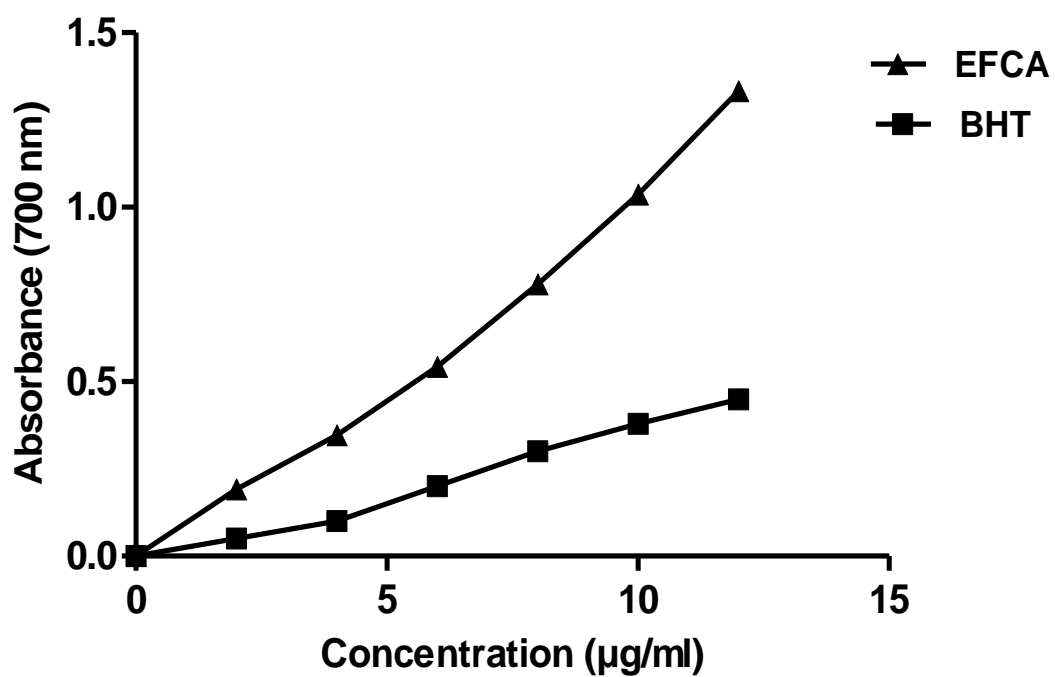


Figure 18: Pouvoir antioxydant réducteur du fer de l'EFCA et du BHT. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3).

2.3. Effet anticancéreux de l'extrait sur quelques lignées de cellules cancéreuses

2.3.1. Effet cytotoxique sur les lignées de cellules cancéreuses

Le bleu de trypan a été utilisé afin d'évaluer l'effet cytotoxique de l'EFCA envers les cinq lignées de cellules cancéreuses étudiées. Après 24 heures de traitement, les résultats obtenus, ont montré que l'extrait a diminué le nombre des cellules cancéreuses avec des doses effectives « ED₅₀ » de 178,19; 180,74; 174,26; 160,04 et 96,50 µg/ml pour DLD-1, Hep-G2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE respectivement (**Figure 19**). La concentration 200 µg/ml a réduit d'une façon très significative ($P < 0,001$) le nombre de toutes les cellules cancéreuses. Cependant, le facteur de croissance épidermique, EGF (20×10^3 µg/ml), a augmenté significativement ($P < 0,001$) le nombre de ces cellules avec un pourcentage de 50% en comparaison avec le contrôle non traité. Toutefois, il est intéressant de noter que les concentrations de l'EFCA de 1 à 100 µg/ml n'ont pas exercé le même effet sur les cinq lignées des cellules tumorales dont la réduction du nombre cellulaire diffère d'une lignée à une autre. D'une part, la lignée cellulaire de neuroblastome (**Figure 19, E**) est la lignée la plus sensible au traitement. En fait, même 5 µg/ml de l'extrait a diminué significativement le nombre de ces cellules ($P < 0,001$). D'autre part, l'extrait a exercé un effet biphasique au niveau des cellules cancéreuses HeLa. En effet, la concentration 1 µg/ml a augmenté le nombre cellulaire d'une façon significative et semblable à l'effet de l'EGF. Mais, à forte concentration, 200 µg/ml, l'extrait a exercé un effet inverse (**Figure 19, D**). En plus, les résultats montrent que toutes les autres lignées cellulaires cancéreuses sont sensibles à l'effet de 100 µg/ml de l'extrait et leurs nombres ont diminué significativement ($P < 0,001$).

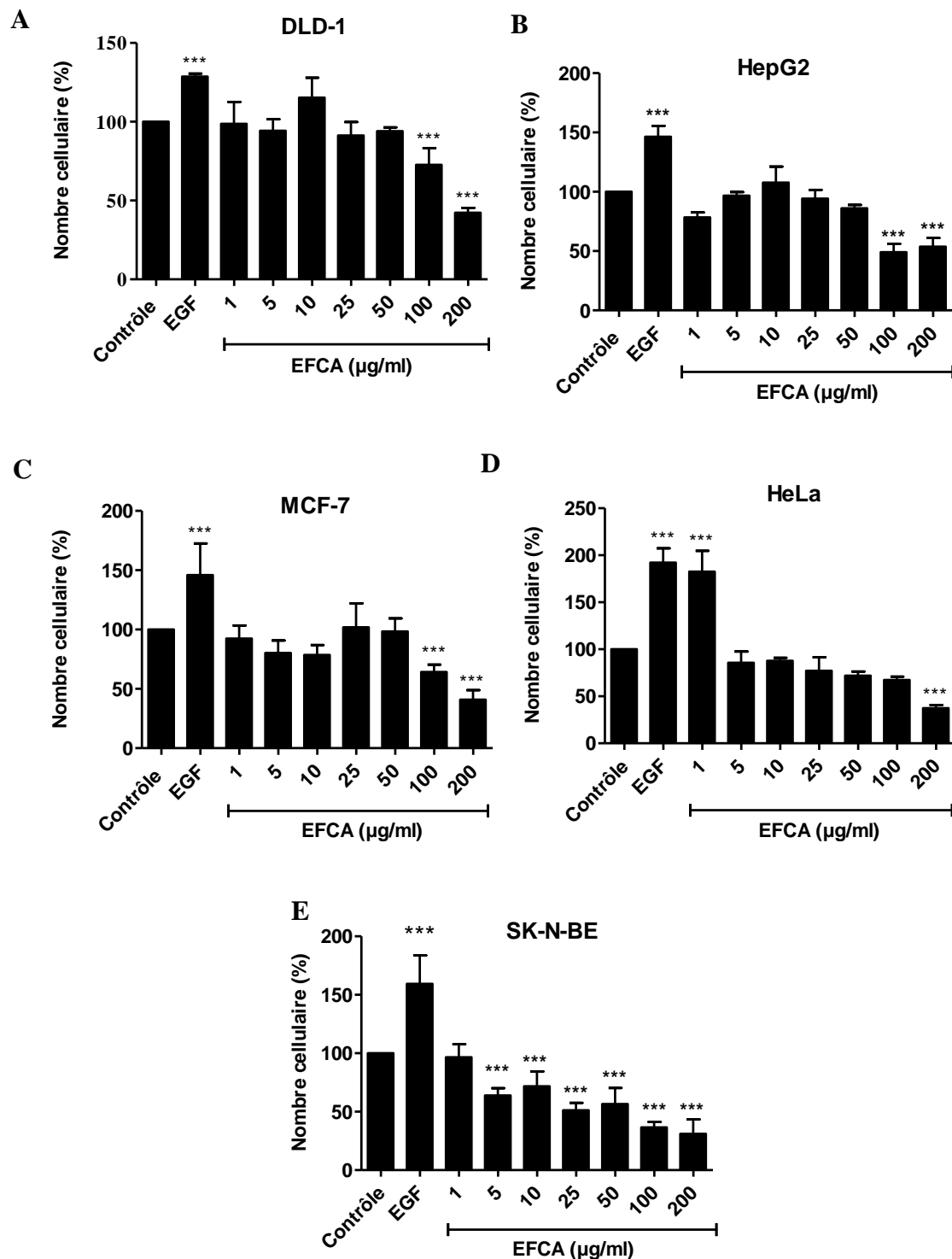


Figure 19: Effet de l'EFCA sur la prolifération des lignées cancéreuses DLD-1, Hep-G2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE. Les cellules cancéreuses sont ensemencées dans des plaques de 24 puits pendant 4 heures, puis traitées avec différentes concentrations de l'EFCA (1, 5, 10, 25, 50, 100 et 200 µg/ml) pendant 24 heures. Le dénombrement de cellules est réalisé par la méthode du bleu de trypan. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes. *** $P < 0,001$ différence hautement significative (test t de Student) vs le contrôle non traité, considéré comme 100 % de prolifération.

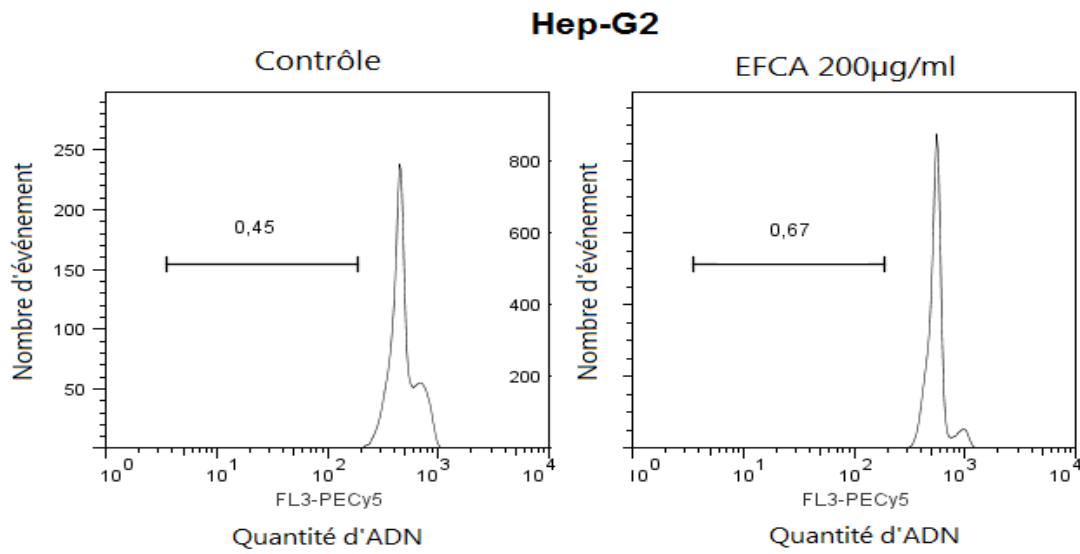


Figure 21: Répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses Hep-G2 suite à leur traitement par 200 µg/ml de l'EFCA pendant 24 heures dans les mêmes conditions citées dans la figure 20.

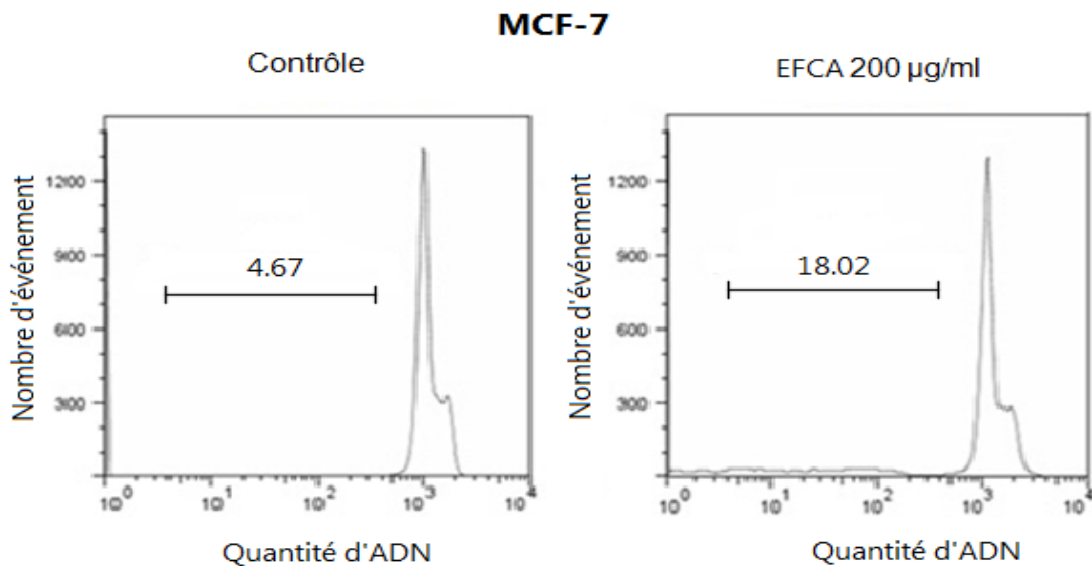


Figure 22: Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses MCF-7 dans les mêmes conditions citées dans la figure 20.

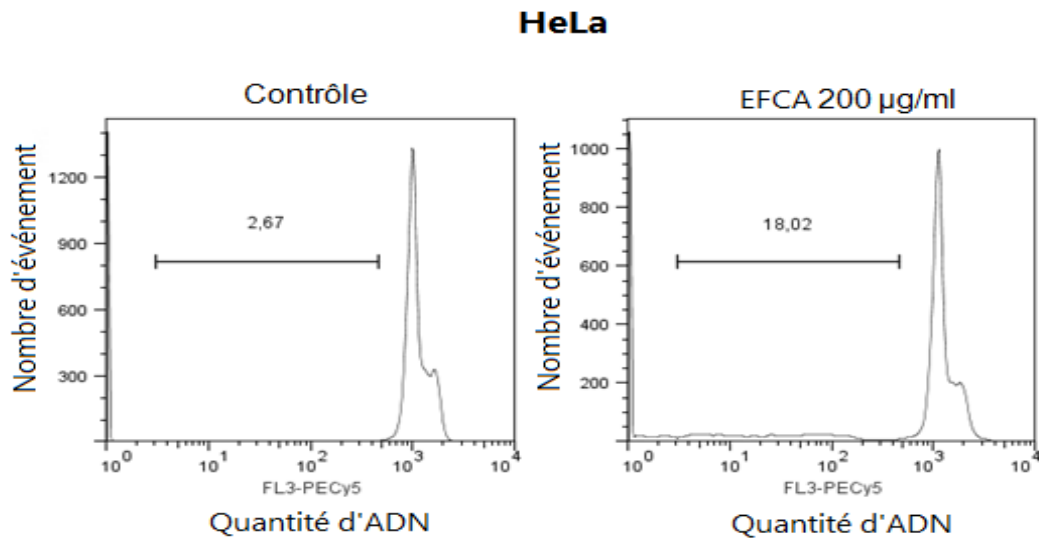


Figure 23: Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses HeLa dans les mêmes conditions citées dans la figure 20.

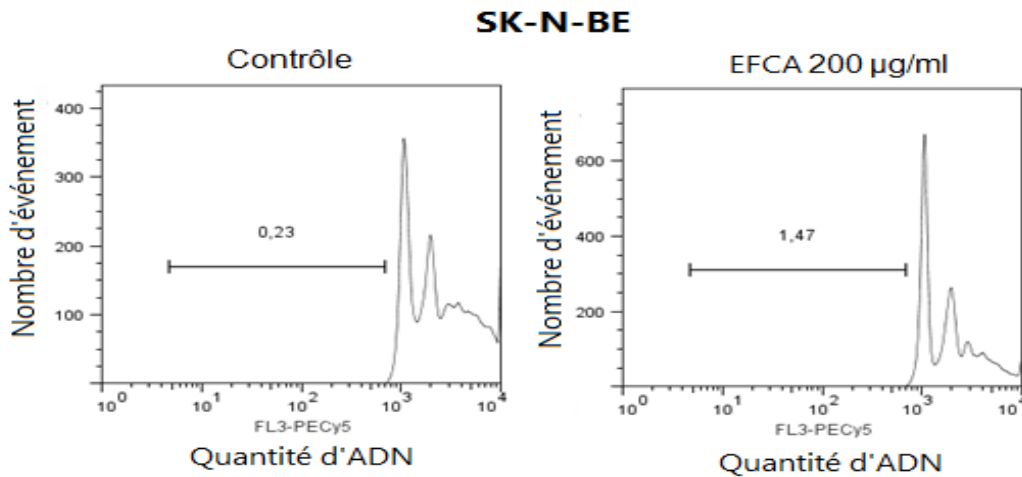


Figure 24: Analyse par cytométrie en flux de la répartition des cellules dans les phases sous-G1 à M du cycle cellulaire des cellules cancéreuses SK-N-BE dans les mêmes conditions citées dans la figure 20.

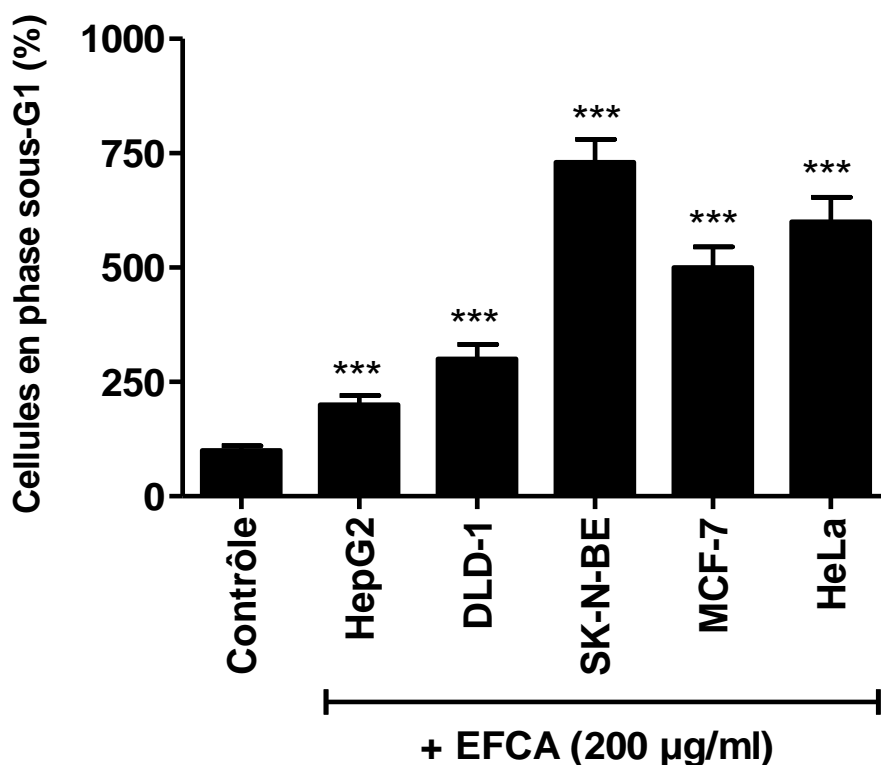


Figure 25: Pourcentages des différentes lignées de cellules cancéreuses en phase sous-G1. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes. *** $P < 0,001$ différence hautement significative (test t de Student) par rapport au contrôle non traité, considéré comme 100 % de prolifération

2.3.3. Effet de l'extrait sur la caspase-3 et le clivage du PARP dans les 5 lignées de cellules cancéreuses

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les concentrations 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ de l'EFCA augmentent le niveau de la bande du caspase-3 active qui possède un poids moléculaire de 17 kDa, ainsi que le niveau de la bande de la protéine PARP clivée (86 kDa) pour toutes les lignées cellulaires cancéreuses étudiées (**Figure 26**).

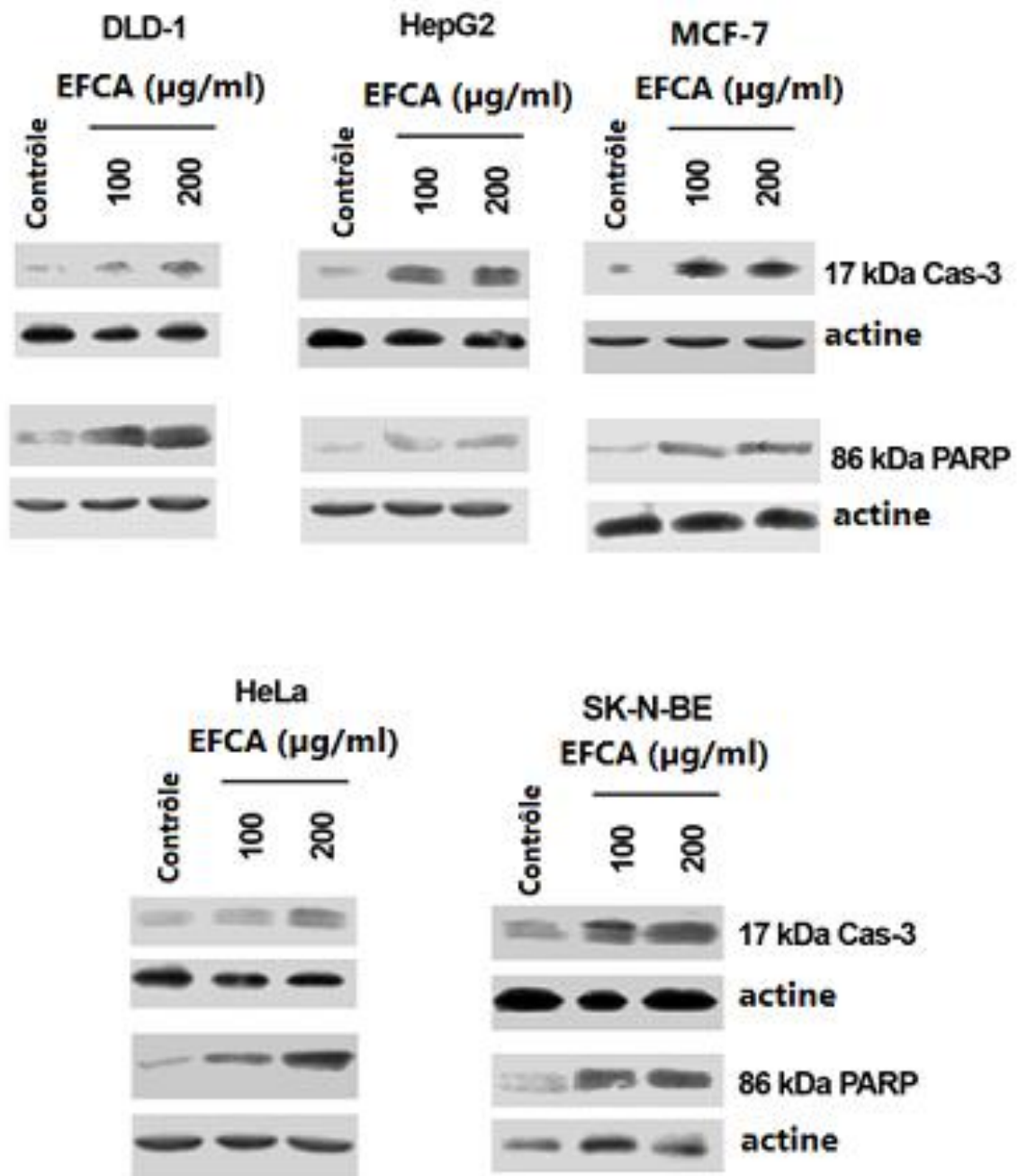


Figure 26: L'expression des protéines « caspase-3 » et « PARP » dans les lignées de cellules cancéreuses DLD-1, HepG2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE. Les cellules cancéreuses sont traitées avec les concentrations 100 et 200 µg/ml de l'EFCA pendant 24 heures et les teneurs en protéines ont été suivis par analyse Western blot. L'actine est utilisée comme marqueur de dépôt afin de normaliser les expériences (contrôle interne) et la concentration de la protéine-cible est indexée à celle de l'actine. Trois expériences distinctes ont été faites pour chaque lignée cancéreuse.

2.3.4. Effet préventif de l'extrait contre la croissance des cellules cancéreuses

L'effet préventif de l'EFCA contre la croissance des cellules cancéreuses utilisées dans la présente étude, après stimulation de leur multiplication par la réduction/augmentation du SVF et d'EGF, est étudié. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation du sérum à 10 % a provoqué le dédoublement du nombre cellulaire et l'EGF a encore augmenté le nombre de cellules dans toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées d'une façon hautement significative ($P < 0,001$). Cependant, l'EFCA (200 µg/ml) a diminué très significativement le nombre de toutes les lignées cancéreuses, à la fois après augmentation du pourcentage du SVF et en présence d'EGF (**Figure 27**).

Dans ces mêmes conditions expérimentales, l'EFCA (200 µg/ml) a activé la caspase-3 (**Figure 28**), par conséquent, le clivage du PARP.

2.3.5. Effet de l'extrait sur les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire

L'activation des protéines de la survie cellulaire AKT, ERK et la protéine anti-apoptotiques Bcl-2 jouent un rôle très important dans la progression de la prolifération des cellules cancéreuses. Comme prévu, l'EGF a augmenté la stimulation de phosphorylation des protéines AKT et ERK, ainsi que le taux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, d'une façon similaire, dans toutes les lignées cancéreuses étudiées. La figure 29A et B présente les résultats obtenus pour les lignées MCF-7, et SK-N-BE comme exemple. Le prétraitement des cellules cancéreuses par 200 µg/ml de l'EFCA n'a pas modifié le taux des protéines ERK et AKT totales. Mais, il a réduit fortement le taux des protéines phosphorylées (P-ERK et P-AKT) aussi bien que le taux de la protéine Bcl-2.

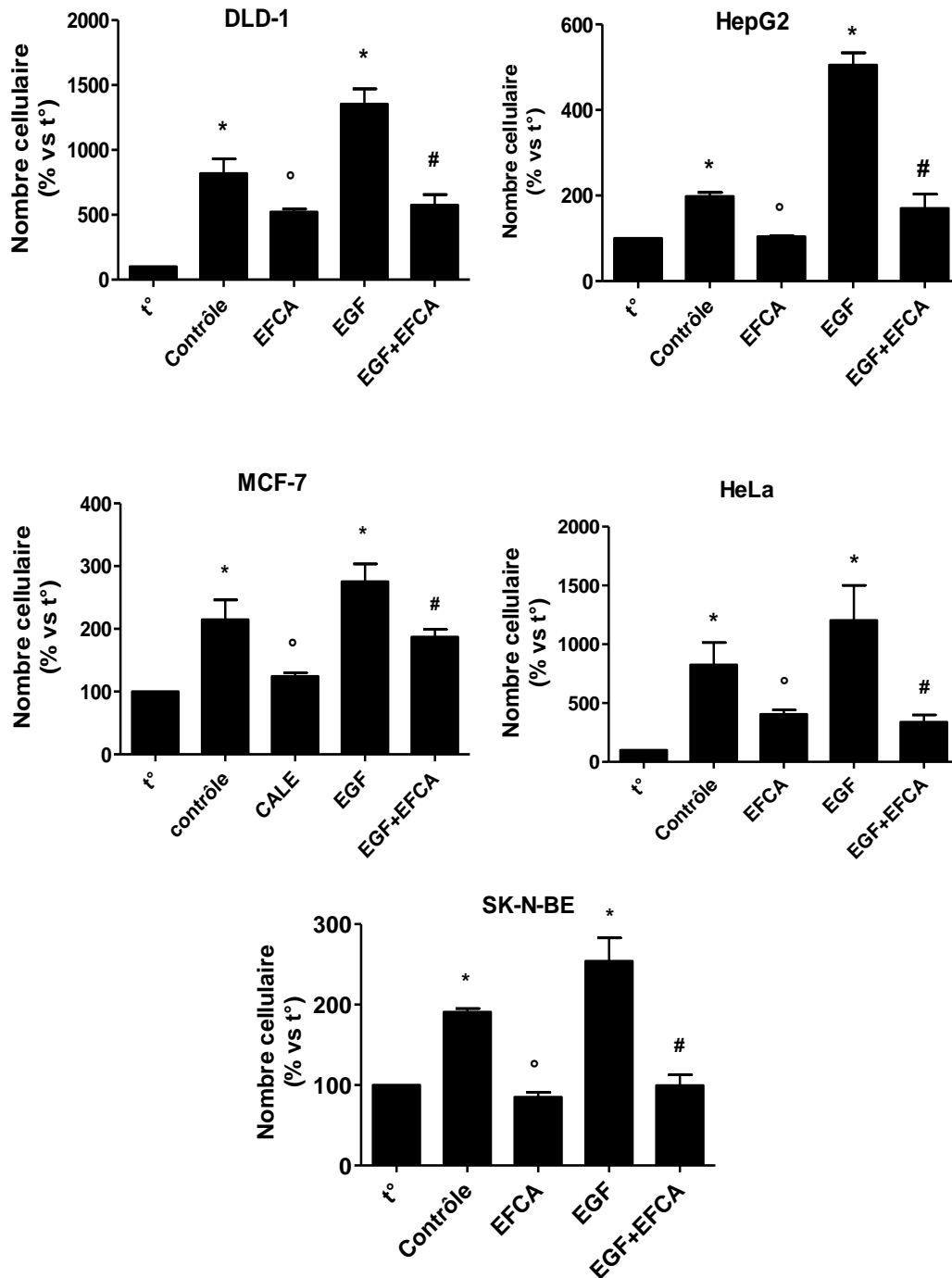


Figure 27: Effet de l'EFCA (200 µg/ml) sur la prolifération des lignées cancéreuses DLD-1, HepG2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE dans les conditions de privation (2 %)/augmentation (10 %) du sérum en présence ou en l'absence d'EGF (20 10^{-3} µg/ml). Les données représentent le pourcentage de cellules viables par rapport à t° considéré comme 100 % de prolifération. La viabilité cellulaire est évaluée par le test du bleu de trypan. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD de 3 expériences indépendantes. Les symboles *, ° et # signifie la signification (one-way ANOVA suivie par le post-test de Turkey-Kramer) par rapport à t° , au contrôle et à l'EGF respectivement.

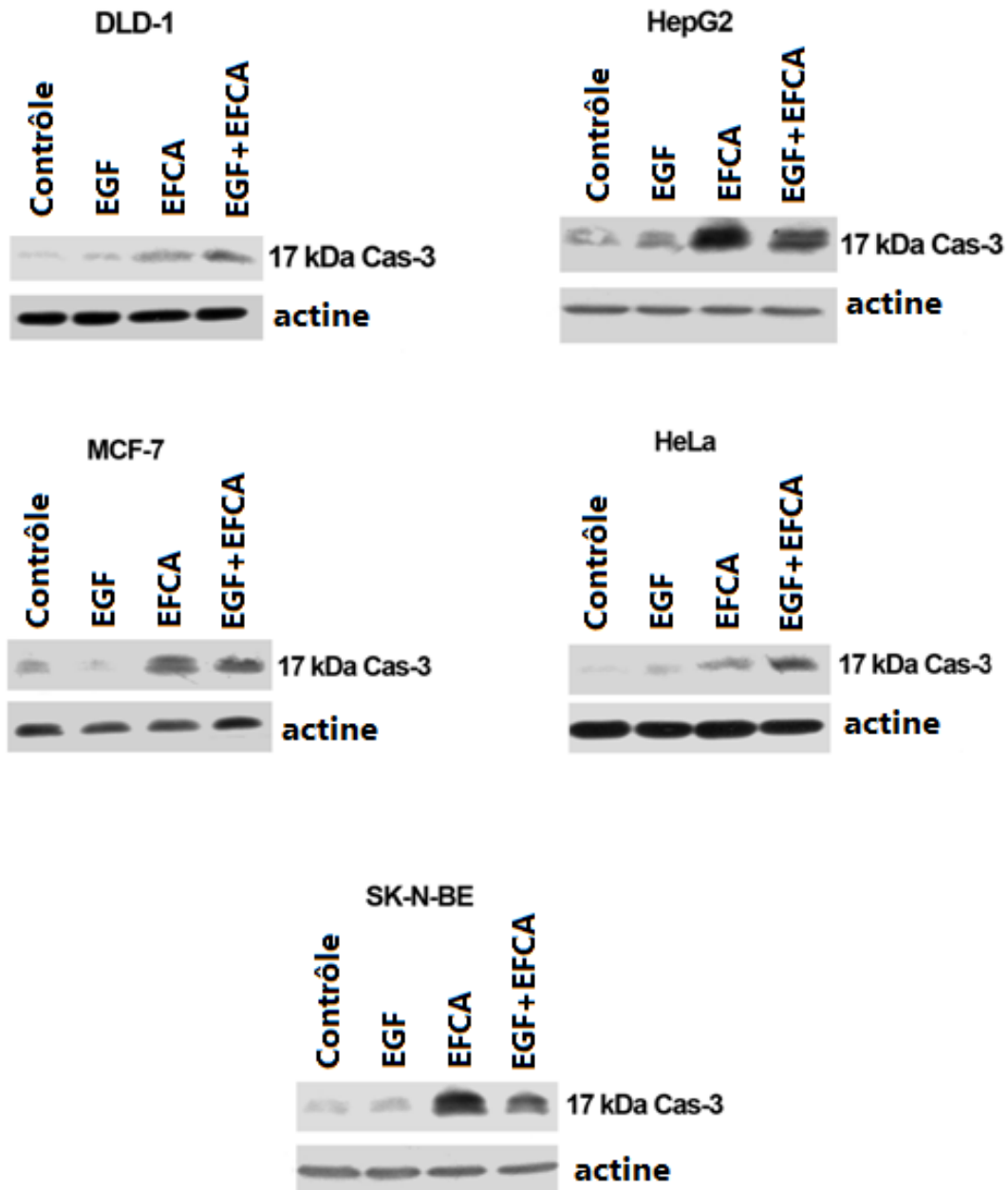


Figure 28: Effet de l'EFCA sur l'expression de la caspase-3 dans les lignées des cellules cancéreuses DLD-1, HepG2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE. Les cellules cancéreuses sont incubées dans un milieu de culture contenant 10 % du SVF pendant 24 heures, puis sous la privation de sérum pendant 4 heures, puis à nouveau dans un milieu à 10 % de sérum pendant 24 heures (contrôle) en présence ou en l'absence d'EGF ($20 \cdot 10^{-3} \mu\text{g/ml}$) et/ou de l'EFCA ($200 \mu\text{g/ml}$). Le niveau des caspases-3 (17 kDa Cas-3) est déterminé par western blot. Le signal a été normalisé en utilisant l'actine comme standard interne. Trois expériences distinctes ont été réalisées pour chaque lignée cancéreuse.

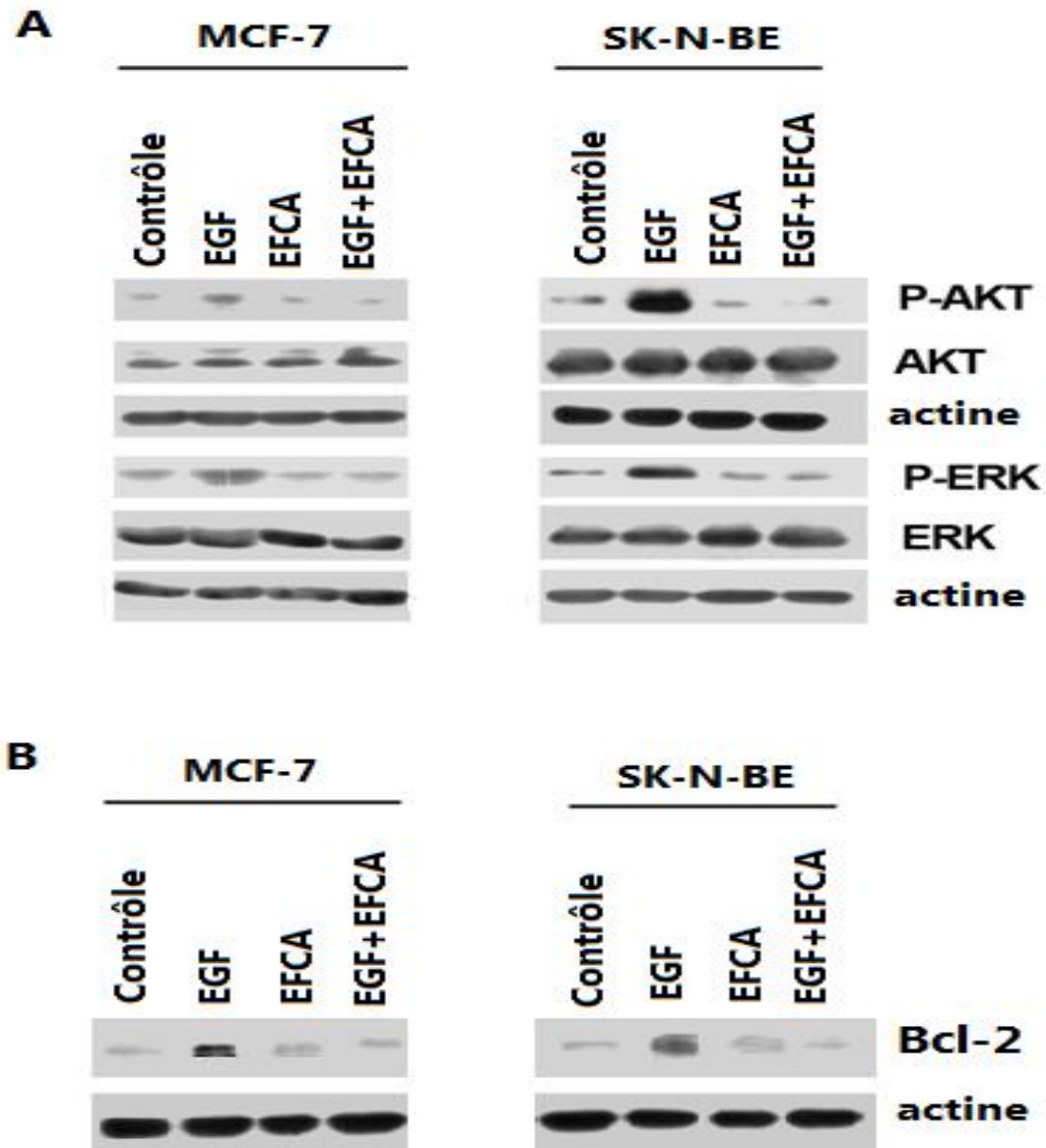


Figure 29: Effet de l'EFCA sur le taux des protéines P-AKT et P-ERK et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 induites par la privation/augmentation de sérum en l'absence ou en présence d'EGF. Les cellules cancéreuses sont incubées dans un milieu de culture contenant 10 % de SVF pendant 24 heures, puis, sous la privation de sérum (2 %) pendant 4 heures, puis à nouveau dans 10 % de SVF, en présence ou en l'absence d'EGF ($20 \cdot 10^3 \mu\text{g/ml}$) et/ou de l'EFCA ($200 \mu\text{g/ml}$) pendant 24 heures. Les taux des protéines AKT et ERK phosphorylées et totales, ainsi que le taux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, sont déterminés par western blot. Le signal a été normalisé en utilisant l'actine comme standard interne. Trois expériences distinctes sont réalisées.

2.4. Effet hémato-protecteur de l'extrait contre la toxicité induite par l'AraC chez la souris

La formule de numération sanguine (FNS) des souris a montré que l'AraC (50 mg/kg) présente une remarquable toxicité envers les cellules sanguines.

Les résultats de cette étude montrent une diminution significative du nombre des globules rouges ($P < 0,001$) après l'injection sous cutanée de l'AraC en comparaison avec le témoin non traité (**Figure 30**). Ainsi, la quantité d'hémoglobine et le pourcentage de l'hématocrite ont significativement ($P < 0,001$) diminué (**Figure 31 A et B**).

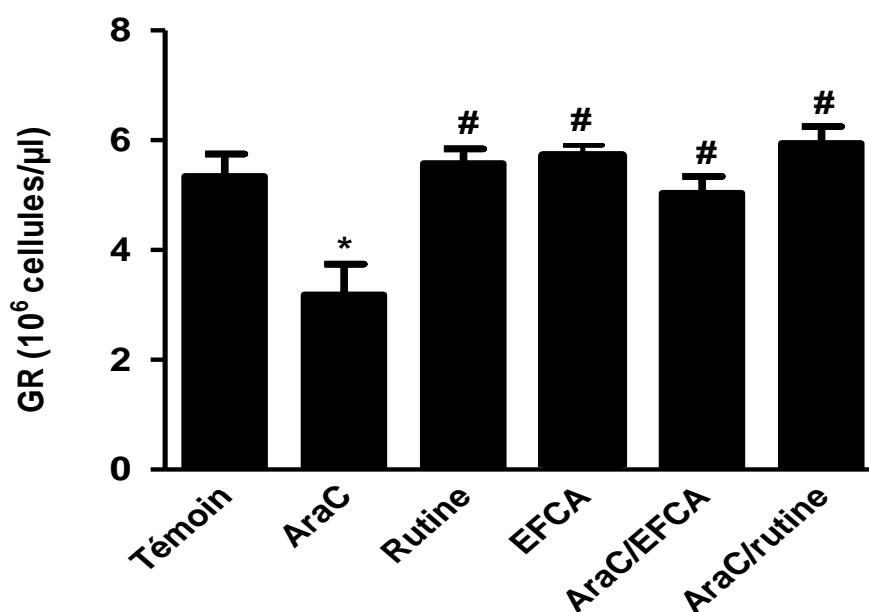


Figure 30: Effet protecteur de l'EFCA (100 mg/kg) ou de la rutine (100 mg/kg) envers la toxicité de l'AraC (50 mg/kg) sur les globules rouges des souris Balb C. L'EFCA et la rutine sont administrés aux souris par voies intrapéritonéale. Cependant, l'AraC est administré par voie sous cutanée. Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n= 6-10). * et # $P < 0,001$ différence hautement significative dont les symboles * et # signifie la signification (one-way ANOVA suivie par le post-test de Turkey-Kramer) par rapport au témoin et à l'AraC respectivement.

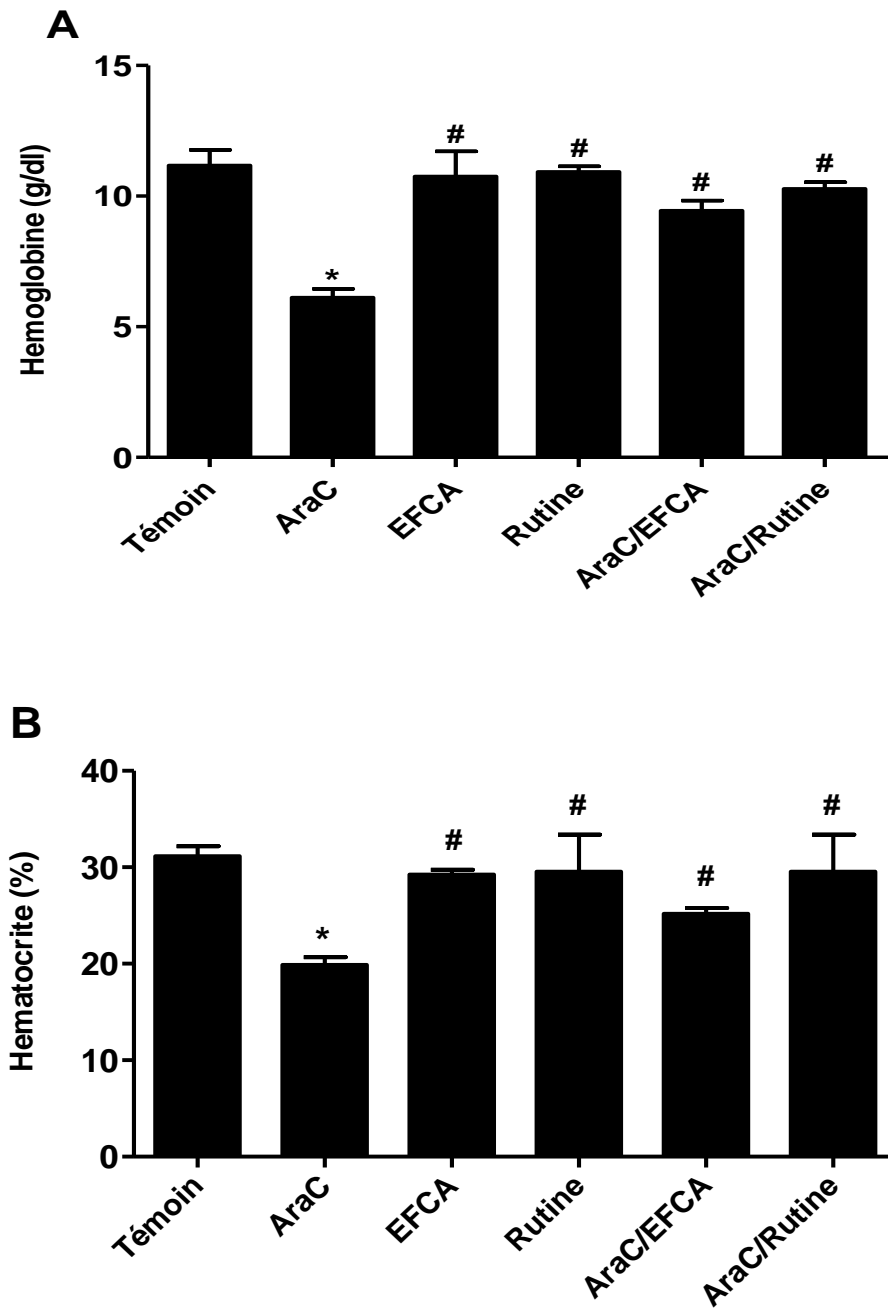


Figure 31: Effet protecteur de l'EFCA (100 mg/kg) envers la toxicité de l'AraC (50 mg/kg) sur la quantité d'hémoglobine (A) et le pourcentage de l'hématocrite (B) chez les souris Balb C en comparaison avec la rutine. L'EFCA et la rutine sont administrés aux souris par voies intrapéritonéale, tandis que, l'AraC est administré par voie sous cutanée. Chaque point représente la moyenne \pm SEM. (n= 6-10), * et # $P < 0,001$ différence significative dont les symboles * et # signifie la signification (one-way ANOVA suivie par le post-test de Turkey-Kramer) par rapport au témoin et à l'AraC respectivement.

En outre, les résultats obtenus montrent que le nombre des globules blancs a diminué d'une manière très significative ($P < 0,001$) après l'administration d'une dose unique de 50 mg/kg d'AraC a souris Balb C. Cependant, la combinaison de l'AraC/EFCA ou de l'AraC/rutine montre que l'EFCA ainsi que la rutine n'ont pas protégé les globules blancs et l'effet toxique reste hautement significatif ($P < 0,001$) (Figure 32).

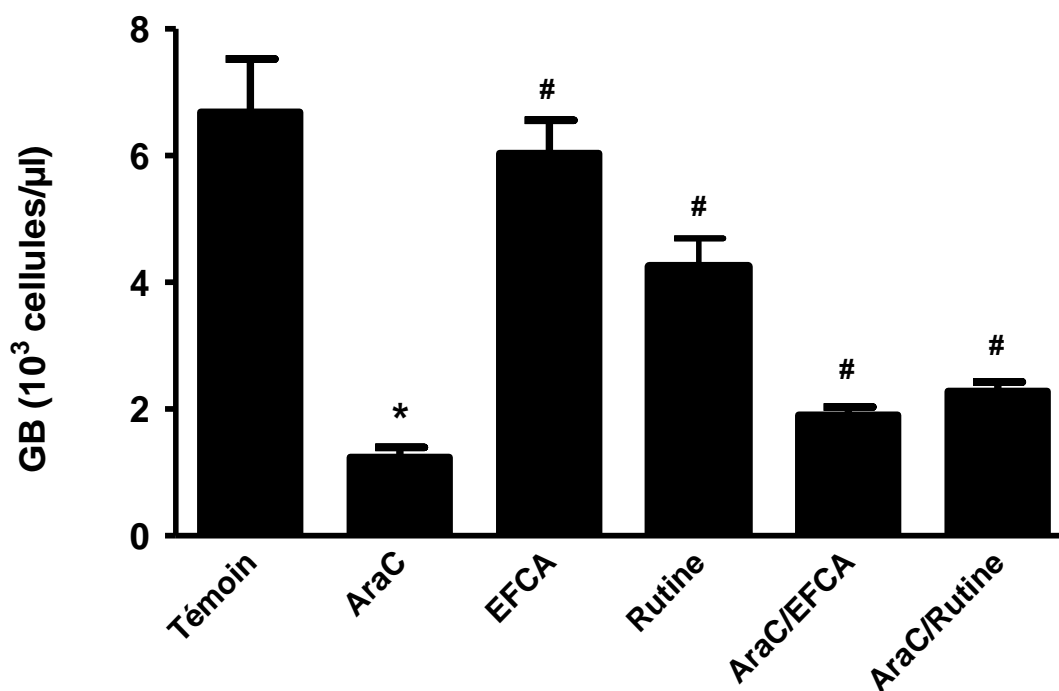


Figure 32: Effet protecteur de l'EFCA (100 mg/kg) envers la toxicité de l'AraC (50 mg/kg) sur les globules blancs (GB) des souris Balb C en comparaison avec la rutine (100 mg/kg). L'EFCA et la rutine sont administrés par voies intrapéritonéale tandis que l'AraC est administré par voie sous cutanée. Chaque point représente la moyenne \pm SEM. (n= 6-10), * et # $P < 0,001$ différence significative dont les symboles * et # signifie la signification (one-way ANOVA suivie par le post-test de Turkey-Kramer) par rapport au témoin et à l'AraC respectivement.

L'élévation de la température corporelle est un des effets indésirables de l'AraC. En effet, les résultats obtenus montrent que l'administration de 50 mg/kg de l'AraC par voie sous cutanée provoque, après 24 heures, une élévation de la température corporelle des souris. Cependant, le traitement par 100 mg/Kg de l'EFCA a exercé un puissant effet antipyrétique, similaire à celui de la rutine, en diminuant la température de 39°C à 37°C (Figure 33).

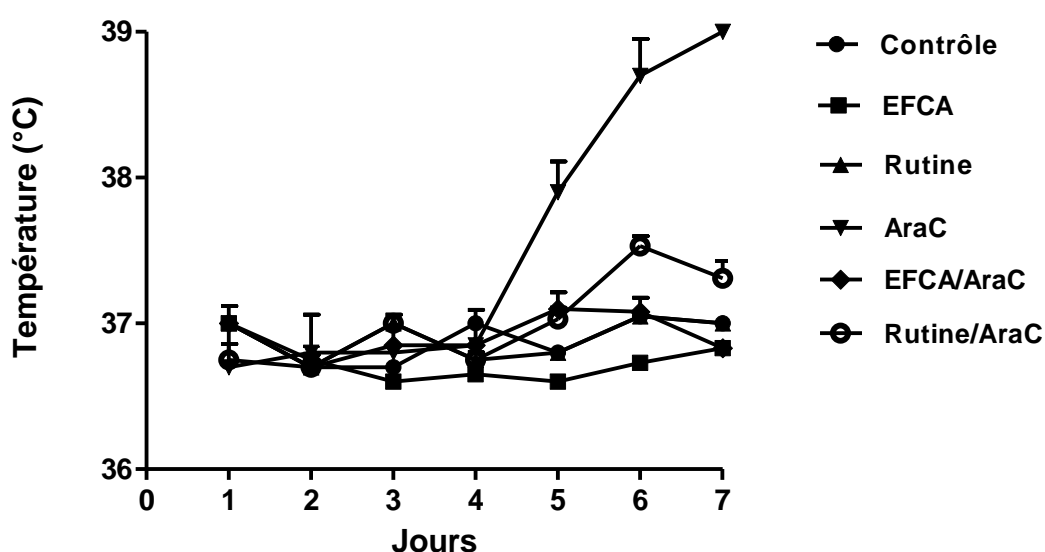


Figure 33: Effet antipyrétique de l'EFCA (100 mg/kg) chez les souris Balb C traitées par l'AraC (50 mg/kg) par voie sous cutanée en comparaison avec la rutine (100 mg/kg). Chaque point représente la moyenne \pm SEM. (n= 6-10).

Au cours de la réalisation de cette étude, plusieurs remarques ont été notées chez le groupe traité par l'AraC seule à savoir :

- Le nombre des plaquettes n'a pas changé et reste identique à celui du groupe non traité.
- Chute de poiles des souris surtout après la troisième injection. Par contre, chez les souris traitées par la combinaison AraC/EFCA ou AraC/rutine la chute des poiles était moins prononcée ou même négligeable.
- Changement de la couleur des urines et de la matière fécale.
- Après injection de l'AraC, les souris males deviennent très agitées.

3. Discussion

Dans la présente étude, les effets anticancéreux, chimioprotecteurs et antioxydants d'un extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, obtenu à partir des feuilles de la plante *Cléome arabica* ont été évalué *in vivo* et *in vitro*.

3.1. Extraction et dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Avant d'entamer l'extraction, la plante a été séchée à l'ombre, puis rendue sous forme de poudre. En effet, l'utilisation d'un matériel végétal sec est recommandée afin d'éviter la dégradation enzymatique de certains composants comme les flavonoïdes glycosides qui se dégradent facilement en cas d'un matériel frais ou non séché. En outre, le séchage inhibe la fermentation bactérienne qui peut être une cause directe de cette dégradation. De même, le séchage de la plante à l'ombre prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et protège la plante contre les radiations ultraviolettes de la lumière solaire (Sarker et al., 2005).

Dans ce travail, l'extraction des polyphénols et des flavonoïdes contenus dans la poudre des feuilles de *Cléome arabica*, est réalisée en utilisant une méthode spécifique à ces fins, la méthode de markham (1982). Elle consiste à utiliser un système d'extraction méthanol/eau suivie d'acétate d'éthyle et qui a permis d'obtenir un précipité jaune. La lyophilisation de ce précipité donne une poudre sèche et très légère, qui sera conservée dans des flacons opaques à température ambiante.

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes contenus dans le précipité jaune, en utilisant les méthodes Folin-Ciocalteu et trichlorure d'ammonium respectivement, montre sa richesse en polyphénols, surtout en flavonoïdes. Ce résultat s'accorde avec les résultats d'autres travaux qui ont confirmé que la plante *Cléome arabica* est riche en ces composés phénoliques (Bouriche et al., 2003; Ismail et al., 2005; Djeridane et al., 2010).

3.2. Activité anti-oxydante de l'EFCA

Le taux de radicaux libres augmente considérablement en cas d'inflammation et en cas d'exposition à des sources exogènes, comme les polluants, le tabac, certains médicaments et les rayonnements. Comme ils peuvent provoquer le cancer via l'induction de mutations, l'oxydation des lipides et des protéines cellulaires et en modifiant les voies

de transduction du signal. Il est connu que le développement des cellules néoplasiques passe par les étapes d'initiation, de promotion et de progression. Les radicaux libres peuvent agir à la fois comme initiateur et promoteur des tumeurs en endommageant les macromolécules cellulaires et en agissant comme inducteur de molécules de signalisation cellulaire. Inversement, certains antioxydants sont anti-promoteurs et anti-cancérogènes. Des études épidémiologiques humaines ont indiquées que le taux des radicaux libres augmente avec la progression clinique de certains cancers et que l'adoption d'un régime alimentaire riche en antioxydants réduit le risque de certains cancers (Greenwald et al., 2001). En effet, il est connu que le régime méditerranéen, riche en ces composés est associé à une protection contre diverses pathologies (Stoclet & Schini-Kerth, 2011). L'étude de Mantovani et al., (2004) montre que certains antioxydants alimentaires peuvent avoir un potentiel comme adjuvant dans le traitement du cancer en contribuant à la réduction des effets secondaires néfastes associés au traitement.

Dans cette étude et dans la mesure où le stress oxydant est largement impliqué dans de nombreuses maladies y compris le cancer, la capacité anti-oxydante de l'EFCA a été évaluée *in vitro*. Les résultats obtenus montrent que la richesse de l'EFCA en polyphénols, surtout en flavonoïdes, lui confère la capacité de capter efficacement le radical libre DPPH·. Cet effet scavenger dépasse de loin l'effet de l'anti-oxydant standard BHT. Selon Ismail et ses collaborateurs (2005) les parties aériennes, les feuilles et les tiges, de *Cléome arabica* sont très riches en flavonoïdes glycosylés. Les flavonoïdes sont des composés phénoliques connus par leurs activités anti-oxydantes et antiradicalaires (Montoro et al., 2005; Teixeira et al., 2005; Barreca et al., 2011; Wang et al., 2013). Leur mode d'action est supposé être dû à leur pouvoir de donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons dérivés principalement de leur cycle B (Le et al., 2007).

En outre, Les résultats montrent que l'EFCA contient des composés qui entrent en compétition avec la ferrozine pour chélater le fer ferreux (Fe^{+2}). La capacité chélatrice d'un produit est très importante du fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transition catalyseurs de la peroxydation lipidique *in vivo*. Les métaux de transition comme le fer ferreux (Fe^{+2}), peuvent faciliter la production des espèces réactives de l'oxygène dans les systèmes biologiques. Ainsi, la capacité d'un produit à chélater le fer lui accorde une précieuse capacité antioxydante en retardant l'oxydation catalysée par les métaux (Halliwell & Gutteridge, 1984). Le fer est connu comme le pro-oxydant le plus important des lipides en raison de sa grande réactivité. Ainsi, les produits chélateurs offrent une

protection contre l'endommagement oxydatif des cellules en éliminant les ions Fe^{+2} qui participent dans la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux pyroxyles et alcoxyles qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique (Demirtas et al., 2013). Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes et les acides phénoliques possèdent une remarquable activité chélatrice envers les ions métalliques (Capecka et al., 2005; Le et al., 2007). Ainsi, il a été rapporté par Verdán et ses collaborateurs (2011) que l'effet chélateur de certains flavonols (quercétine, myricétine et morine) est dû en partie à leur pouvoir de fixer les différents métaux comme Fe^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} et Zn^{+2} via leurs groupements hydroxyles des trois cycles. Sachant que les deux groupes: 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C sont les plus intéressants.

L'aptitude d'un composé de donner des électrons lors d'une réaction d'oxydoréduction peut être exploitée pour mesurer son activité anti-oxydante. Cette capacité de donation d'électron est appelée pouvoir réducteur (Le et al., 2007). La mesure du pouvoir réducteur des composés purs ou sous forme d'extrait brut peut se faire par détection spectrophotométrique (à 700 nm) du complexe $(\text{Fe}^{+3})_4[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^{3-}$. Les résultats de ce travail montrent que l'EFCA a exercé un effet réducteur, qui pourrait être dû à sa richesse en composé polyphénoliques. Il est connu que ces molécules servent de bons donneurs d'électrons et d'hydrogènes qui sont dérivées principalement de leur cycle B (Le et al., 2007). En conséquence, ils peuvent mettre fin à la réaction radicalaire en chaîne par conversion des espèces réactives de l'oxygène à des produits plus stables (Rice-Evans et al., 1995). Une étroite corrélation entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes d'un extrait et de son pouvoir réducteur a été rapportée par Ksouri et ses collaborateurs (2009).

3.3. Effet anticancéreux de l'EFCA sur quelques lignées de cellules cancéreuses

La présente étude a montré que l'EFCA a exercé un effet cytotoxique sur toutes les lignées cellulaires cancéreuses étudiées. Toutefois, il faut noter que la réponse des cellules cancéreuses diffère selon la concentration de l'EFCA et la lignée cellulaire. En effet, la lignée cellulaire SK-N-BE est la plus sensible au traitement. A forte concentration (200 $\mu\text{g/ml}$), l'extrait a exercé un effet cytotoxique sur toutes les lignées tumorales. Ainsi, cette

concentration a été utilisée pour évaluer l'effet anticancéreux. Cependant, les concentrations de 5 à 100 $\mu\text{g/ml}$ n'ont aucun effet significatif sur les cellules HeLa. Par contre toutes les autres lignées cellulaires sont sensibles à l'effet de 100 $\mu\text{g/ml}$ de l'EFCA. Un effet biphasique est exercé par l'extrait sur les cellules HeLa, puisqu'à très faible dose (1 $\mu\text{g/ml}$), il stimule la prolifération cellulaire d'une façon significative et semblable à l'effet de l'EGF, contrairement à la dose de 200 $\mu\text{g/ml}$. L'effet biphasique a été déjà signalé pour les flavonoïdes comme la génistéine et la quercétine, ainsi que pour les mélanges flavonoïdiques comme l'Avlimil (Elattar & Virji, 2000; Helferich et al, 2008; El Touny & Banerjee, 2009). Cette dualité dans l'effet est associée à la capacité des flavonoïdes, d'une part d'altérer l'expression de quelques gènes spécifiques, qui peuvent promouvoir la carcinogénèse par leur deméthylation à des concentrations faibles, et d'autre part d'inhiber potentiellement les processus cancérogènes, par activation de la cascade pro-apoptotique à des concentrations élevées (King-Batoon et al., 2008). Les travaux réalisés jusqu'à maintenant suggèrent la possibilité que les flavonoïdes contenus dans l'EFCA peuvent activer des voies similaires dans les cellules HeLa.

La diminution du nombre cellulaires pour les 5 lignées cancéreuses étudiées suite à leur traitement par 200 $\mu\text{g/ml}$ d'extrait pourrait être due soit à l'effet toxique, où les cellules éclatent et meurent par nécrose, ou à l'effet apoptotique où l'EFCA active la machinerie cellulaire responsable du déclenchement de l'apoptose. Afin d'éclaircir la nature de l'effet de l'EFCA sur les lignées cancéreuses étudiées, une analyse de leur cycle cellulaire par cytométrie en flux a été réalisée. Les cellules sont analysées individuellement en utilisant un agent fluorochrome comme le DAPI qui permet de quantifier leur teneur en ADN (l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN de chaque cellule). Toutefois, la cytométrie en flux ne permet pas de distinguer entre les phases G0 et G1, ni entre la phase G2 et la phase M. Donc, cette technique permet de diviser le cycle cellulaire en trois phases selon la teneur des cellules en ADN: i) La phase G0/G1, c'est la phase d'activation de la cellule où la quantité d'ADN =2n. ii) La phase S, c'est la phase de synthèse d'ADN où sa quantité passe de 2n à 4n. iii) La phase G2/M, c'est la phase de mitose ou de division cellulaire où la quantité d'ADN =4n. Par conséquent, l'histogramme obtenu (**Figure 34**) pour chaque lignée cellulaire est caractérisé par la présence de deux pics seulement (Krueger & Wilson, 2011). Cette technique détecte également les cellules dont la quantité d'ADN est inférieure à 2n ou les cellules en phase sous-G1. Ces cellules correspondent aux cellules apoptotiques ou à leurs débris. En outre, les cellules à quantité

d'ADN supérieure à $4n$ peuvent être détectées en fin de diagramme (cellules polyploïdes) et sont généralement les cellules cancéreuses qui présentent ce type d'aberration génétique (Givan, 2011).

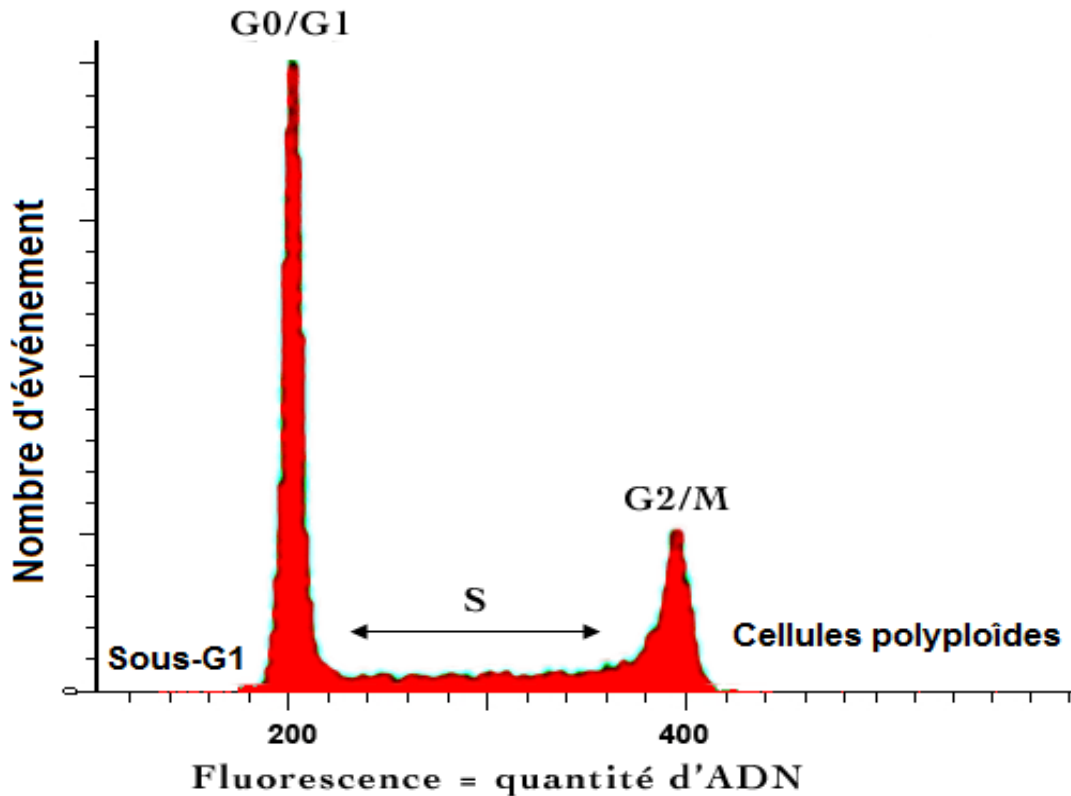


Figure 34: Distribution des cellules dans le cycle cellulaire obtenu par cytométrie en flux après marquage par un agent fluorochrome. Le premier pic représente les cellules en phases G0/G1 ($2n$) et le deuxième pic représente les cellules en phases G2/M ($4n$) car il possède une intensité de fluorescence deux fois supérieure à celle du premier pic. Tandis que, la surface entre les deux pics représente les cellules en phase S (Krueger & Wilson, 2011).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la concentration $200 \mu\text{g/ml}$ de l'EFCA a exercé un effet apoptotique sur toutes les lignées de cellules cancéreuses étudiées. Par conséquent, une accumulation des cellules en phase sous-G1 du cycle cellulaire est observée, résultant de la présence des cellules apoptotiques et/ou de corps apoptotiques avec une quantité d'ADN inférieure à $2n$ ce qui indique une fragmentation de leur ADN. Par contre, la distribution de toutes les lignées cancéreuses (DLD-1, Hep-G2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE) au niveau des autres phases, de G1 à M n'a pas été affectée. L'analyse quantitative des histogrammes, pour déterminer le pourcentage des cellules cancéreuses

traitées par l'EFCA dans la phase sous-G1 en comparaison avec les cellules cancéreuses non traitées qui représentent le contrôle, a montré que la lignée SK-N-BE est la lignée la plus sensible à l'effet du l'EFCA avec un pourcentage 7 fois plus grand que celui du contrôle, suivie de HeLa, MCF-7, DLD-1 et enfin Hep-G2.

L'apoptose est caractérisé par le clivage de l'ADN chromosomique en unités nucléosomiques. Les caspases jouent un rôle important dans ce processus en activant les DNases et en inhibant les enzymes de réparation de l'ADN. Parmi ces dernières, la PARP, qui est une importante enzyme de réparation de l'ADN, représente une des premières protéines identifiées comme substrat des caspases, notamment la caspase-3 (Katiyar et al., 2011). La protéine PARP possède un poids moléculaire de 115 kDa, après son clivage par la caspase-3, un fragment de 86 kDa inactif est obtenu (Smith, 2001).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les concentrations 100 et 200 µg/ml de l'EFCA augmentent le niveau de la bande de la caspase-3 active qui possède un poids moléculaire de 17 kDa, ainsi que celui de la bande de la protéine PARP clivée (86 kDa) au niveau de toutes les lignées cancéreuses étudiées. Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes, dérivés des plantes médicinales ou de l'alimentation, activent l'apoptose au niveau des différentes lignées cancéreuses via l'activation des caspases, notamment la caspase-3 suivie du clivage du PARP (Ramos, 2007; Park et al., 2008; Hu et al., 2009).

Plusieurs travaux ont également indiqué que les polyphénols dérivés des plantes médicinales, principalement les flavonoïdes, exercent un effet protecteur chez les êtres humains contre plusieurs pathologies dégénératives comme le cancer (Virgili & Marino, 2008; Marino et al., 2011). En effet, il a été suggéré que les effets protecteurs des flavonoïdes d'origine alimentaires contre le cancer sont basés sur leur capacité d'empêcher l'insurrection de micro-tumeurs et/ou d'activer directement l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Surh, 2003; Béliveau & Cingras, 2004). Il a été montré que la quercétine et la naringénine possèdent une forte activité pro-apoptotique contre certaines lignées de cellules cancéreuses (Galluzzo et al., 2009; Bulzomi et al., 2010, 2012).

Il est connu que les cellules des mammifères sont sérum-dépendantes et ne peuvent pas vivre longtemps dans un milieu dépourvu en cet élément vital. Par conséquent, la technique de privation de sérum est très utilisée pour l'étude de la croissance cellulaire et sa régulation (Jiang & Xu, 1998).

Les résultats de cette étude montrent que l'EFCA est capable d'activer la cascade pro-apoptotique au niveau de toutes les lignées tumorales étudiées. Toutefois, ces données ne précisent pas si le pré-traitement de ces cellules par l'EFCA peut prévenir ou non la prolifération anarchique induite par les substances mitogènes. A cet effet, l'augmentation du sérum à 10 % après une période de privation a provoqué l'augmentation du nombre cellulaire d'une façon remarquable. De même, l'EGF a encore augmenté le nombre de cellules dans toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées. Cependant, le traitement par l'EFCA a diminué le nombre de toutes les lignées cancéreuses étudiées d'une façon significative à la fois après augmentation du taux du SVF et en présence d'EGF. Ces résultats s'accordent avec plusieurs autres travaux qui ont montré que les flavonoïdes peuvent inhiber la croissance des cellules tumorales suite à la réduction de l'activité du récepteur d'EGF (Gu et al., 1999). De même, Lee et ses collaborateurs (2004) ont indiqué que la quercétine et la lutéoline, peuvent diminuer la quantité basale des protéines phosphotyrosines, ainsi que leur stimulation par l'EGF.

Dans les mêmes conditions expérimentales, l'EFCA a augmenté le niveau d'activité de la caspase-3 et le clivage du PARP. Ces résultats expliquent l'effet protecteur de l'EFCA dans toutes les lignées cellulaires cancéreuses étudiées. Par conséquent, l'EFCA peut jouer le rôle d'un agent préventif du cancer et aussi d'un agent curatif après l'installation du cancer.

Pour évaluer les mécanismes à l'origine des effets pro-apoptotiques de l'EFCA dans les cellules cancéreuses, l'état d'activation des protéines de la survie cellulaire AKT et ERK, qui jouent un rôle très important dans la progression de la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi que le taux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ont été étudiés dans 5 lignées cancéreuses (DLD-1, HepG2, MCF-7, HeLa et SK-N-BE).

La compréhension des voies de la transduction du signal intracellulaire à l'état physiologique normal, ainsi que à l'état du cancer est un facteur nécessaire pour trouver un remède efficace et spécifique qui vise une molécule bien précise responsable de la multiplication anarchique de la cellule cancéreuse et qui provoque sa résistance à l'apoptose. Parmi les voies de la transduction du signal intracellulaire qui jouent un rôle important dans la transmission du signal à partir de la membrane cellulaire la voie : Ras/Raf/MEK/ERK et la voie Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR (Steelman et al., 2011). L'élévation de la phosphorylation des composants de ces voies est souvent associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer ou de vieillissement prématuré

(McCubrey et al., 2008; McCubrey et al., 2009; Martelli et al., 2010; Korotchkina et al., 2010). De même, l'expression accrue de ces voies peut être corrélée avec une altération de la sensibilité de certains cancéreux au traitement en comparaison avec les patients qui ne présentent pas une expression élevée (McCubrey et al., 2008; McCubrey et al., 2009; Martelli et al., 2010). Par conséquent, l'inhibition de Raf, MEK, PI3K, Akt et mTOR peut s'avérer utile dans le traitement du cancer, ainsi que dans la prévention du vieillissement cellulaire. Ces observations ont poussé l'industrie pharmaceutique à développer des inhibiteurs qui ciblent les composants clés de ces voies (Steelman et al., 2011). L'activation de ces deux voies nécessite la fixation du facteur de croissance sur son récepteur spécifique de type tyrosine kinase (Steelman et al., 2011). Puis, une cascade de réaction d'activation est déclenchée à l'intérieur de la cellule cible. Il est à noter que l'ERK et l'Akt peuvent phosphoryler quelques facteurs de transcriptions qui ont un effet sur la transcription des gènes de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bad, Bim et autres), ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'apoptose (McCubrey et al., 2008; Martelli et al., 2010; Dijkers et al., 2000; Qi et al., 2006; Steelman et al., 2011).

Dans la présente étude, l'EGF a stimulé la phosphorylation des protéines AKT et ERK, au niveau de toutes les lignées cancéreuses étudiées et a augmenté le taux de la protéine anti-apoptotiques Bcl-2. Le pré-traitement des cellules cancéreuses par l'EFCA n'a pas affecté le taux des protéines ERK et AKT totales. Mais, il a réduit fortement le taux des protéines phosphorylées: P-ERK et P-AKT ainsi que le taux de la protéine Bcl-2. Plusieurs études ont montré que les extraits de plantes médicinales, riches en composés phénoliques, peuvent interférer avec les voies de la transduction du signal intracellulaire en bloquant la prolifération anarchique des cellules cancéreuses. Les flavonoïdes exercent leurs effets biologiques en modulant les différentes voies de transduction du signal intracellulaire à savoir les voies PI3K-Akt, MAPK NF- κ B et EGF (D'Autreaux & Toledano, 2007; Ichimatsu et al., 2007; Kaur et al., 2008; Yoshida et al., 2008). En effet, il a été rapporté que la rutine possède un effet inhibiteur vis-à-vis PI3K γ (Selloum et al., 2001). Scheck et ses collaborateurs (2006) ont indiqué que l'extrait de *Scutellaria baicalensis*, riche en flavonoïdes, inhibe la protéine kinase « ERK ». De même, il a été montré que la quercétine est un inhibiteur très puissant vis-à-vis d'un très grand nombre d'enzymes nécessitant de l'ATP, y compris la PI₄ kinase (Nishioka et al., 1989), la PKC (Gschwendt et al., 1983), et l'EGFR, tyrosine kinase (Levy et al., 1984).

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que l'apport alimentaire élevé en polyphénols est associée à une diminution du risque de certaines maladies à savoir le cancer, les maladies cardiovasculaires (Kuriyama et al., 2006; Vauzour et al., 2010), et les maladies neurodégénératives (Checkoway et al., 2002). En effet, les flavonoïdes représentent la classe des polyphénols la plus étudiée, dont plusieurs travaux ont rapporté l'existence d'un lien très fort entre ces molécules et les effets bénéfiques observés chez l'être humains et les animaux (Schroeter et al., 2001; Vauzour et al., 2010). IL a été rapporté que les polyphénols peuvent interagir avec les voies de signalisation, ainsi que avec la machinerie qui contrôlent les fonctions cellulaires, à la fois, sous les conditions normales et pathologiques (Vauzour et al., 2010). Les flavonoïdes exercent leurs effets anticancérigènes via plusieurs processus à savoir leur capacité d'induire l'apoptose dans les cellules tumorales (Fabiani et al., 2002; Mantena et al., 2006; Fini et al., 2008), d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (Wang et al., 2000; Corona et al., 2009), et d'empêcher l'angiogenèse et l'invasion des cellules tumorales (Piao et al., 2006).

A l'issue de toutes les informations citées précédemment sur les voies de la transduction du signal intracellulaire et les effets biologiques, préventif et apoptotique des polyphénols, y compris les flavonoïdes, un schéma récapitulatif est proposé afin d'éclaircir le mécanisme d'action de l'EFCA, riche en polyphénols et en flavonoïdes, sur les lignées cancéreuses étudiées (**Figure 35**).

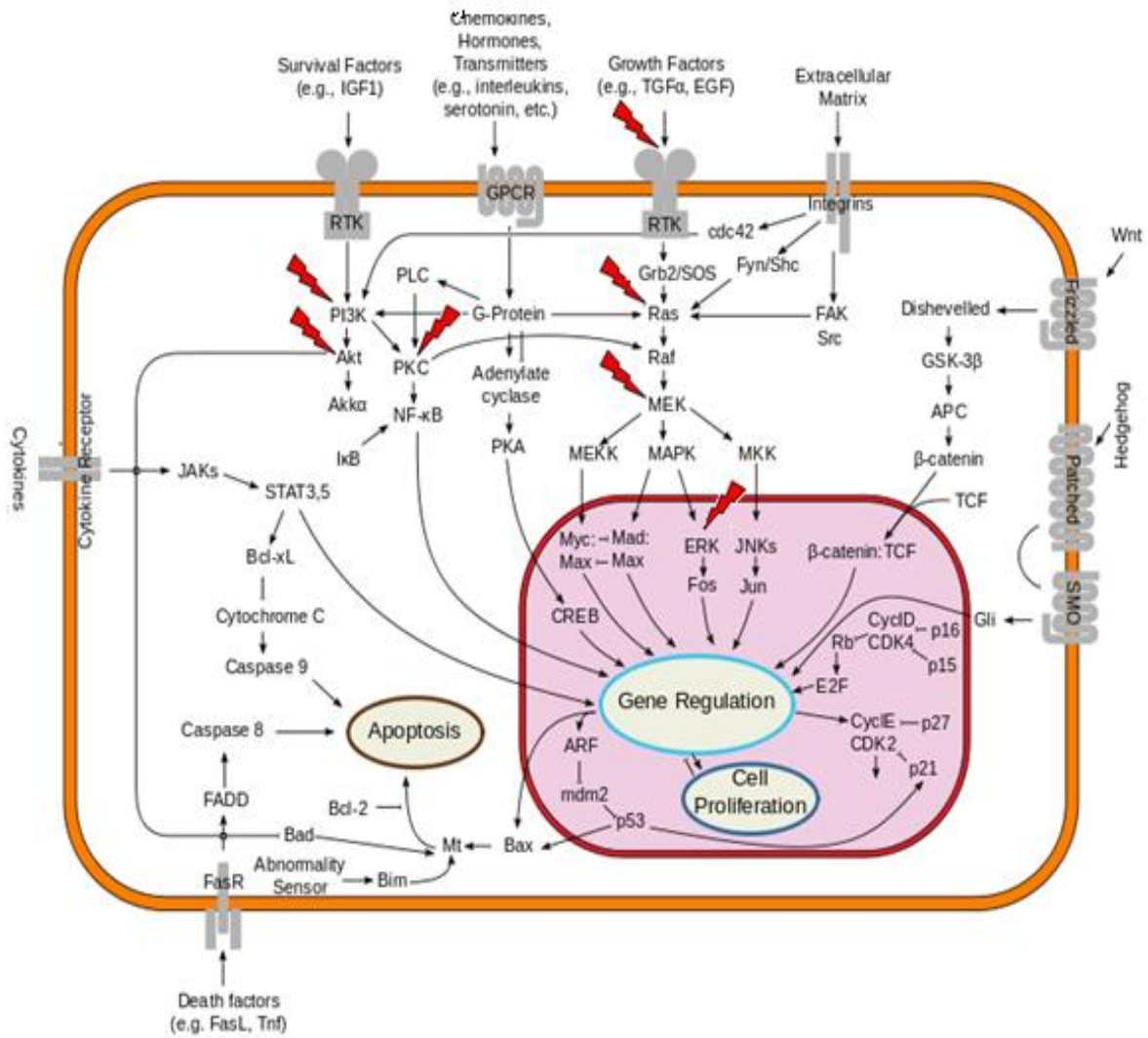


Figure 35: Schéma présentant le mécanisme moléculaire de la transduction du signal intracellulaire (Hanahan & Weinberg, 2000) sur lequel ont été mentionnés les sites d'action probables (⚡) de l'EFCA qui sembleraient être directement ou indirectement responsables de son effet préventif et apoptotique.

3.4. Effet hémato-protecteur de l'EFCA contre la toxicité de l'AraC chez la souris

La formule de numération sanguine des souris a montré que la concentration de 50 mg/kg d'AraC a exercé une remarquable toxicité envers les globules blancs et les globules rouges, en comparaison avec le témoin non traité. En effet, plusieurs études ont indiqué que l'AraC, en plus de sa toxicité envers les cellules cancéreuses, exerce une toxicité sur toutes les cellules à division rapide à savoir les cellules de la moelle osseuse (cellules du système hématopoïétique), les cellules du tube digestive y compris les cellules intestinales, les cellules des organes de reproduction, les cellules pilaires et les cellules fœtales ce qui explique ses effets secondaires néfastes (Lechat et al., 1982; Cohen, 1997).

Gmeiner et ses collaborateurs (1998) ont prouvé que la substitution de la desoxycytidine par l'AraC qui s'incorpore dans le brin d'ADN en cours de réplication, inhibe l'extension des fragments d'Okazaki. Par conséquent, elle empêche l'élongation de l'ADN ce qui déclenche la mort de la cellule. D'autres études ont montré que l'AraC et ses métabolites AraCTP et AraUMP provoquent la mort programmée des cellules par différents mécanismes. En effet, l'incorporation de l'AraCTP dans l'ADN inhibe sa réplication et l'incorporation de l'AraUMP dans l'ARN inhibe sa transcription. De même, l'AraC peut inhiber les ADN polymérase α et β et empêcher les mécanismes de réparation (Braess et al., 1999). Une autre étude a indiqué que l'AraC active certaines voies de signalisation telle que les voies de la PKC et du MAPK (Kharbanda et al., 1994), et inhibe d'autres voies comme les voies AP-1 et NF- κ B (Brach et al., 1992 a, b). Sreenivasan et ses collaborateurs (2003) ont montré également que l'AraC induit l'apoptose au niveau des cellules qui expriment le NF- κ B qui est connu pour son activité inductrice de leur prolifération et inhibitrice de leur l'apoptose. En outre, Kanno et ses collaborateurs (2004), ont montré que l'AraC peut utiliser un autre mécanisme pour induire l'apoptose au niveau des cellules cibles en utilisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans cette étude, on suggère que la diminution du nombre des globules rouges est due principalement aux effets néfastes des ROS. En effet, les globules rouges sont très vulnérables à l'oxydation à cause de leur rôle dans le transport de l'oxygène et de leur circulation dans le sang à proximité des différentes substances chimiques toxiques qui peuvent exister soit dans l'alimentation ou dans les médicaments (Kanno et al., 2004). L'oxydation des globules rouges peut survenir dans les différents endroits cellulaires y compris la membrane

lipidique, les protéines des chaînes de la globine, ou les protéines du cytosquelette et aussi au niveau du fer de l'hémoglobine. Cette oxydation provoque une difformité cellulaire et augmente la perméabilité des globules rouges aux cations comme les K^+ ce qui provoque leurs gonflements puis leurs morts par hémolyse. Les globules rouges qui ont échappé à l'hémolyse, restent fragiles et se détruisent en passant à travers les vaisseaux de la microcirculation au niveau splénique et vont être éliminés par les macrophages (Kanno et al., 2004; Cimen, 2008).

Les résultats de cette étude ont montré également que l'administration par voie intrapéritonéale de L'EFCA ou de la rutine, 100 mg/kg/jour pendant 6 jours n'a exercé aucun effet cytotoxique envers tous les composants du sang.

La combinaison entre EFCA/AraC ou la rutine/AraC a montré que l'EFCA et la rutine ont protégé les globules rouges contre une véritable cytotoxicité. Par conséquent, la quantité d'hémoglobine et le pourcentage d'hématocrite ont resté proches de ceux du témoin non traité. Ces résultats s'accordent avec les résultats de Lahouel et ses collaborateurs (2004) qui ont démontré que les flavonoïdes extraits à partir de la propolis exercent un effet protecteur vis-à-vis de la toxicité hématologique provoquée par une chimiothérapie à base de vinblastine ou de cyclophosphamide. Navoda et ses collaborateurs (2007) ont rapporté que les flavonoïdes, malgré leurs effets préventifs contre la toxicité de la chimiothérapie anticancéreuse envers les cellules normales, peuvent accentuer l'effet toxique de la chimiothérapie envers les cellules tumorales.

Selon les résultats de ce travail, l'EFCA possède une remarquable activité antioxydante. Or, l'effet chimioprotecteur de l'EFCA, riche en flavonoïdes glycosylés, envers les globules rouges est dû principalement à son effet antioxydant. Il est connu que les anti-oxydants, comme les flavonoïdes, bloquent la production des ROS provoqué par l'AraC en inhibant leurs effets apoptotiques et cytotoxiques (Kanno et al., 2004). Fiorani et ses collaborateurs (2003) ont montré que les globules rouges possèdent la capacité de stocker les flavonoïdes dans leur cytoplasme, ce qui conduit à leur protection.

L'élévation de la température corporelle est l'un des effets de l'AraC chez les animaux et même chez l'homme. Cela est probablement due à la diminution du nombre des globules blancs ce qui favorise les infections et provoque un déséquilibre dans le système immunitaire (Lechat et al., 1982; Cohen, 1997). L'effet antipyrétique de l'EFCA observé dans cette étude est dû certainement à son pouvoir anti-inflammatoire. Selon Bouriche et

ses collaborateurs (2005), l'EFCA et la rutine inhibent la lipooxygénase, une enzyme qui intervient dans le processus inflammatoire en transformant l'acide arachidonique en leucotriènes. Aussi, ils inhibent la formation de la prostaglandine E₂ et le leucotriène B₄ (LTB₄), un agent chimioattractant très puissant pour les neutrophiles. Le LTB₄ et les prostaglandines sont responsables des 4 signes de l'inflammation (rougeur, chaleur, douleur et œdème), ce qui peut expliquer l'effet antipyrétique de l'EFCA.

Cette étude a été consacrée à l'évaluation des activités anti-oxydante, anticancéreuse et hématoprotectrice d'un extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, obtenu à partir des feuilles de *Cléome arabica*.

L'effet antioxydant de l'extrait estimé *in vitro* via l'utilisation des tests du DPPH[•], de la chélation du fer ferreux et du pouvoir réducteur a été significativement intéressant.

L'activité anticancéreuse de l'extrait a été explorée en utilisant 5 lignées de cellules cancéreuses qui représentent les cancers humains les plus répondeurs (HeLa, HepG2, MCF-7, DLD-1 et SK-N-BE). L'extrait a induit une diminution significative et dose dépendante du nombre de cellules cancéreuses. L'examen de la distribution du cycle cellulaire a montré une accumulation des cellules cancéreuses en phase sous-G1, ce qui indique leur entrée en apoptose. En plus, les résultats du western blot, ont montré une élévation du taux de la caspase-3 activée et du PARP clivée. Ces résultats indiquent que l'extrait de *Cléome arabica* a exercé un effet apoptotique via l'activation des caspases. La question qui reste posée est si cet extrait a le pouvoir d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses induite par les agents mitogènes tels que les facteurs de croissance comme l'EGF et par la réduction/augmentation du sérum. Pratiquement, l'extrait étudié a fait diminuer le nombre des cellules cancéreuses d'une manière significative en présence et en l'absence de l'agent mitogène. Une augmentation du taux de la caspase-3 et une diminution du taux de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ainsi que ceux des protéines AKT phosphorylées et ERK phosphorylées, sont observées. Par conséquent, l'extrait peut jouer le rôle d'un agent préventif et aussi d'un agent curatif après l'installation du cancer.

L'effet hématoprotecteur de l'extrait est évalué *in vivo* vis à vis la toxicité hématologique provoquée par le médicament anticancéreux AraC en utilisant des souris Balb C. L'administration sous cutanée de l'extrait a considérablement protégé les globules rouges des souris. En effet, leurs nombres, ainsi que le taux d'hémoglobine et le pourcentage d'hématocrite, sont comparables avec ceux du groupe témoin. Cependant, une protection négligeable des globules blancs est observée. De même, l'effet antipyrétique de l'extrait est également confirmé. Sachant que les mêmes résultats sont obtenus avec la rutine (flavonoïde glycosylé).

Malgré les résultats obtenus dans cette étude, d'autres études restent nécessaires à savoir l'étude et l'identification des différentes fractions de l'extrait brut des feuilles de *Cléome arabica* pour bien approfondir les connaissances sur les différents flavonoïdes pourvus de ces activités biologiques et aussi pour cerner d'une manière plus fine les

différentes actions possibles de ces composés et leur synergie. De même, des études approfondies *in vivo* en utilisant des souris nues (nude mice) greffées par des tumeurs des cancers humains sont souhaitées pour aboutir à l'application des molécules isolées de cette plante comme alternative aux molécules chimiques à effets indésirables.

- Adams, J.M., Cory, S., 2001. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
- Agnantis, N.J., Goussia, A.C., 1999. Apoptose et cancer. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* **183**, 277-287.
- Aimé-Genty, N., La cellule. Dictionnaire encyclopédique. Edition Vuibert (Paris), 1997, 231p.
- Alberts, B., 2003. Apoptose et prolifération. *Nature* **407**, 700-816.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Yuan, J., 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171.
- Ardailou, R., 2002. La thérapie génique : sa place actuelle et son avenir. *La Revue de Médecine Interne* **23**, 679-682.
- Arif, J.M., Al-Hazzani, A.A., Kunhi, M., Al-Khodairy, F., 2004. Novel Marine Compounds: Anticancer or Genotoxic? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2**, 93-98.
- Arts, I.C., Hollman, P.C., Feskens, E.J., 2001. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* **74**, 227-232.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Auckland, A., 2008. Surgery + adjuvant therapy beneficial for cervical cancer. *Inpharma weekly* **1623**, 3.
- August, D.A., Sugarbaker, P.H., Schneider, P.D., 1985. Lymphatic dissemination of hepatic metastases. Implications for the follow-up and treatment of patients with colorectal cancer. *Cancer* **55**, 1490-1494.
- Baba Aissa, F., Encyclopédie des plantes utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb. Edition Librairie Moderne Rouiba (Alger), 2000, 368p.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C., Pinkas, M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung* **46**, 1086-1089.
- Barinaga, M., 1997. Designing therapies that target tumor blood vessels. *Science* **275**, 482-484.
- Barinaga, M., 1998. Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* **281**, 1303-1304.
- Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., Kumquat, G.G., 2011. *Fortunella japonica* Swingle juice : Flavonoïd distribution and antioxidant properties. *Food Research International* **44**, 2190-2197.
- Basile, A., Biziato, D., Sherbet, G.V., Comi, P., Cajone, F., 2008. Hyperthermia inhibits cell proliferation and induces apoptosis : Relative signaling status of P53, SI 00A4, and Notch in heat sensitive and resistant cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry* **103**, 212.
- Béliveau, R., Gingras, D., 2004. Green tea: Prevention and treatment of cancer by nutraceuticals. *Lancet* **364**, 1021-1022.
- Béliveau, R., Gingras, D., 2007. Role of nutrition in preventing cancer. *Canadian Family Physician* **53**, 1905-1911.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuno, A., Del Rio, J.A., 1997. Uses and properties of Citrus flavonoids. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **45**, 4505-4515.

- Beniston, N.W., Fleurs d'Algérie. Edition Entreprise National du Livre (Algérie), 1984, 359p.
- Bernardi, P., Rasola, A., 2007. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Sub-Cellular Biochemistry* **45**, 481-506.
- Bershtein, L., Poroshina, T., Zimarina, T., Tsyrlina, E., Zhil'tsova, E., Kovalevskii. A., Semiglazov. V., 2004. Expression of estrogen receptors-I and -A, in primary breast neoplasms and tumors exposed to neoadjuvant hormonal therapy. *Bulletin of Experimental Biology & Medicine* **138**, 494-496.
- Berstein, L.M., Santen. R., 2008. Innovative endocrinology of cancer. *In Advances in Experimental Medicine & Biology*, 630.
- Bettaieb, A., 2009. Mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C. *Thèse de Doctorat en Biologie, Université du Québec, Montréal.*
- Bicknell, G. R., Cohen, G. M., 1995. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **207**, 40-47.
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Bokkenheuser, V.D., Winter, J., 1988. Hydrolysis of flavonoïds by human intestinal bacteria. *In progress in Clinical and Biological Research*. **280**, 142-145.
- Boldin, M.P., Varfolomeev, E.E., Pancer, Z., Mett, I.L., Camonis, J.H. Wallach, D., 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 7795-7798.
- Bosetti, C., Spertini, L., Parpinel, M., Gnagnarella, P., Lagiou, P., Negri, E., Franceschi, S., Montella, M., Peterson, J., Dwyer, J., Giacosa, A., La Vecchia, C., 2005. Flavonoïds and breast cancer risk in Italy. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **14**, 805-808.
- Boumela, Y., Guillemain, J., Guérin, F., Aouacheria A., 2009. Les régulateurs d'apoptose de la famille Bcl-2 dans les gamètes et lors du développement embryonnaire précoce. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* **37**, 720-732.
- Boumendjel, A., Pietro, A.D., Dumontet, C., Barron, D., 2002. Recent Advances in the Discovery of Flavonoïds and Analogs with High-Affinity Binding to P-Glycoprotein Responsible for Cancer Cell Multidrug Resistance. *Medicinal Research Reviews* **22**, 512-529.
- Bouriche, H., Miles, E.A., Selloum L., Calder, P.C., 2005. Effect of *Cleome arabica* leaf extract, rutin and quercetin on soybean lipoxygenase activity and on generation of inflammatory eicosanoids by human neutrophils. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids* **72**, 195-201.
- Bouriche, H., Selloum, L., Tigrine, C., Boudoukha, C., 2003. Effect of *Cleome Arabica* Leaf Extract on Rat Paw Oedema and Human Neutrophil Migration. *Pharmaceutical Biology* **41**, 10-15.
- Brach, M.A., Herrmann, F., Kufe, D.W., 1992a. Activation of A-1 transcription factor by arabinofuranosylcytosine in myloid leukemia cells. *Blood* **79**, 728-734.
- Brach, M.A., Kharbanda, S.M., Herrmann, F., Kufe, D.W., 1992b. Activation of the transcription factor kappa B in human KG-1myloid leukemia cells treated with 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Molecular Pharmacology* **14**, 60-63.
- Braess, J., Wegendt, C., Feuring-Buske, M., Riggert, J., Kern, W., Hiddemann, W., Schleyer, E., 1999. Leukaemic blasts differ from normal bone marrow mononuclear cells and CD34+ haemopoietic stem cells in their metabolism of cytosine arabinoside. *British Journal of Haematology* **105**, 388-393.

- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C., Rice-Evans, C., 1998. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions. *Biochemical Journal* **330**, 1173-1178.
- Brown, J.P., 1980. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Research* **75**, 243-277.
- Bruneton, J., Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Edition Tec & Doc (Paris), 2009, 1268p.
- Buja, L.M., Vela, D., 2008. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovascular Pathology* **17**, 349-374.
- Bulzomi, P., Bolli, A., Galluzzo, P., Leone, S., Acconcia, F., Marino, M., 2010. Naringenin and 17beta-estradiol coadministration prevents hormone-induced human cancer cell growth. *IUBMB life* **62**, 51-60.
- Bulzomi, P., Galluzzo, P., Bolli, A., Leone, S., Acconcia, F., Marino, M., 2012. The pro-apoptotic effect of quercetin in cancer cell lines requires ERb-dependent signals. *Journal of Cellular Physiology* **227**, 1891-1898.
- Burkill, H.M., The useful plants of west tropical Africa, (Families A-D), 2nd ed, Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 1985, 980p.
- Bursch, W., Ellinger, A., 2005. Autophagy a basic mechanism and a potential role for neurodegeneration. *Folia Neuropathologica* **43**, 297-310.
- Campisi, J., 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biology* **11**, 27-31.
- Capecka, E., Mareczek, A., Leja, M., 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chemistry* **93**, 223-226.
- Chabner, B.A., Allegra, C.J., Curt, G.A., Calabresi, P., Médicaments anticancéreux. In: Goodman & Gilman. Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, 9^{ème} ed. McGraw-Hill International (UK), 1998, 1677p.
- Chabner, B.A., Roberts, T.G.Jr., 2005. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nature Reviews of Cancer* **5**, 65-72.
- Checkoway, H., Powers, K., Smith-Weller, T., Franklin, G.M., Longstreth, W.T.Jr., Swanson, P.D., 2002. Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake. *American Journal of Epidemiology* **155**, 732-738.
- Chen, D., Dou, Q.P., 2008. Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* **9**, 1196-1206.
- Chinnaiyan, A.M., Orourke, K., Lane, B.R., Dixit, V.M., 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.
- Choi, H.J., Kim, J.H., Lee, C.H., Ahn, Y.J., Song, J.H., Baek, S.H., Kwon, D.H., 2009. Antiviral activity of quercetin 7-rhamnoside against porcine epidemic diarrhea virus. *Antiviral Research* **77**-81.
- Cimen, M.Y.B., 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta* **390**, 1-11.
- Clarke, P.G., Posada, A., Primi, M.P., Castagne, V., 1998. Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **52**, 356-362.
- Cohen, Y., Abrégés: Pharmacologie. 4^{ème} ed, Masson (Paris), 1997, 466p.

- Corona, G., Deiana, M., Incani, A., Vauzour, D., Dessi, M.A., Spencer, J.P., 2009. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**, 897-903.
- Cova, D., De Angelis, L., Giavarini, F., Palladini, G., Perego, R., 1992. Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy & Toxicology* **30**, 29-33.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Domigne, C., Rémésy, C., 1999. Part of quercetin absorbed in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology* **40**, G120-G126.
- Cuervo, A.M., Bergamini, E., Brunk, U.T., Droge, W., French, M., Terman, A., 2005. Autophagy and aging : the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* **1**, 131-140.
- D'Autreaux, B., Toledano, M. B., 2007. ROS as signalling molecules : mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 813-824.
- Dacosta, Y., Les phytonutriments bioactifs. Edition Yves Dacosta (Paris), 2003, 317p.
- Day, A.J., Williamson, G., 1999. Human metabolism of dietary quercetin glycosides. *Basic Life Science* **66**, 415-434.
- De Barros, M.P., Lemos, M., Maistro, E.L., Leite, M.F., Sousa, J.P.B., Bastos, J.K., de Andraded, S.F., 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **120**, 372-377.
- De Groot, H., Rauen, U., 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoïds. *Fundamental Clinical Pharmacology* **12**, 249-255.
- Demirtas, I., Erenler, R., Elmastas, M., Goktasoglu, A., 2013. Studies on the antioxidant potential of flavones of *Allium vineale* isolated from its water-soluble fraction. *Food Chemistry* **136**, 34-40.
- Dennis, W., Granovsky, M., Warren, C.E., 1999. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochimica & Biophysica Acta* **1473**, 21-34.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., Coffey, P.J., 2000. Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current Biology* **10**, 1201-1204.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C., Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 161-169.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J.M., Stocker, P., 2010. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food & Chemical Toxicology* **48**, 2599-2606.
- Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A., 1997. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *American Journal of Pathology* **151**, 1205-1213.
- Durgo, K., Vuković, L., Rusak, G., Osmak, M., Franekić Čolić, J., 2007. Effects of Flavonoïds on Glutathione Level, Lipid Peroxidation and Cytochrome P450 CYP1A1 Expression in Human Laryngeal Carcinoma Cell Lines. *Food Technology & Biotechnology* **45**, 69-79.
- Earnshaw, W.C., 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 337-343.

- Edinger, A.L., Thompson, C.B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 663-669.
- El Touny L.H., Banerjee, P.P., 2009. Identification of a biphasic role for genistein in the regulation of prostate cancer growth and metastasis. *Cancer Research* **69**, 3695-3703.
- Elattar, T.M., Virji, A.S., 2000. The inhibitory effect of curcumin, genistein, quercetin and cisplatin on the growth of oral cancer cells *in vitro*. *Anti-cancer Research* **20**, 1733-1738.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**, 495-516.
- Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G.F., Morozzi, G., 2002. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention* **11**, 351-358.
- Fajardo, E., Geller, T., Koenig, H.M., et Kleine, M. L., 1982. Chronic meningitis, polyarthritis, lymphadenitis, and pulmonary hemosiderosis. *The Journal of pediatrics* **1**, 738-740.
- Farnsworth, N.K., Kass, C.J., 1986. An approach utilizing information from traditional medicine to identify tumor inhibiting plants. *Bulletin de l'OMS* **66**, 159.
- Feldmann, G., 1999. L'apoptose. *Annales pharmaceutiques françaises* **57**, 291-308.
- Fini, L., Hotchkiss, E., Fogliano, V., Graziani, G., Romano, M., De Vol, E.B., Qin, H., Selgrad, M., Boland, C.R., Ricciardiello, L., 2008. Chemopreventive properties of pinoresinol-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* **29**, 139-146.
- Fink, B.N., Steck, S.E., Wolff, M.S., Britton, J.A., Kabat, G.C., Gaudet, M.M., Abrahamson, P.E., Bell P., Schroeder, J.C., Teitelbaum, S.L., Neugut, A.I., Gammon, M.D., 2007. Dietary flavonoid intake and breast cancer survival among women on Long Island. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **16**, 2285-2292.
- Fiorani, M., Accorsi, A., Cantoni, O., 2003. Human red blood cells as a natural flavonoids reservoir. *Free Radical Research* **37**, 1331-1338.
- Flasshove, M., Strumberg, D., Ayscue, L., Mitchell, B.S., Tirier, C., Heit, W., Seeber, S., Schutte, J., 1994. Structural analysis of the deoxycytidinekinase gene in patients with acute myeloid leukemia and resistance to cytosine arabinoside. *Leukemia* **8**, 780-785.
- Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food & Chemical Toxicology* **33**, 1061-1080.
- Froelich, S., Schubert, C., Bienzle, U., Jenett-Siems, K., 2005. In vitro antiplasmodial activity of prenylated chalcone derivatives of hops (*Humulus lupulus*) and their interaction with hemin. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**, 883-887.
- Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M., 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *The American Journal of Clinical Nutrition* **61**, 549-554.
- Galluzzo, P., Martini, C., Bulzomi, P., Leone, S., Bolli, A., Pallottini, V., Marino, M., 2009. Quercetin-induced apoptotic cascade in cancer cells: antioxidant versus estrogen receptor alpha-dependent mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**, 699-708.
- Ganapaty, S., Pannakal, S.T., Srilakshmi, G.V.K., Lakshmi, P., Waterman, P.G., Brun, R., 2008. Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Tephrosia pumila*. *Phytochemistry Letters* **1**, 175-178.

- Garcia-Closas, R., Gonzalez, C.A., Agudo, A., Riboli, E., 1999. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* **10**, 71-75.
- Gardai, S.J., Bratton, D.L., Ogden, C.A., Henson, P.M., 2006. Recognition ligands on apoptotic cells : a perspective. *Journal of Leukocyte Biology* **79**, 896-903.
- Gerber, D.E., 2008. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American Family Physician* **77**, 311-319.
- Givan, A.L., 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods in Molecular Biology* **699**, 1-29.
- Givel, J.C., Langer, I., Demartines, N., 2007. Surgery. *Revue Médicale Suisse* **17**, 116-118.
- Gmeiner, W., Skradis, A., Pon, R.T., Liu, J., 1998. Cytarabine induced destabilization of a model Okazaki fragment. *Nucleic Acids Research* **26**, 2359-2365.
- Green, D.R., 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* **102**, 1-4.
- Greenwald, P., Clifford, C.K., Milner, J.A., 2001. Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer* **37**, 948-965.
- Gross, A., Jockel J., Wei, MC., Korsmeyer, SJ., 1998. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO Journal* **17**, 3878-3885.
- Gschwendt, M., Horn, F., Kittstein, W., Marks, F., 1983. Inhibition of the calcium and phospholipid-dependent protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **117**, 444-447.
- Gu, C., Casaccia-Bonofil, P., Srinivasan, A., Chao, M.V., 1999. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *Journal of Neuroscience* **19**, 3043-3049.
- Güida, M. C., Esteva, M. I., Camino, A., Flawiá, M.M., Torres, H.N., Paveto, C., 2007. *Trypanosoma cruzi* : *In vitro* and *in vivo* antiproliferative effects of epigallocatechin gallate (EGCg). *Experimental Parasitology* **117**, 188-194.
- Gurbuz, I., Yesilada, E., Ito, S. 2009. An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology* **121**, 360-365.
- Guy, D., Organisation et classification des plantes vasculaires: Systématique, Edition Sedes (Paris), 1979, 540p.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants. *Nutrition Reviews* **52**, 253-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* **219**, 1-4.
- Hamdi Cherif, M., Mahnane, A., Laoumri, S., Zaidi, Z., Boukharouba, H., Cherka, D., Rakeb, M., Kara, L., Ayat, A., 2013. Le cancer à Sétif 1986-2010, Algérie: Incidences, tendances et survie. Registre de cancer de Sétif. <http://www.registre-cancer-setif.com/images/frf2.pdf>.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S., 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine* **16**, 845-850.
- Harborne, J. B., Williams, C.A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.

- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* **25**, 585-621.
- Heim, K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., 2002. Flavonoïd antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* **13**, 572-584.
- Helferich, W.G., Andrade, J.E., Hoagland, M.S., 2008. Phytoestrogens and breast cancer: A complex story. *Inflammopharmacology* **16**, 219-226.
- Hengartner, M.O., Bryant, J. A., 2000. Apoptotic cell death: from worms to wombats ... but what about the weeds? *Symposia of the Society for Experimental Biology* **52**, 1-12.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-776.
- Herzig, R.H., Wolff, S.N., Lazarus, H.M., Phillips, G.L., Karanes, C., Herzig, G.P., 1983. High-dose cytosine arabinoside therapy for refractory leukemia. *Blood* **36**, 361-369.
- Hofmann, K., Bucher, P., Tschopp, J., 1997. The CARD domain: a new apoptotic signaling motif. *Trends in Biochemical Sciences* **22**, 155-156.
- Hollman, P.C.H., Devries, J.H.M., Van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J.B., Katan, M.B., 1995. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* **62**, 1276-1282.
- Hollman, P.C.H., Mengelers, M.J.B., Vanrijp, J.H.M. Katan, M.B., 1996. Absorption and disposition. Kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biology & Medicine* **21**, 703-707.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., Zhu, L., Hsueh, A.J., 1997. Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11. *Molecular Endocrinology* **11**, 1858-1867.
- Hu, Y.W., Liu, C.Y., Du C.M., Zhanga, J., Wu, W.Q., Gu, Z.L., 2009. Induction of apoptosis in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells in vitro by flavonoids from *Astragalus complanatus*. *Journal of Ethnopharmacology* **123**, 293-301.
- Ichimatsu, D., Nomura, M., Nakamura, S., Moritani, S., Yokogawa, K., & Kobayashi, S. 2007. Structure-activity relationship of flavonoids for inhibition of epidermal growth factor-induced transformation of JB6 CI 41 cells. *Molecular Carcinogenesis* **46**, 436-445.
- Ismail, I.S., Ito, H., Selloum, L., Bouriche, H., Yoshida, T., 2005. Constituents of *Cleome arabica* leaves and twigs. *Natural Medicine* **59**, 53.
- Jeong, J.H., An, J.Y., Kwon, Y.T., Rhee, J.G., Lee, Y.J., 2009. Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *Journal of Cellular Biochemistry* **106**, 73-82.
- Jiang, S.M., Xu, Z.H., 1998. Serum deprivation enhances DNA synthesis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World Journal of Gastroenterology* **4**, 121-124.
- Jo, K.J., Cha, M.R., Lee, M.R., Yoon, M.Y., Park, H.R., 2008. Methanolic extracts of *Uncaria rhynchophylla* induce cytotoxicity and apoptosis in HT-29 human colon carcinoma cells. *Plant Foods for Human Nutrition* **63**, 77-82.
- Kanno, S., Shouji, A., Hirata, R., Asou, K., Ishikawa, M., 2004. Effects of naringin on cytosine arabinoside (Ara-C)-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *Life Science* **75**, 353-365.
- Kappelmayer, I., Udvardy, M., Antal-Szalmas, P., 2007. Pgp and FLT3 : identification and modulation of

- two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Current Medicinal Chemistry* **14**, 519-530.
- Katiyar, P., Yadav, M., Tiwari, A., 2011. Role of caspase in programmed cell death in multicellular organisms. *International Journal of Biomedical Research* **2**, 422-431.
- Kaufmann, S.H., Mesner, P.W. Jr., Samejima, K., Tone, S., Earnshaw, W.C., 2000. Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. *Methods in Enzymology* **322**, 3-15.
- Kaur, P., Shukla, S., Gupta, S., 2008. Plant flavonoïd apigenin inactivates Akt to trigger apoptosis in human prostate cancer : an in vitro and in vivo study. *Carcinogenesis* **29**, 2210-2217.
- Kelekar, A., Thompson, C.B., 1998. Bcl-2-family proteins : the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends in Cell Biology* **8**, 324-330.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**, 239-257.
- Kerr, J.F.R., 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* **27**, 471-474.
- Kharbanda, S., Emoto, Y., Kisaki, H., Saleem, A., Kufe, D., 1994. 1-beta- D-arabinofuranosyl cytosine activates serine/threonine protein kinase and c-jun gene expression in phorbol ester-resistant myeloid leukemia cells. *Molecular Pharmacology* **46**, 67-72.
- King, R.J.B., Cancer biology. Edition Harlow, Essex (England), 1996, 227p.
- King-Batoon, A., Leszczynska, J.M., Klein, C.B., 2008. Modulation of gene methylation by genistein or lycopene in breast cancer cells. *Environmental & Molecular Mutagenesis* **49**, 36-45.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., 2002. Flavonoïds intake and the risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* **76**, 560-568.
- Korotchkina, L.G., Leontieva, O.V., Bukreeva, E.I., Demidenko, Z.N., Gudkov, A.V., Iagoslony, M.V., 2010. The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging* **2**, 344-352.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, J., Schlesinger, P.H., 2000. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerized BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome C. *Cell Death & Differentiation*. **7**, 1166-1173.
- Kroemer, G., Reed, J.C., 2000. Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* **6**, 513-519.
- Krueger, S.A., Wilson, G.D., 2011. Flow cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. *Methods in Molecular Biology* **731**, 359-370.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C., Abdelly, C., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food & Chemical Toxicology*, **47**, 2083-2091.
- Küpeli, E., Yesilada, E., 2007. Flavonoïds with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology* **112**, 524-530.

- Kuriyama, S., Shimazu, T., Ohmori, K., Kikuchi, N., Nakaya, N., Nishino, Y., Tsubono, Y., Tsuji, I., 2006. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: The Ohsaki study. *Journal of the American Medical Association* **296**, 1255-1265.
- Kurz, T., Terman, A., Brunk, U.T., 2007. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **462**, 220-230.
- La Casa, C., Villegas, I., Alarcon de la Lastra, C., Motilva, V., Martin Calero, M.J., 2000. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 45-53.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J.P., 2004. The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamid and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxidation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie Biologie* **52**, 314-322.
- Le Marchand, L., Murphy, S.P, Hankin, J.H., Wilkens, L.R., Kolonel, L.N., 2000. Intake of flavonoids and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* **9**, 154-160.
- Le, K., Chiu, F., Ng, K., 2007. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry* **105**, 353-363.
- Lechat, P., Lagier, G., Rouveix, B., Vincens, M., Weber, S., Pharmacologie médicale. Edition Masson (Paris), 1982, 764p.
- Lee, J., Koo, N., Min, D.B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety* **3**, 21-33.
- Lefferts, J. A., Bartels, C.L., Tsongalis, G.J., 2008. Molecular oncology: current trends in diagnostics. *Future Oncology* **4**, 61-70.
- Lesser, M., La thérapie des vitamines et de l'alimentation: pour retrouver son équilibre. Collection Une approche holistique de la sante. Editeur Terre vivante (Paris), 1987, 222p.
- Levy, J., Teuerstein, I., Marbach, M., Radian. S., Sharon, Y., 1984. Tyrosine protein kinase activity in the DMBA-induced rat mammary tumor: Inhibition by quercetin. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **123**, 1227-1233.
- Lin, J.P., Yang, J.S., Lu, C.C., Chiang, J.H., Wu, C.L., Lin, J.J., Lin, H.L., Yang, M.D., Liu, K.C., Chiu, T.H., Chung, J.G., 2009. Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response *in vivo*. *Leukemia Research* **33**, 823-828.
- Liotta, L.A., 1992. Cancer cell invasion and metastasis. *Scientific American* **266**, 54-59.
- Lu, C.X., Fan, T.J., Hu, G.B., Cong, R.S., 2003. Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* **35**, 881-885.
- Macdonald, F., Ford, C.H.J., Casson, A.G., Molecular biology of cancer. BIOS Scientific Publishers (Oxford), 2003, 277p.
- Majno, G., Joris, J., 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology* **146**, 3-15.
- Manjili, M.H., Wang, X.Y., Park, J., Macdonald, J.J. Li, Y.R., Van-Schie, C.A.A., Subjeck, J.R., 2002. Cancer immunotherapy: stress proteins and hyperthermia. *International Journal of Hypothermia* **18**, 506-520.

- Mantena, S.K., Baliga, M.S., Katiyar, S.K., 2006. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells. *Carcinogenesis* **27**, 1682-1691.
- Mantovani, G., Madeddu, C., Macciò, A., Gramignano, G., Lusso, M.R., Massa, E., Astara, G., Serpe R., 2004. Cancer-Related Anorexia/Cachexia Syndrome and Oxidative Stress: An Innovative Approach beyond Current Treatment. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **13**, 1651-1659.
- Mareel, M., Leroy, A., 2003. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiological Reviews* **83**, 337-376.
- Margolin, N., Raybuck, S.A., Wilson, K.P., Chen, W., Fox, T., Gu, Y., Livingston, D.J. 1997. Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 7223-7228.
- Marino, M., Masella, R., Bulzomi, P., Campesi, I., Malorni, W., Franconi, F., 2011. Nutrition and human health from a sex-gender perspective. *Molecular Aspects of Medicine* **32**, 1-70.
- Markham, K.R., Technics of flavonoïds identification. Edition Academic press (London), 1982, 113p.
- Martelli, A.M., Evangelisti, C., Chiarini, F., Grimaldi, C., Cappellini, A., Ognibene, A., McCubrey, J.A., 2010. The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochimica & Biophysica Acta* **1803**, 991-1002.
- Martinou, J.C., Green, D.R., 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 63-67.
- Mauri, P.L., Lemoli, L., Gardana, C., Riso, P., Simonetti, P., Porrini, M., Pietta, P.G., 1999. Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **13**, 924-931.
- Maurya, R., Yadav, D.K., Singh, G., Bhargavan, B., Murthy, P.S.N., Sahai, M., Singh M.M., 2009. Osteogenic activity of constituents from *Butea monosperma*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**, 610-613.
- McCarthy, N., 2008. Angiogenesis: Blood born killer? Nature reviews. *Cancer* **8**, 164.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Bertrand, F.E., Ludwig, D.E., Basecke, J., 2008. Targeting Survival Cascades Induced by Activation of Raf/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia* **22**, 708-722.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Chappell, W.H., Russo, S., Ove, R., 2009. Emerging Raf Inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **14**, 633-648.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO Journal* **16**, 2794-2804.
- Meier, P., Finch, A., Evan, G., 2000. Apoptosis in development. *Nature* **407**, 796-801.
- Menabde, G.T., Natroshvili, N.D., Natroshvili, T.D., 2006. Ozonotherapy for the treatment of parodontitis. *Georgian Medical News* **134**, 43-46.
- Mercié, P., Belloc, F., 2001. Mécanismes physiopathologiques et méthodes d'analyse de l'apoptose cellulaire. *Revue de Médecine Interne* **22**, 90-96.

- Meredith, J.E., Schwartz, M.A., 1997. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends in Cell Biology* **7**, 146-150.
- Meyer, J.L., Verhey, J. Xia P. Wong, J., 2007. New technologies in the radiotherapy clinic. *Frontiers in Radiation Oncology* **40**, 1-17.
- Mizuma, T., Awazu, S., 1998. Inhibitory effect of phloridzin and phloretin on glucuronidation of p-nitrophenol, acetaminophen and 1-naphtol: kinetic demonstration of the influence of glucuronidation metabolism on intestinal absorption in rats. *Biochimica & Biophysica Acta* **1425**, 398-404.
- Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., De Tommasi, N., 2005. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry* **92**, 349-355.
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**, 355-365.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., Lowe, S.W., 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703-716.
- Navoda, S., Miadokova, E., Cipak, L., 2007. Flavonoids potentiate the efficacy of cytarabine through modulation of drug-induced apoptosis. *Neoplasma* **54**, 202-206.
- Neurath, M.F., Finotto, S., Fuss, I., Boirivant, M., Galle, P.R., & Strober, W. 2001. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease : to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends in Immunology* **22**, 21-26.
- Nishioka, H., Imoto, M., Sawa, T., Hamada, M., Naganawa, H., Takeuchi, T., Umezawa, K., 1989. Screening of phosphatidylinositol kinase inhibitors from streptomyces. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* **42**, 823-825.
- Nowakowska, Z., 2007. Mini-review, A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 125 -137.
- Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., Sikorska, M., 1993. Apoptotic death in epithelial cells : cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO Journal* **12**, 3679-3684.
- Okada, H., Mak, T.W., 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Reviews Cancer* **4**, 592-603.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of the browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition* **44**, 307-315.
- Ozenda, P., Flore et végétation du Sahara. Edition CNRS (Paris), 1991, 662p.
- Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F., 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from Pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology & Medicine* **27**, 704-724.
- Padilla, E., Ruiz, E., Redondo, S., Gordillo-Moscoso, A., Slowing, K., Tejerina, T., 2005. Relationship between vasodilation capacity and phenolic content of Spanish wines. *European Journal of Pharmacology* **517**, 84-91.
- Park, H.J., Kim, M.J., Ha, E., Chung, J.H., 2008. Apoptotic effect of hesperidin through caspase-3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine* **15**, 147-151.

- Paul, S., Étienne R., 2002. Immunothérapie génique du cancer. *Transfusion Clinique & Biologique* **9**, 301-321.
- Perez-Tomas, R., 2006. Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Current Medicinal Chemistry* **13**, 1859-1876.
- Peter, M.E., Krammer, P.H., 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation* **10**, 26-35.
- Piao, M., Mori, D., Satoh, T., Sugita, Y., Tokunaga, O., 2006. Inhibition of endothelial cell proliferation, *in vitro* angiogenesis, and the down-regulation of cell adhesion-related genes by genistein. Combined with a cDNA microarray analysis. *Endothelium* **13**, 249-266.
- Pietta, P.G., 2000. Flavonoïds as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**, 1035-1042.
- Portet, B., Fabre, N., Roumy, V., Gornitzka, H., Bourdy, G., Chevalley, S., Sauvain, M., Valentin, A., Moulis, C., 2007. Activity-guided isolation of antiplasmodial dihydrochalcones and flavanones from *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. *Phytochemistry* **68**, 1312-1320.
- Procházková, D., Boulová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoïds. *Fitoterapia* **82**, 513-523.
- Prytyk, E., Dantas, A.P., Salomão, K., Pereira, A.S., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Neto, F.R.A. 2005. Flavonoïds and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **88**, 189-193.
- Qi, X.J., Wildey, G.M., Howe, P.H., 2006. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function. *Journal of Biological Chemistry* **28**, 813-823.
- Rakhi, S., Daman, S., Dwarakanath, B.S, Madhu, C., 2011. Inhibition of Human Cervical Cancer Cell Growth by Ethanolic Extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. (Punarnava) Root. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* **2011**, 1-13.
- Ramos, S., 2007. Effects of dietary flavonoïds on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *Journal of Nutritional Biochemistry* **18**, 427-442.
- Rao, Y.K., Fang S.H., Hsieh, S.C., Yeh, T.H., Tzeng, Y.M., 2009. The constituents of *Anisomeles indica* and their anti-inflammatory activities. *Journal of Ethnopharmacology* **121**, 292-296.
- Ray, R.B., Raychoudhuri, A., Steele, R., Nerurkar, P., 2010. Bitter Melon (*Momordica charantia*) Extract Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation by Modulating Cell Cycle Regulatory Genes and Promotes Apoptosis. *Cancer Research* **70**, 1925-1931.
- Remesy, C., Manach, C., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F., 1996. Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Médecine & Nutrition* **32**, 17-27.
- Ricci, J.E., 2000. Rôle de tyrosine kinase p53fyn et des protéines du choc thermique dans l'apoptose induite par l'engagement des récepteurs de mort et du récepteur T. *Thèse de doctorat. Université de Nice-Sophia antipolis*.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoïds. *Free Radical Research*, **23**, 375-383.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoïds and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, **20**, 933-956.

- Rich, T., Stephens, R., Trowsdale, J., 1999. MHC linked genes associated with apoptosis/programmed cell death. *Biochemical Society Transactions* **27**, 781-785.
- Riedl, S.J., Shi, Y., 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Review Molecular Cell Biology* **5**, 897-907.
- Rodriguez, J., Lazebnik, Y., 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & Development* **13**, 3179-3184.
- Rotonda, J., Nicholson, D.W., Fazil, K.M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Ruel, R., Vaillancourt, J.P., Thornberry, N.A., Becker, J.W., 1996. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Structural Biology* **3**, 619-625.
- Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M., Manjeri, A., Venkatachan, M.B., 1999. Apoptosis : definition, mechanisms, and relevance to disease. *American Journal of Medicine*. **107**, 489-506.
- Sannomiya, M., Fonseca, V.B., da Silva, M.A., Rocha, L.R.M., dos Santos, L.C., Hiruma-Lima, C.A., Britoc, A.R.M.S., Vilegas, W., 2005. Flavonoïds and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology* **97**, 1-6.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I., 2005. Natural Product Isolation. *Humana Press, Totowa*, 1-23.
- Savill, J., Fadok, V., 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784-788.
- Scheck, A.C., Perry, K., Hank, N.C., Clark, W.D., 2006. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. *Complementary & Alternative Medicine* **6**, 27.
- Schmitt, E., Bertrand, R., 2001. Mécanisme de régulation de l'apoptose : implication dans le traitement des cancers. *Reviews in Biology & Biotechnology* **1**, 2-16.
- Schorderet, M., Dayer, J.M., Pharmacologie: Des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques. Edition O.P.U. (Alger), 1992, 918p.
- Schroeter, H., Spencer, J.P., Rice-Evans, C., Williams, R.J., 2001. Flavonoïds protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochemical Journal* **358**, 547-557.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., Boudoukha, C., 2003. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophil chemotaxis and degranulation. *Experimental & Toxicologic Pathology* **54**, 313-318.
- Selloum, L., Reichl, S., Muller, M., Sebihi, L., Arnhold, J., 2001. Effects of flavonols on the generation of superoxide anionradicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **365**, 49-56.
- Selloum, L., Bouriche, H., Sebihi, L., Boudoukha, C., Tigrine, C., Djellili, H., Zaïdi F., 2004. Inhibition of Neutrophil Pholasin Chemiluminescence by *Cleome arabica* Leaf Extract. *Pharmaceutical Biology* **42**, 534-541.
- Sharaf, M., Mansour, R.M.A., Saleh, N.A.M., 1992. Exudate flavonoïds from aerial parts of four *Cleome* species. *Biochemical Systematics & Ecology* **20**, 443-448.
- Sherbet, G.V., Lakshmi, M.S., 1997. The genetics of cancer: genes associated with cancer invasion, metastasis, and cell proliferation. San Diego: *Academie Press*.

- Shimoi, K., Okada, H., Kaneko, J., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Kinae, N., 2000. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O- β -glucoside in rats and humans. *Polyphenols Communications, Freising-Weihenstephan*, 11-15.
- Shirley, B.W., 1996. Flavonoïd biosynthesis: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science* **1**, 377-382.
- Smith, S., 2001. The world according to PARP. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 174-179.
- Sohn, H.Y., Son, K.H., Kwon, C.S., Kwon, G. S., Kang, S.S., 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoïds isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine* **11**, 666-672.
- Spanos, G.A., Wrolstad, R.E., 1992. Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **40**, 1478-1487.
- Spencer, J.P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E.S., Srail, S.K., Rice-Evans, C., 1999. The small intestine can absorb both glucuronidated luminal flavonoïds. *FEBS Letters* **458**, 224-230.
- Sperandio, S, Poksay, K., De Belle, I., Lafuente, M.J., Liu, B., Nasir, J., Bredesen, D.E., 2004. Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death & Differentiation* **11**, 1066-1075.
- Sreenivasan, Y., Sarkar, A., Manna, S.K., 2003. Mechanism of cytosine arabinosidemediated apoptosis: role of Rel A (p65) dephosphorylation. *Oncogene* **22**, 4356-4369.
- Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoïds. *Journal of Separation Science* **30**, 3268-3295.
- Steelman, L.S., Abrams, S.L., Whelan, J., Bertrand, F.E., Ludwig, D.E, Basecke, J., Libra, M., Stivala, F., Milella, M., Tafuri, A., Lunghi, P., Bonati, A., 2008. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and JAK/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* **22**, 686-707.
- Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Kempf, R.C., Long, J., 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging* **3**, 192-222.
- Stoclet, J.C., Schini-Kerth, V., 2011. Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. *Annales Pharmaceutiques Françaises* **69**, 78-90.
- Strange, R., Metcalfe, T., Thackray, L., Dang, M., 2001. Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microscopy Research & Technique* **52**, 171-181.
- Stuppia, L., Gobbi, P., Zamai, L., Palka, G., Vitale, M., Falcieri, E., 1996. Morphometric and functional study of apoptotic cell chromatin. *Cell death & Differentiation* **3**, 397-405.
- Surh, Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* **3**, 768-780.
- Susanti, D., Sirat, H.M., Ahmad, F., Ali, R.M., Aimi, N., Kitajima, M., 2007. Antioxidant and cytotoxic flavonoïds from the flowers of *Melastoma malabathricum* L. *Food Chemistry* **103**, 710-716.
- Sutradhar, R.K., Rahman, A.K.M.M., Ahmad M.U., Bachar, S.C., 2008. Bioactive flavones of *Sida cordifolia*. *Phytochemistry Letters* **1**, 179-182.
- Tartaglia, L.A., Rothe, M., Hu, Y.F., Goeddel, D.V., 1993. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* **72**, 213-216.

- Teixeira, S., Siqueta, C., Alvesb, C., Boalb, I., Marquesc, M.P., Borgesd, F., Limaa, J.L.F.C., Reisa, S., 2005. Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoïds present in diet. *Free Radical Biology & Medicine* **39**, 1099-1108.
- Touil, A., Rhouati, S., 1998. Flavonol glycosides from *Cleome arabica*. Journal de la Société Algérienne de Chimie 8, 117-120. *Société Algérienne de Chimie* **8**, 117-120.
- Trivedi, R., Kumara, S., Kumara, A., Siddiquia, J.A., Swarnkara, G., Gupta, V., Kendurker, A., Dwivedi, A.K., Romerod, J.R., Chattopadhyaya, N., 2008. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats. *Molecular & Cellular Endocrinology* **289**, 85-93.
- Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., Pifferi, G., 1994. A novel antioxidant flavonoïd (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology & Medicine* **16**, 547-543.
- UICC, 2007. International Union Against Cancer eNEWS July 2007. (http://old.uicc.org/templates/uicc/pdf/enews_0707.pdf).
- Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R.J., Spencer, J.P.E., 2009. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuro-inflammatory injury. *Archives of Biochemistry & Biophysics* **484**, 100-109.
- Van Acker, S., Tromp, M., Haenen, G.R.M.M., Van Der Vijgh, W., Bast, A., 1995. Flavonoïds as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **214**, 755-759.
- Vanessa, C., Christine, M., Catherine, B., Nicole, C., 2003. The splanchnic metabolism of flavonoïds highly differed according to the nature of compound. *American Journal of Physiology* **284**, G980-988.
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M.J., Spencer J.P.E., 2010. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. *Nutrients* **2**, 1106-1131.
- Verdan, A.M., Wang, H.C., García, C.R., Henry, W.P. Brumaghim, J.L., 2011. Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **105**, 1314-1322.
- Vicencio, J.M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., Morselli, E., Ben Younes, A., Maiuri, M.C., Lavandero, S., Kroemer, G., 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path-a mini-review. *Gerontology* **54**, 92-99.
- Vinatier, D., Orazi, G., Cosson, M., Dufour, P., 2001. Theories of endometriosis. *European Journal of Obstetrics Gynecology & Reproductive Biology* **96**, 21-34.
- Virgili, F., Marino, M., 2008. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* **1**, 1205-1216.
- Wakui, Y., Yanagisawa, E., Ishibashi, E., Matsuzaki, Y., Takeda, S., Sasaki, H., Aburada, M., Oyama, T., 1992. Determination of baicalin and baicalein in rat plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **575**, 131-136.
- Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferez, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D., 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme : a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**, 343-352.

- Wang, L., Yang, X., Qin, P., Shan, F., Ren, G., 2013. Flavonoïd composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract. *Industrial Crops & Products* **49**, 312-317.
- Wang, W., Heideman, L., Chung, C.S., Pelling, J.C., Koehler, K.J., Birt, D.F., 2000. Cell-cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell lines. *Molecular Carcinogenesis* **28**, 102-110.
- Weerasinghe, P., Buja, L.M., 2012. Oncosis : An important non-apoptotic mode of cell death. *Experimental & Molecular Pathology* **93**, 302-308.
- Weil, M., Raff, M.C., Braga, V.M., 1999. Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Current Biology* **9**, 361-364.
- Weinberg, R.A., One renegade cell: how cancer begins, Basic Books Publisher (New York), 1998, 170p.
- Wollenweber, E., Dorr, M., 1992. Flavonoïd aglycones of *Cleome spinosa* (Cleomaceae). *Phytochemical Bulletin* **24**, 2-4.
- Wollgast, J., Anklam, E., 2000. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* **33**, 423-447.
- Woodman, O.L., Meeker, W.F., Boujaoude, M., 2005. Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **46**, 302-309.
- Yoshida, T., Konishi, M., Horinaka, M., Yasuda, T., Goda, A. E., Taniguchi, H., 2008. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **375**, 129-133.
- Yu, S.P., Yeh, C.H., Sebsi, S.L., Gwag, B.J., Canzoniero, L.M.T., Farhangrazi, Z.S., Ying, H.S., Tian, M., Dugan, L.L., Choi, D.W., 1997. Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* **278**, 114-117.
- Zelnak, A.B., 2007. Clinical pharmacology and use of microtubule-targeting agents in cancer therapy. *Methods in Molecular Medicine* **137**, 209-234.

1. Solutions de travail

1.1. Tampon phosphate

Pour préparer un litre du tampon phosphate salin, abrégé PBS, de l'anglais phosphate buffered saline, il faut :

| | | |
|--|--------|--|
| NaCl (137 mM) | 8,0 g | <ul style="list-style-type: none">• Apporter le volume à 1 litre par l'eau distillée.• Ajustement du pH à 7,4.• Stérilisation par ultrafiltration sous l'hôte (membrane de porosité 0,45 ou 0,22 μm) ou par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.• Répartition de la solution en aliquotes dans des tubes de 15 ml.• Bien visser les bouchons et les entourer par du parafilm, puis les conserver à 4°C. |
| KCl (2,7 mM) | 0,2 g | |
| Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O (10 mM) | 1,44 g | |
| KH ₂ PO ₄ (1,76 mM) | 0,2 g | |

1.2. Bleu de trypan

Pour préparer 100 ml de la solution du bleu de trypan il faut : 500 mg du bleu de trypan + qsp 100 ml de la solution de Krebs. La solution est laissée sous agitation pendant une nuit. Ensuite, une stérilisation par ultrafiltration sous l'hôte est pratiquée en utilisant une membrane de porosité 0,45 ou 0,22 μm .

La solution de Krebs se compose de deux solutions, la solution A et la solution B, et se prépare comme suit :

| | | | |
|---|-------------------------------------|---------|--|
| Solution A | NaCl | 32,18 g | <ul style="list-style-type: none"> • Apporter le volume à 1310 ml par l'eau distillée. • Faire un gargarisme pendant 10 à 15 minutes avec un mélange d'O₂ 95 % et CO₂ 5 %. |
| | KCl | 1,65 g | |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,745 g | |
| | MgSO ₄ 7H ₂ O | 1,37 g | |
| | CaCl ₂ 2H ₂ O | 1,332 g | |
| Solution B | NaHCO ₃ | 9,71 g | <ul style="list-style-type: none"> • Apporter le volume à 1000ml par l'eau distillée. |
| <ul style="list-style-type: none"> • Mélanger la solution A avec la solution B pour obtenir la solution mère de Krebs. | | | |
| Solution Krebs | Solution mère de Krebs | 50 ml | |
| | BSA | 1 g | |
| | HEPES | 0,3 g | |
| Apporter le volume à 100 ml par ddH ₂ O. Puis ajuster le pH à 7,4 | | | |

1.3. Solution de solubilisation et de lyse

La solution de solubilisation et de lyse « SB » de l'anglais « Sample buffer » est préparée à partir de : 500 µl tris-HCl (0,25 M), 1 ml SDS (10 %), 2,5 ml H₂O et un cocktail d'inhibiteurs des protéases (1 :1000) contenant 1,0 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl et 5 µg/ml de leupeptine.

1.4. Solution BMG

La solution BMG est composée de bleu de bromophénol 0,1 % qui sert à colorer l'échantillon, du β-mercapto-éthanol qui sert à rompre les ponts disulfures et du glycérol qui sert à pondérer l'échantillon avec les proportions de 2/2/5, v/v/v respectivement.

1.5. Gels de séparation et de concentration d'électrophorèse

Selon la fiche d'information de Sigma, les solutions A, B, C, D et E qui sont nécessaires à la préparation des gels de séparation et de concentration d'électrophorèse, sont préparés comme suit :

| | Composition | Quantité |
|-------------------|---|-----------------|
| Solution A | Solution d'Acrylamide / Bis-acrylamide | 30 % |
| Solution B | Trizma Base | 7,28 g |
| | TEMED | 92 µl |
| | Adjuster le pH à 8,9 avec du HCl 1N. Ajouter qsp 40 ml ddH ₂ O. | |
| Solution C | Trizma Base | 1,21 g |
| | TEMED | 92 µl |
| | Adjuster le pH à 6,9 avec du HCl 1N. Ajouter qsp 20 ml ddH ₂ O. | |
| Solution D | Dissoudre 1g de SDS dans 10 ml ddH ₂ O. Puis, filtrer. | |
| Solution E | Dissoudre 60 mg de persulfate d'ammonium dans 5 ml ddH ₂ O ultra pure. | |

1.6. Solution de migration « running buffer »

La solution de migration de migration ou « running buffer » est composée de 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3. Elle se prépare comme suit : Faire dissoudre 28,8 g de glycine et 6,04 g de Tris base dans 1,8 litre ddH₂O. Puis, ajouter 2 g du SDS et compléter le volume à 2 litres par du ddH₂O.

1.7. Tampon de transfert « transfert buffer »

Le tampon de transfert « transfert buffer » est composé de : 25 mM Tris et 192 mM glycine, pH 8,3. Il se prépare comme suit :

- **Solution stock 10X (se conserve à 4°C)**

- 30,3 g Tris base
- 144,1 g glycine
- ddH₂O qsp 1 litre

- **Tampon de transfert 1X (se conserve à 4°C)**

- 100 ml de la solution stock 10X
- 200 ml méthanol
- ddH₂O qsp 1 litre

1.8. Solution du rouge Ponceau

La solution du rouge ponceau est préparée en ajoutant 5 ml de l'acide acétique à 1 g de la poudre du rouge ponceau, puis, le volume est complété à 20 ml par ddH₂O.

1.9. Solution TTBS

La solution TTBS 10X (Tween-Tris-Buffered Saline) est composée de la solution du TBS (Tris-Buffered Saline) et du 0,1 % Tween 20.

Pour préparer un litre de la solution TBS 10X il faut : 24,2 g Tris (Tris base, Tris buffer, Trizma™, Trisamine, THAM, Tromethamine, Trometamol, Tromethane, Trisaminol), 80 g NaCl et une qsp 1 litre de ddH₂O. Puis, le pH de la solution obtenu est ajusté à 7,6 avec du HCl. Pour préparer un litre de la solution TTBS il faut : 100 ml du TBS 10X + 1 ml tween 20 + qsp 1 litre ddH₂O.

1.10. Solution du BSA

La solution du BSA (Bovine Serum Albumin) 3% est préparée comme suit : 1,2 g de BSA + qsp 40 ml TTBS. La solution obtenue est stérilisée par filtration.

2. La courbe la courbe d'étalonnage du BSA

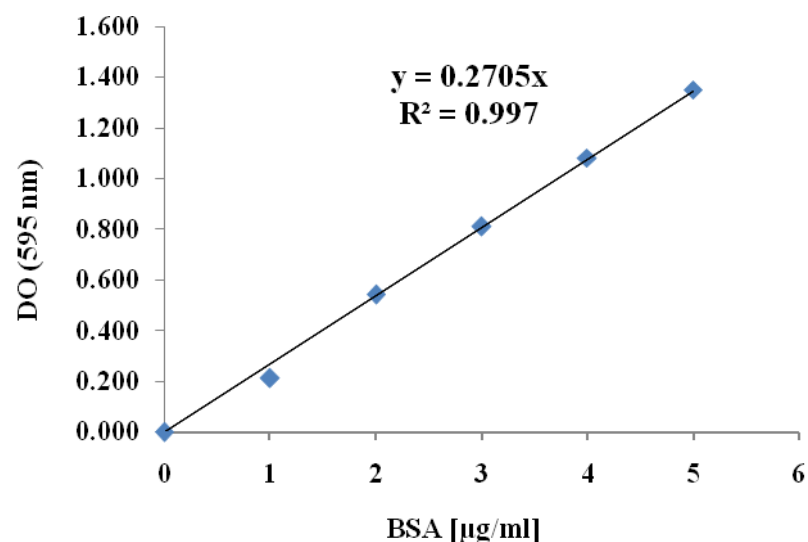


Figure 36: La courbe d'étalonnage du BSA.

Résumé

Cléome arabica L. (Capparaceae) est une plante médicinale saharienne, largement distribuée dans la partie nord de l'Afrique et elle est utilisée pour le traitement des douleurs abdominales et rhumatismales. Dans la présente étude, l'extrait polyphénolique des feuilles de *Cléome arabica* (EFCA) est étudié pour: (i) L'activité antioxydante *in vitro* en utilisant les tests du DPPH[•], de chélation du fer et du pouvoir réducteur. (ii) Les effets anticancéreux en utilisant cinq lignées de cellules cancéreuses humaines, MCF-7, DLD-1, HepG2, HeLa et SK-N-BE, par la mesure de leur viabilité et la distribution de leur cycle cellulaire en utilisant une chambre d'hémocytomètre et un cytomètre en flux. Le facteur de croissance épidermique (EGF) a été utilisé comme contrôle positif. Un western blot est réalisé pour évaluer les effets de l'extrait sur les voies impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire et l'activation de la cascade apoptotique. (iii) Les effets protecteurs contre la toxicité hématologique induite par l'AraC chez la souris en établissant une formule de numération sanguine et par la mesure de la température corporelle des souris. Les résultats obtenus montrent que l'EFCA a exercé une forte activité antiradiculaire contre le radical libre DPPH[•] (IC₅₀ 4,88 µg/ml) et un puissant pouvoir réducteur. Cependant, une bonne activité chélatrice n'a été obtenue qu'avec des concentrations élevées (IC₅₀ = 377,75 µg/ml). En outre, les résultats obtenus indiquent que le traitement des 5 lignées de cellules cancéreuses avec les différentes concentrations de l'extrait (1, 5, 10, 25, 50, 100 et 200 µg/ml) a réduit le nombre cellulaire d'une manière dose-dépendante. Ainsi, la cascade apoptotique impliquant l'activation de la caspase-3 et le clivage de son substrat, la protéine PARP, a été triplé en utilisant des concentrations de 100 et 200 µg/ml de l'EFCA. Le traitement des cellules cancéreuses par 200 µg/ml d'extrait a bloqué la croissance cellulaire induite par le facteur de croissance EGF, en empêchant la phosphorylation d'AKT et d'ERK et en diminuant le niveau de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Dans l'ensemble, ces données suggèrent fortement que l'EFCA a exercé des effets anticancéreux sur toutes les lignées cellulaires cancéreuses testées. Les résultats de cette étude montrent également que l'injection sous-cutanée de 50 mg/kg de l'AraC à des souris pendant 3 jours consécutifs a entraîné une myélosuppression significative. En effet, les nombres des globules rouges et des globules blancs, la quantité d'hémoglobine et le pourcentage de l'hématocrite ont diminué significativement ($p < 0,001$). Cependant, l'injection intrapéritonéale de l'extrait (100 mg/kg) pendant 6 jours consécutifs n'a exercé aucun effet toxique. La combinaison de l'EFCA et d'AraC a protégé les cellules sanguines contre une véritable toxicité. En fait, le nombre des globules rouges, la quantité d'hémoglobine et le pourcentage de l'hématocrite sont significativement plus élevés. Toutefois, le nombre des globules blancs est légèrement protégé. En plus, l'extrait a exercé une activité antipyrétique par le maintien de la température corporelle des souris au tour de 37°C chez le groupe traité par la combinaison l'EFCA/AraC, contre 39°C chez le groupe traité par l'AraC seule. En conclusion, les activités biologiques de l'EFCA, observés *in vitro* ainsi que *in vivo*, sont probablement dues à sa richesse en polyphénols, surtout en flavonoïdes qui ont représenté $322,1 \pm 3,44$ mg équivalent d'acide gallique/g de l'extrait et $245,6 \pm 4,67$ mg équivalent de quercétine/g de l'extrait respectivement.

Mots clés: flavonoïdes, extrait polyphénolique, *Cléome arabica*, activité antioxydante, activité hématoprotective, apoptose, activité anticancéreuse.

ملخص

النبتة (*Cleome arabica* L) هي نبتة طبية صحراوية منتشرة على نطاق واسع في شمال أفريقيا وتستخدم لعلاج آلام البطن و الروماتيزم. في هذه الدراسة، تم تقدير الأنشطة التالية للمستخلص البوليفينولي المستخرج من أوراق النبتة: (أ) النشاط المضاد للأكسدة في المختبر باستخدام DPPH[•]، التخلب المعدني والقدرة المرجعة. (ب) النشاط المضاد للسرطان باستخدام خمسة أنواع من الخلايا السرطانية البشرية المختلفة: MCF-7، DLD-1، HepG2، HeLa و SK-N-BE، من خلال تقييم الحيوية الخلوية وقياس توزيع دورة الخلية باستخدام غرفة hemocytometer و cytofluorimeter على التوالي، حيث تم استخدام عامل النمو كشاهد موجب. كما تم استخدام تقنية Western blot لتحديد تأثير المستخلص على المسارات التي تدخل في تنظيم نمو الخلايا و تنشيط الموت الخلوي المبرمج. (ج) النشاط الوقائي ضد السمية الدموية التي يسببها دواء CarA في الفئران وذلك بتحديد الصيغة العددية لكريات الدم و كذا قياس درجة حرارة الجسم. أوضحت النتائج المتحصل عليها أن مستخلص النبتة يملك نشاطا مضادا للأكسدة جد فعال ضد الجذر الحر DPPH[•] (IC₅₀ = 4.88 ميكروغرام/مل) كما يملك أيضا قدرة مرجعة مهمة و قدرة تخلب جيدة ولكن باستعمال تراكيز عالية (200-1000 ميكروغرام/مل). كما أظهرت النتائج المتحصل عليها أن معاملة الخلايا السرطانية بتراكيز مختلفة لمستخلص النبتة (1، 5، 10، 25، 50، 100 و 200 ميكروغرام/مل) أدت إلى انخفاض عدد الخلايا السرطانية الحية بطريقة تعتمد على الجرعة. إضافة إلى ذلك، تمت زيادة في نسبة أنزيم الكاسباس 3 و ركيذته PARP بمقدار ثلاثة أضعاف باستخدام 100 و 200 ميكروغرام / مل من المستخلص. كما أوقف المستخلص بتركيز 200 ميكروغرام/مل نمو الخلايا المحفز بعامل النمو و ذلك بمنع فسفرة AKT و KRE و كذا خفض مستوى IκB-2. من خلال النتائج المحصل عليها فإن مستخلص النبتة يمتلك تأثيرا مضادا للسرطان في جميع أنواع الخلايا السرطانية التي تم اختبارها. كما أظهرت النتائج المحصل عليها أن حقن لـ 50 ملغ/كغ من CarA تحت الجلد لفئران التجربة خلال ثلاثة أيام متتالية أدى إلى كبح نخاعي كبير. حيث انخفض عدد خلايا الدم الحمراء والبيضاء، و كذا كمية الهيموجلوبين ونسبة الهيماتوكريت بصفة معنوية ($P < 0.001$). بينما لم يبدي الحقن داخل الصفاق لـ 100 ملغ/كغ من مستخلص النبتة ولمدة ستة أيام متتالية أي أثر سمي في الدم. إن الحقن المزدوج لكل من مستخلص النبتة/ CarA حمى الخلايا الدموية من سمية حقيقية. حيث كان عدد خلايا الدم الحمراء و كمية الهيموجلوبين ونسبة الهيماتوكريت عالية بشكل ملحوظ. غير أنه لم يتم حماية خلايا الدم البيضاء. بالإضافة إلى ذلك، أثبت المستخلص نشاطا خافضا للحرارة و ذلك من خلال الحفاظ على درجة حرارة جسم الفئران في حدود 37 °م في المجموعة التي تم معاملةها بـ مستخلص النبتة/ CarA مقابل 39 °م في المجموعة المعاملة بـ CarA وحدها. ختاماً، يمكن أن تكون الأنشطة البيولوجية لمستخلص النبتة، و التي لوحظت في المختبر وكذلك في الجسم الحي، راجعت إلى غناه الكبير بمادة البوليفينول، خاصة الفلافونويدات و التي قدرت بـ 322.1 ± 3.44 مغ مكافئ لحمض القالليك/غ من المستخلص و 245.6 ± 4.67 مغ مكافئ للكارستين/غ من المستخلص على التوالي.

الكلمات المفتاح: الفلافونويد ، البوليفينول ، *emoelC acibara* ، النشاط المضاد للأكسدة، والتأثير الوقائي، الموت الخلوي المبرمج، دورة الخلية.