



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé
et
Université LIBANAISE
Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie

THESE en cotutelle

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne
et l'Université Libanaise**

Discipline : Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement par

Nathalie Chahine

Le 16 septembre 2014

Titre:

**Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité
de la doxorubicine en condition ischémique**

JURY

Mme Rita Azzi,	Professeur, Université Libanaise	Présidente
Mr Ramez Chahine,	Professeur, Université Libanaise	Co-directeur
Mr Laurent Martiny,	Professeur, Université de Reims	Co-directeur
Mr Nassim Fares,	Professeur, Université Saint Joseph	Rapporteur
Mr Gilles Faury,	Professeur, Université de Grenoble	Rapporteur
Mr Laurent Duca,	Professeur, Université de Reims	Examineur

Avec gratitude et reconnaissance,

*Je dédie ce travail à tous ceux qui ont été là
pour m'aider, me soutenir, me supporter, m'aimer...*

À ceux qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui...

Remerciements

Cette thèse est l'histoire d'une jeune fille qui s'est dit un jour: je serai chercheur en sciences. J'ai progressé dans la vie et dans mes études en m'attachant à cette idée. Et voilà un de mes rêves achevé; le fruit de plusieurs années de travail et de maturation au niveau spirituel et scientifique: Ma Thèse. La jeune fille devient aujourd'hui Docteur. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate. À l'issue de la rédaction de cette thèse, je voudrais rendre hommage à ceux qui ont gravés dans mon esprit, comme ce travail de recherche est gravé sur ce manuscrit.

A mon co-directeur, mon coach, mon héros, mon idole, meilleur papa, meilleur ami, meilleur inspirateur, j'en oublie sûrement... bref, le meilleur tout court. J'ai eu la chance de mener cette expérience spéciale: l'avoir comme directeur et papa en même temps. Ce n'était pas toujours facile à gérer Merci pour m'avoir transmis son goût pour la science et la recherche et satisfaire ma curiosité. Je voudrais lui témoigner ma gratitude pour la confiance qu'il a eue à mon égard et pour tout son investissement. Son enthousiasme, la rigueur de son esprit critique et ses observations ne peuvent être qu'un exemple pour moi. Merci pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche; il a su rechercher le meilleur de moi même.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance envers mon co-directeur de thèse, le Professeur Laurent Martiny pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de son laboratoire de recherche, et d'avoir accepté la mise en place de cette cotutelle de thèse qui a permis la réalisation de ce travail. Je tiens à lui assurer ma profonde gratitude pour tout l'engagement qu'il a apporté à ce projet. Merci pour la confiance qu'il m'a témoignée, pour sa disponibilité et son encadrement, pour toutes les recommandations et les connaissances scientifiques de qualité dont j'ai bénéficié tout au long de ma thèse.

Je remercie vivement le Docteur Laurent Duca pour tout le support et les informations pertinentes aux niveaux scientifique et technique qu'il a pu m'apporter au cours de son encadrement durant la période que j'ai passée parmi eux. Sa patience, sa très bonne humeur et sa gentillesse m'ont permis d'évoluer dans un cadre agréable. Je le remercie aussi de faire partie des membres du jury de cette thèse comme examinateur et de juger ainsi ce travail.

Je tiens aussi à témoigner ma gratitude à l'égard des Professeurs Nassim Fares et Gilles Faury pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Leurs remarques et leurs critiques seront pour moi une source d'enrichissement. Connaissant leurs compétences scientifiques, je suis heureuse de pouvoir bénéficier de leurs critiques.

Je tiens également à remercier le Professeur Rita Azzi qui nous a fait l'honneur d'être présente comme examinateur et présidente du jury pour ce travail de thèse. Je lui exprime ma sincère gratitude, qu'elle soit assurée de toute mon estime.

Mes hommages vont aussi au Docteur Hassane Makhoulf qui nous a mis sur la route du safran et qui nous a fourni cette épice en or ! Merci pour ses encouragements et son support inconditionnel.

Je voudrais présenter mes vifs remerciements au Dr Saad Khairallah qui nous a permis de réaliser la partie histopathologique à l'Institut National de Pathologie.

Je remercie l'ensemble des deux équipes SOA (Liban) et SiRMA (France) : techniciens, stagiaires, doctorants, docteurs... tous ceux qui m'ont aidée à achever ce travail de thèse. Grand merci pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur aide précieuse durant ces trois années. Merci pour l'accueil agréable qu'ils ont tous eu à mon égard depuis mon arrivée et tout au long de ma présence parmi eux. Ils ont permis d'accomplir ce travail dans la joie et la bonne humeur.

Un merci spécial au personnel du centre de Ghazir de l'Ecole vétérinaire qui nous a accueillis dans ses locaux et nous a aidés avec enthousiasme pour réaliser le protocole chronique.

Je rends aussi hommage à tous mes enseignants en biologie et membres de la faculté des sciences à Fanar qui ont participé à ma passion pour la biologie, qui ont su transmettre leur savoir et avec qui j'ai partagé de bons moments comme en famille.

À vous, mes très chers parents, sans qui je ne serai pas arrivée jusque là; j'ai énormément de chance de vous avoir. Je dois à mes parents d'avoir contribué à ma passion des sciences; ils ont nourri ma curiosité et ont participé à mon goût pour la biologie. Cette thèse est aussi le fruit de leurs multiples sacrifices. Un énorme merci à maman, pour son amour inconditionnel, son support même dans les moments difficiles, source de mon courage et de ma détermination. Grâce à elle, tout est possible; les mots sont bien petits pour exprimer mon admiration.

Un simple merci n'est pas suffisant à mes sœurs, qui m'ont toujours soutenue, encouragée et conseillée dans toutes les situations que j'affronte. On partage beaucoup de moments ensemble qui sont gravés dans nos cœurs pour la vie. À mes sœurs, je dois ma force, source de mon inspiration et de mon bonheur. Merci à tous les membres de ma famille maternelle et paternelle pour leur soutien continu de proche et de loin qui m'a encouragé le long de mes études. Grâce à vos prières, je suis arrivée là.

À toutes mes amies et tous mes amis, à ceux et celles qui se reconnaîtront sûrement... Merci d'avoir émerveillé ces années avec tant de souvenirs inoubliables, depuis l'école... puis les splendides premières années universitaires... jusqu'aux études supérieures... À ceux qui m'ont aimée sincèrement, qui m'ont soutenue jour par jour et qui ont partagé avec moi mes moments de plaisirs et de chagrins. Merci pour ceux qui sont rentrés, partis ou restés dans ma vie et avec qui je partage mes plus beaux souvenirs... seuls les vrais amis laissent leurs vives empreintes.

Je remercie vivement l'Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie et le comité de recherche de l'université Libanaise, en particulier la Doyenne Zeinab Saad, ainsi que l'association AZM pour le financement de cette thèse et en m'accordant une bourse doctorale sans laquelle ce travail n'aurait pas vu le jour.

Enfin, pour toutes les fins et tous les départs; mais surtout pour tous les nouveaux débuts...!

Résumé

La doxorubicine (DOX) est un médicament très efficace utilisé en chimiothérapie pour traiter de nombreuses tumeurs. Cependant, son utilisation clinique est limitée par des effets secondaires cardiotoxiques sévères causés majoritairement par une augmentation de production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) et de l'apoptose. Chimiothérapie et ischémie cardiaque pourraient s'entrecroiser dans certains cas, ce qui constitue une situation critique qui est peu explorée. Dans cette thèse, nous avons donc examiné au niveau du cœur isolé de lapin et des cardiomyocytes en culture la cardiotoxicité de la DOX dans le cas d'une ischémie/reperfusion (IR) myocardique, ainsi que la cardioprotection assurée par un antioxydant naturel puissant, le safran (SAF).

D'abord nous avons procédé à une extraction méthanol-eau des stigmates du safran cultivé au Liban. Une analyse par HPLC des principaux constituants (safranal et crocines) a été réalisée afin de s'assurer de la qualité des extraits, suivie par des tests (xanthine/xanthine oxydase et électrolyse) comme sources de RLO pour rechercher le pouvoir antioxydant de ces extraits.

Nous avons testé l'effet du SAF sur des cœurs de lapins isolés et perfusés selon la technique de Langendorff. Une dose optimale de 10 µg/mL a été adoptée. Par ailleurs, la toxicité aigüe de la DOX a été évaluée sur des cœurs isolés traités par la DOX, soumis à une électrolyse ou à une IR globale (I 30 min/R 40 min) en présence ou absence de SAF. La toxicité chronique de la DOX a aussi été recherchée chez des lapins traités pendant 21 jours avec des extraits de SAF (voie orale) et la DOX (voie ip). Les cœurs ont été par suite isolés et soumis à une ischémie globale (I 30 min/R 30 min). D'après les études cardiodynamiques, anatomopathologiques et biochimiques; il apparaît que les extraits de safran protègent le cœur de la toxicité aigüe et chronique de la doxorubicine et assurent une protection efficace lors de la reperfusion. De plus, le SAF a inhibé l'apoptose induite par IR et DOX en activant la voie de survie AKT/mTOR, en augmentant le niveau de Troponine T et en inhibant l'expression de p-P38 tel que montré par les analyses de Western blot. Le safran contribuerait donc à améliorer nettement le retour des fonctions myocardiques vers la normale suite à l'IR et au traitement par la DOX.

Les effets de la DOX et du SAF ont aussi été étudiés dans les cardiomyocytes H9c2 soumis à une IR simulée. Les effets des différents traitements ont été évalués par les tests MTT, LDH et Western blot. L'apoptose a été analysée par utilisation du colorant Hoechst 33258, les sondes TMRM et l'activité des caspases. Les résultats ont montré que la DOX exacerbe les lésions cardiaques sous-jacentes à une IR. Nos données prouvent que IR et DOX diminuent significativement la viabilité cellulaire; inhibent la voie RISK de cardioprotection; réduisent les quantités de protéines contractiles (α -Actinine, Troponine C et MLC); activent les caspases 3 et provoquent la perte du potentiel de membrane mitochondrial. Ces effets ont été remarquablement inhibés par le traitement avec le SAF (10 µg/mL) à la reperfusion. Les résultats suggèrent que le SAF a un effet protecteur contre les effets délétères de l'IR et la DOX par un mécanisme impliquant la réduction de l'apoptose cardiaque, des RLO et du stress oxydatif. La cardioprotection du SAF est médiée par l'activation des voies de survie AKT/P70S6K et ERK; l'augmentation de l'expression des protéines contractiles; l'inhibition de la perméabilité des pores de transition mitochondrial et la diminution de l'activité des caspases 3. En outre, nous avons montré que l'effet protecteur du SAF serait attribué à la crocine, son métabolite actif principal.

Pris ensemble, nos résultats indiquent que la DOX exacerbe les lésions myocardiques dues à l'IR. Le traitement par le SAF à la reperfusion pourrait exercer des effets cardioprotecteurs contre la toxicité induite par la DOX via son activité antioxydante. Ainsi, nos travaux sur le safran se révèlent fort intéressants dans le développement d'une stratégie thérapeutique antioxydante potentielle afin de limiter la toxicité cardiaque de la doxorubicine, ouvrant la voie à de futurs essais cliniques.

Abstract

Doxorubicin (DOX) is a highly active chemotherapeutic drug used to treat many tumors. However, its clinical use is limited by severe cardiotoxic side effects. Previous studies have shown that DOX-induced cardiotoxicity is mainly mediated by increased oxidative stress and apoptosis. Moreover, DOX could be indicated in association with myocardial ischemia. In this thesis we investigated, in isolated rabbit heart and cultured cardiomyocytes, the cardiotoxic effects of DOX in conditions of ischemia/reperfusion (IR). We also studied whether saffron (SAF), a natural compound that showed potent antioxidant activity, could exert cardioprotection against DOX and IR toxicity.

First, the extraction of saffron stigmas grown in Lebanon was performed using methanol-water mixture. HPLC analysis of the main components (safranal and crocines) was used to ensure the quality of the extracts; followed by tests using xanthine/xanthine oxidase and electrolysis as sources of free radicals to determine the antioxidant activity of the sample.

The toxicity of SAF was evaluated in isolated rabbit hearts according to Langendorff technique and the optimal therapeutic dose established is 10 $\mu\text{g/mL}$. Then, the acute toxicity of DOX was tested in isolated hearts treated with or without DOX and SAF compared with hearts subjected to electrolysis or a period of global ischemia (I 30 min/R 40 min). The chronic toxicity of DOX was evaluated in rabbits treated for 21 days with SAF extracts (orally) and DOX (ip). The hearts were afterward isolated and subjected to global ischemia (I 30 min/R 30 min). According to cardiodynamic, pathological and biochemical studies, it appears that saffron extracts protect the heart from the acute and chronic toxicity of doxorubicin, and ensure optimal protection during reperfusion. Furthermore, SAF inhibited IR and DOX-induced apoptosis by activating the AKT/mTOR survival pathway, increasing Troponine T and inhibiting p-P38 expression as shown by Western blot analysis. Saffron could therefore significantly improve myocardial function- returning to its normal state- following IR and DOX treatment.

The effects of DOX and SAF were also investigated in H9c2 cardiomyocytes subjected to simulated IR injury. We evaluated the effects of the treatments by MTT assay, LDH release measurements and Western blot analysis. Apoptosis was assessed by Hoechst 33258 staining, TMRM probes and caspase activity. The results proved that DOX exacerbates cardiac cell injury when an underlying IR heart condition is present. Our data showed that IR and DOX significantly decreased cardiac cells viability; inhibited RISK cardioprotective pathway; reduced contractile protein levels (α -Actinin, Troponin C and MLC); increased caspase 3 expression and induced loss of mitochondrial membrane potential. These effects were remarkably inhibited by treatment with SAF (10 $\mu\text{g/mL}$) during reperfusion. Our data suggest that SAF has a protective effect against IR and DOX-induced cardiac apoptosis through a mechanism involving free radicals scavenging and oxidative stress reduction. SAF cardioprotection is mediated by activation of survival pathways including AKT/P70S6K and ERK; increase in the expression of contractile proteins; inhibition of mitochondrial permeability transition pore and decrease caspase 3 activity. In addition, our studies showed that protective activities of SAF belong to crocin, its major active metabolite.

Taken together, our findings indicate that DOX exacerbates IR myocardial injury. The SAF treatment during reperfusion could exert cardioprotective effects against DOX-induced toxicity through its antioxidant activity. Thereby, saffron offers a potential novel antioxidant therapeutic strategy to counteract doxorubicin cardiotoxicity, paving the way for future clinical trials.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures	3
Liste des tableaux	6
Introduction et but de la recherche.....	7

TRAVAUX ANTERIEURS

I. Radicaux libres et antioxydants	11
1. Généralités	11
2. Les Radicaux libres et le stress oxydatif	11
2.1. Définition et terminologie	11
2.2. Différents types de radicaux libres	12
2.3. Formation des radicaux libres	12
2.4. Sources des radicaux libres	14
2.5. Rôle physiologique des radicaux libres	16
2.6. Causes du stress oxydatif	17
2.7. Conséquences du stress oxydatif	17
2.8. Stress oxydatif et maladies associées	19
3. Les systèmes de défenses : les antioxydants.....	20
3.1. Définition	20
3.2. Différentes sources d'antioxydants	20
3.3. Mode d'action des antioxydants	20
3.4. Le dispositif anti-radicalaire de protection.....	21
3.5. Les réactions de défense	21
3.6. Les vitamines antioxydantes	22
3.7. Les polyphénols	24
II. La doxorubicine et sa cardiotoxicité	25
1. Le cancer	25
2. La doxorubicine	27
2.1. Historique	27
2.2. Pharmacologie	28
2.2.1. Structure moléculaire	28
2.2.2. Pharmacocinétique	29
2.3. Principaux mécanismes d'action	30
2.4. Mécanismes de résistance à la doxorubicine	32
2.5. Indications thérapeutiques et toxicité	33
3. Toxicité cardiaque.....	34
3.1. Principaux mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines	34
3.1.1 Production de radicaux libres par les anthracyclines	34
3.1.2. Apoptose cellulaire induite par les anthracyclines	39
3.2. Anato-pathologie des lésions cardiaques induites par les anthracyclines	39
3.3. Aspects cliniques de la cardiotoxicité des anthracyclines	40

3.3.1. Cardiotoxicité aiguë et subaiguë	41
3.3.2. Cardiotoxicité chronique	41
3.3.3. Cardiotoxicité tardive	41
3.4. Facteurs de risque cardiovasculaires	42
3.5. Prévention et réduction de la toxicité cardiaque des anthracyclines	44
3.5.1. Surveillance de la fonction cardiaque	44
3.5.2. Modifications des modalités thérapeutiques	45
3.5.3. La cardioprotection.....	47
3.6. Conclusion	49
4. Les voies de signalisation intracellulaires	50
5. Les stratégies de cardioprotection	51
5.1. Les activateurs de la voie RISK	51
5.2. Inhibition du mPTP et mécanisme anti-apoptotique	54
5.3. Interaction avec les myofilaments	58
5.3.1. La contraction musculaire	58
5.3.2. Dosage des protéines cardiaques	60
III. Mécanismes de l'ischémie-reperfusion cardiaque	62
1. Débit coronaire et métabolisme énergétique du myocarde	62
2. Ischémie cardiaque	63
2.1. Perturbations métaboliques	64
2.2. Perturbations ioniques	66
2.3. Types d'ischémie myocardique	67
2.4. Stress oxydant en conditions d'ischémie	68
3. Reperfusion myocardique	68
3.1. Généralités	68
3.2. Majoration brutale du stress oxydant	71
3.2.1. Les leucocytes activés	71
3.2.2. Les NADPH oxydases	72
3.2.3. Le NO et les NO synthases.....	72
3.2.4. La xanthine-déshydrogénase	72
3.2.5. Les autres systèmes	73
3.3. Paradoxe du calcium	73
3.4. Dommages de la reperfusion	75
3.4.1. La sidération myocardique	75
3.4.2. Le concept de no-reflow	75
3.4.3. Les arythmies de la reperfusion	76
3.5. Mort cellulaire	76
3.5.1. La nécrose cellulaire	76
3.5.2. L'apoptose	77
3.6. Dysfonctionnement mitochondrial	78
3.6.1. Implication du mPTP dans les lésions de reperfusion	79
4. La cicatrisation.....	80
5. La cardioprotection	82

IV. Le safran	83
1. Historique	83
2. Caractère botanique	84
3. Culture du safran	85
4. Récolte et rendement du safran	86
5. Composition chimique du safran	89
6. Effets pharmacologiques	92
7. Qualité du safran	95
8. Utilisation du safran en cuisine	95

TRAVAUX PERSONNELS

I. Matériels et méthodes	97
1. Préparation de l'extrait de safran	97
2. Analyse par HPLC	98
3. Dosage des polyphénols totaux	98
4. Détermination in vitro du pouvoir antioxydant du safran	99
4.1 Génération de radicaux libres par électrolyse	99
4.1.1. Mode opératoire	99
4.1.2. Dispositif expérimental	100
4.2. Xanthine-xanthine oxydase	100
5. Modèle ex-vivo: cœur isolé de lapin	101
5.1. Méthode chirurgicale et perfusion du cœur isolé	101
5.2. Détermination des paramètres cardiodynamiques et électro-physiologiques	103
5.3. Protocoles expérimentaux	103
5.3.1 Effet de l'électrolyse et la doxorubicine	103
5.3.2. Effet en aigüe de la DOX et du SAF sur le cœur en IR	105
5.3.3. Effet en chronique de la DOX et du SAF sur le cœur en IR	106
5.4. Étude anatomopathologique	107
5.5. Test au Nitroblue tetrazolium	107
5.6. Détermination de la zone ischémique	107
6. Méthodes biochimiques	107
6.1. Peroxydation lipidique	108
6.2. Superoxyde dismutase	108
6.3. Glutathion peroxidase	109
6.4. Créatine kinase	110
6.5. Extraction des protéines du tissu cardiaque	110
7. Modèle in vitro : cardiomyocytes H9c2 en culture	111
7.1. Modèle cellulaire	111
7.2. Protocole expérimental	112
7.3. Hypoxie/réoxygénation in vitro	114
7.4. L'étude de la viabilité cellulaire	115
7.4.1. Le test du MTT	115
7.4.2. Le test du LDH	115
7.5. L'étude de l'expression des protéines	116
7.5.1. Extraction des protéines	116

7.5.2. Dosage des protéines	117
7.5.3. Western blot	118
7.5.3.1. Électrophorèse SDS-PAGE	118
7.5.3.2. Transfert	119
7.5.3.3. Révélation	120
7.6. Techniques de détection de la mort cellulaire	125
7.6.1. Marquage au Hoechst 33342	125
7.6.2. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial	125
7.6.3. Double marquage Hoechst et TMRM	126
7.6.4. Détermination de l'activité des caspases	127
8. Etude statistique	128
 II. Résultats	 129
1. Analyse chimiques du safran	129
1.1. Analyse par HPLC	129
1.2. Dosage des polyphénols	129
2. Recherche in vitro du pouvoir antioxydant du safran, safranal et crocine	130
2.1. Effet sur le radical superoxyde	130
2.2. Effet sur les radicaux générés par électrolyse	132
2.3. Discussion	134
3. Effet des extraits de safran sur le cœur isolé de lapin	137
3.1. Détermination de la dose non toxique de safran	137
3.2. Effet comparatif de la doxorubicine et de l'électrolyse sur les paramètres cardiodynamiques du cœur isolé de lapin	138
3.2.1. Paramètres cardiodynamiques	138
3.2.2. Quantification des arythmies	142
3.2.3. Marqueurs enzymatiques d'oxydation	143
3.2.4. Coupes histologiques	144
3.2.5. Discussion	145
3.3. Effet du safran contre la cardiotoxicité aiguë de la doxorubicine	147
3.3.1. Paramètres cardiodynamiques	147
3.3.2. Quantification des arythmies	150
3.3.3. Marqueurs enzymatiques d'oxydation	150
3.3.4. Histopathologie	151
3.3.5. Voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection du safran	153
3.3.6. Discussion	156
3.4. Effet du safran contre la cardiotoxicité chronique de la doxorubicine	161
3.4.1. Observation des animaux	161
3.4.2. Paramètres cardiodynamiques	161
3.4.3. Paramètres électro-physiologiques	163
3.4.4. Paramètres biochimiques	164
3.4.5. Taille de la zone ischémique	165
3.4.6. Réduction du Nitroblue tetrazolium	166
3.4.7. Discussion	167

4. Effet du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine au niveau des cardiomyocytes en condition ischémique	169
4.1. Effet du SAF et de la DOX sur la viabilité cellulaire	169
4.2. Effet du SAF et de l'IR sur la viabilité cellulaire	172
4.3. Effet de la crocine et du safranal sur la viabilité cellulaire	174
4.4. Effet du safran sur les voies de signalisation suite à IR et DOX	179
4.4.1. Activation des voies de signalisation AKT/P70S6K et ERK 1/2	179
4.4.2. Augmentation de l'expression des protéines contractiles	181
4.5. Effet du safran contre l'apoptose.....	181
4.5.1. Effet du safran sur le potentiel de membrane mitochondrial	181
4.5.2. Effet du safran sur la condensation de la chromatine	182
4.5.3. Effet du safran sur l'activité des caspases 3	182
4.6. Discussion	187



Discussion générale	195
Conclusion	202
Perspectives	204
Références	205
Annexe	229

Liste des abréviations

3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide	MTT
4E-binding protein 1	4EBP1
Acide désoxyribonucléique	ADN
Acide thiobarbiturique	TBA
Adénosine di-phosphate	ADP
Adénosine tri-phosphate	ATP
Ammonium persulfate	APS
Antioxydant	AO
ARN messagers	ARNm
Atrial natriuretic peptide	ANP
B-cell lymphoma 2	Bcl-2
Bcl-2 Associated Death promoter	BAD
Bcl-2 Associated X protein	BAX
Bicinchoninic acid	BCA
Bovin Serum Albumin	BSA
Brain natriuretic peptide	BNP
c-Jun N-terminal kinases	JNK
Crocine	Cr
CysteinyI-dependent aspartate specific proteases	Caspases
Cytochrome c	cyt c
Débit coronaire, Coronary flow	CF
Déféroxamine	DFX
Diméthylsulfoxyde	DMSO
Dose cumulative totale	DCT
Doxorubicine	DOX, D
Dulbecco's modified Eagle's medium	DMEM
Échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺	NCE, NCX
Électrocardiogramme	ECG
Enhanced chemiluminescence	ECL
Epidermal growth factor	EGF
Epidermal growth factor receptor	EGFR
Équivalent acide gallique	GAE
Ethylene diamine tetraacetic acid	EDTA
Ethylene glycol tetraacetic acid	EGTA
Eukaryotic translation initiation factor 4E	eIF4E
Extracellular signal-regulated kinase	ERK
Extrasystoles, premature ventricular contractions	PVC
Facteur de nécrose tumorale α	TNF- α
Fibrillation ventriculaire	VF
Fréquence cardiaque, Heart rate	HR
Glutathion peroxydase	GSH-Px
Glutathion réductase	GRx
Glutathion peroxydase	GPx
High-Performance Liquid Chromatography	HPLC

Horseradish peroxidase	HRP
Insuffisance cardiaque	IC
Insulin like growth factor	IGF
Insulin like growth factor receptor	IGFR
Ischémie-reperfusion	IR
Lactate déshydrogénase	LDH
Malondialdehyde	MDA
Mammalian target of rapamycin	mTOR
Manganèse-Superoxyde dismutase	MnSOD
Matrice extracellulaire	MEC
Mitochondrial permeability transition pore	mPTP
Mitogen activated protein kinases	MAPK
Myosin heavy chain	MHC
Myosin light chain	MLC
N, N di-éthyl-P-Phénylalanine	DPD
Nitroblue tetrazolium	NBT
NO synthase endothéliale	eNOS
NO synthase inductible	iNOS
Oxyde nitrique	NO
Oxydes nitriques synthases	NOS
Peroxydation lipidique	LP
P-glycoprotéine	P-gP
Phosphatidyl inositol-3-kinase	PI3K
Platelet derived growth factor	PDGF
Polymorphonucléaires	PMN
Pression télédiastolique, Left ventricular end diastolic pressure	LVEDP
Pression ventriculaire gauche, Left ventricular pressure	LVP
Protéine kinase B	AKT
Radicaux libres	RL
Radicaux libres de l'oxygène	RLO
Radioimmuno precipitation assay	RIPA
Récepteurs tyrosine kinases	RTK
Reperfusion injury salvage kinase	RISK
Réticulum sarcoplasmique	RS
Safran	SAF, S
Safranale	Sa
Sérum de veau foetal	SVF
Sodium dodecyl sulfate poly acrilamide gel electrophoresis	SDS-PAGE
Superoxyde dismutase	SOD
Tachycardie ventriculaire	VT
Tetra methyl ethylene diamine	TEMED
Tétra méthyl rhodamine méthyl ester	TMRM
Triphényl tétrazolium chloride	TTC
Tris buffered saline	TBS
Troponin C, Troponin T	cTnC, cTnT
Vascular endothelial growth factor	VEGF

Liste des figures

Figure 1. Radicaux libres: métabolites dérivés de l'oxygène	13
Figure 2. Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde.....	15
Figure 3. Balance des activités entre pro-oxydants et antioxydants	16
Figure 4. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés	18
Figure 5. Troubles liés au stress oxydatif	19
Figure 6. Antioxydant neutralisant un RLO	20
Figure 7. Stratégies de conception de systèmes AO	23
Figure 8. Structures moléculaires de la doxorubicine et daunorubicine.....	28
Figure 9. Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline	29
Figure 10. Diffusion passive de la doxorubicine à travers la membrane plasmique	30
Figure 11. Mécanisme d'action des anthracyclines	32
Figure 12. Production de radicaux superoxydes par les anthracyclines	36
Figure 13. Mécanisme de toxicité cardiaque de la doxorubicine dans les cardiomyocytes.	38
Figure 14. Coupes histologiques à travers le myocarde de rat	42
Figure 15. Les différentes voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection.....	56
Figure 16. Les voies de signalisations impliquées dans l'atteinte des cardiomyocytes.....	57
Figure 17. Représentations schématisées du sarcomère cardiaque	60
Figure 18. Défaillance cardiaque suite à l'ischémie.....	65
Figure 19. Altération de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire au cours de l'ischémie.....	67
Figure 20. Effet du calcium et du stress oxydant dans les troubles de la reperfusion.	70
Figure 21. La mitochondrie: source principale de radicaux dans la cellule.....	73
Figure 22. Mécanismes possibles de la dysfonction myocardique post-ischémique.....	74
Figure 23. Phénomènes apparaissant dans les deux phases de l'ischémie-reperfusion.....	81
Figure 24. La fleur du <i>Crocus sativus</i>	86
Figure 25. Les étapes de la culture du safran.....	88
Figure 26. Structure chimique de la picrocrocine, du safranal et de la crocine	91
Figure 27. Formation de la crocétine et de la picrocine à partir de la zéaxantine	91
Figure 28. Formation du safranal à partir de la picrocine.....	92
Figure 29. Rotavapeur et lyophilisation.....	97

Figure 30. Appareil HPLC utilisé	98
Figure 31. Montage de l'électrolyse.	100
Figure 32. Chirurgie d'isolement du cœur	102
Figure 33. Protocole expérimental: électrolyse et doxorubicine	104
Figure 34. Protocole expérimental: toxicité aigüe de la doxorubicine.	105
Figure 35. Protocole expérimental: toxicité chronique de la doxorubicine	106
Figure 36. L'activité du kit pour la détection de la superoxyde dismutase	109
Figure 37. Effet du SAF et de la DOX sur les cardiomyocytes H9c2	111
Figure 38. Effet de la DOX et du SAF sur les cardiomyocytes soumis à l'IR	112
Figure 39. Mécanisme du dosage de la LDH.....	116
Figure 40. La technique de Western blot.	124
Figure 41. Chromatogrammes par HPLC représentatifs des échantillons de safran libanais	129
Figure 42. Effet de la SOD et de la DFX sur le système XXO.....	130
Figure 43. Effet du SAF sur le système XXO	131
Figure 44. Effet de la crocine et du safranal sur le système XXO	131
Figure 45. Effet de la SOD et de la DFX dans le système d'électrolyse	132
Figure 46. Effet du SAF dans le système d'électrolyse.....	132
Figure 47. Effet de la crocine et du safranal dans le système d'électrolyse	133
Figure 48. Effet de différents types d'extraction de safran dans le système d'électrolyse	134
Figure 49. Effet du SAF sur les paramètres cardiodynamique du cœur isolé de lapin.....	137
Figure 50. Pourcentages de variation des paramètres cardiodynamiques suite à Els et DOX.....	139
Figure 51. Tracé type montrant la pression ventriculaire gauche du cœur isolé de lapin.....	141
Figure 52. Tracés type d'épi-ECG.....	142
Figure 53. Taux de LP et activité de SOD suite à Els et DOX.	143
Figure 54. Examen histologique en microscopie optique.....	144
Figure 55. Paramètres cardiodynamiques suite au protocole de toxicité aigüe de la DOX.....	148
Figure 56. Comparaison des pourcentages de récupération hémodynamique	149
Figure 57. Tracé modèle du cœur isolé de lapin soumis à une période d'IR	149
Figure 58. Coupes histologique représentant le tissu musculaire cardiaque coloré à l'HE.....	152
Figure 59. Western blot représentatif de la phosphorylation de AKT, mTOR et 4EBP1.....	154
Figure 60. Western blot représentatif de la phosphorylation de P38	155

Figure 61. Western blot représentatif du niveau de troponine T cardiaque.....	155
Figure 62. Changements des paramètres cardiodynamique LVP et LVEDP	162
Figure 63. Changements des paramètres cardiodynamique CF et HR.	163
Figure 64. Taux de MDA et activité de GPx dans les tissus des cœurs isolés.....	165
Figure 65. Taille de l'infarctus myocardique.....	166
Figure 66. Coupes histologiques de cœurs de lapins colorées au NBT	167
Figure 67. Viabilité des cardiomyocytes évaluée par MTT.....	170
Figure 68. Effet du SAF sur la cytotoxicité induite par la DOX.	171
Figure 69. Effet du SAF, de la DOX et de l'IR sur les cellules H9c2.....	173
Figure 70. Effet de la crocine sur les cellules H9c2.	176
Figure 71. Effet du safranal sur les cellules H9c2.	177
Figure 72. Effet de la crocine et du safranal sur les cellules H9c2 soumises à IR et DOX.....	178
Figure 73. Western blot représentatif de la phosphorylation de AKT, P70S6K et ERK 1/2.....	180
Figure 74. Western blot représentatif de l'expression de l' α -Actinine, Troponine C et MLC	184
Figure 75. Effet du SAF, de la DOX et de l'IR sur la fluorescence TMRM et Hoechst 33342...	185
Figure 76. Effet du SAF, de la DOX et de l'IR sur l'activité des caspases 3.	186

Liste des tableaux

Tableau 1. Tampon d'extraction.....	117
Tableau 2. Anticorps utilisés en western blot.	122
Tableau 3. Composition des gels et tampons pour le western blot.	123
Tableau 4. Comparaison entre les constituants actifs de plusieurs safran	135
Tableau 5. Effet de l'électrolyse, de la doxorubicine et du safran sur les paramètres cardiodynamiques du cœur isolé de lapin	140
Tableau 6. Quantification des arythmies dans les cœurs isolé de lapin soumis à l'électrolyse, la doxorubicine et le safran.	142
Tableau 7. Nombre d'extrasystoles et pourcentages de tachycardie enregistrés suite à la toxicité aigüe de la doxorubicine	150
Tableau 8. Niveaux de la peroxydation lipidique, activité de la superoxyde dismutase et activité de la créatine kinase suite à la toxicité aigüe de la doxorubicine.	151
Tableau 9. Effet du safran et de la doxorubicine sur les symptômes pathologiques suite à la toxicité chronique de la doxorubicine.....	161
Tableau 10. Nombre d'extrasystoles et pourcentages de tachycardie et fibrillation ventriculaire suite à la toxicité chronique de la doxorubicine.....	164

INTRODUCTION ET BUT DE LA RECHERCHE

*« Le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses,
c'est celui qui pose les vraies questions. »*

La doxorubicine (DOX), appartenant à la famille des anthracyclines, est l'un des agents chimiothérapeutiques le plus efficace utilisé dans le traitement d'une variété de tumeurs solides et hématologiques malignes (Judson et al., 2014). Son efficacité antitumorale est dose-dépendante, mais son utilisation clinique est limitée par le développement de cardiomyopathies et d'insuffisances cardiaques congestives (Billingham et al., 1978; Chatterjee et al., 2010).

Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les mécanismes de la toxicité cardiaque induite par les anthracyclines. Il a été reporté que les radicaux libres de l'oxygène (RLO) et la peroxydation lipidique jouent un rôle essentiel dans la cardiomyopathie provoquée par la DOX (Singal & Iliskovic, 1998). En effet, la plupart des études mettent en jeu le rôle du stress oxydatif dans ce processus qui est induit par la formation des RLO découlant de la structure chimique de la DOX ayant tendance à générer des espèces réactives de l'oxygène durant la métabolisation du médicament (Mukhopadhyay et al., 2009; Stërba et al., 2013).

Au niveau des voies de signalisation, il a été clairement mis en évidence que la destinée des cardiomyocytes stressés se base sur deux voies de survie et d'apoptose qui sont altérées dans le myocarde exposé aux anthracyclines. L'activation de la voie PI3K/AKT représente le mécanisme majeur adaptatif de la cardioprotection qui est altérée par les anthracyclines. L'équilibre délicat entre la signalisation pro et anti-apoptotique qui se base sur les voies régulées par des protéines kinases continue à préoccuper les chercheurs lors d'investigations de molécules anticancéreuses sans trouver une solution efficace (Gratia et al., 2012; Montaigne et al., 2012).

Par ailleurs, la prévalence des cancers augmente avec l'âge dans un contexte où les pathologies cardiovasculaires deviennent plus fréquentes (Crivellari et al., 2000). Les patients atteints de maladies cardiaques préexistantes sont généralement exclus ou sous-représentés dans les essais cliniques qui visent à identifier l'efficacité et les effets indésirables potentiels des médicaments. Il est donc important d'étudier les effets hors-cible de la thérapie anticancéreuse d'appoint dans des conditions de stress ou d'ischémie. En effet, il y a très peu de travaux combinant cardiotoxicité des anthracyclines et ischémie-reperfusion du myocarde.

Au cours des dernières décennies, et malgré la découverte de nouveaux composés en chimie de synthèse, les sources naturelles restent le principal fournisseur de nouveaux médicaments et de nouvelles structures chimiques. Nous assistons donc à un regain de la phytothérapie surtout pour

les produits riches en polyphénols, et principalement en flavonoïdes qui ont montré des propriétés biologiques antioxydants intéressantes (Kurek-Górecka et al., 2013; Georgiev et al., 2014).

Dans ce cadre, de nombreuses molécules antioxydantes ont été proposées comme protectrices de la cardiotoxicité (Du & Lou, 2008; Vincent et al., 2013), mais des controverses existent encore sur les études cliniques. Il n'y a donc aujourd'hui aucune substance mise sur le marché qui protège réellement le cœur des effets toxiques des anthracyclines... Ainsi, la recherche d'agents cardioprotecteurs constitue une voie d'exploration toujours ouverte.



Au laboratoire du Stress Oxydatif et Antioxydants (SOA) des résultats intéressants ont été déjà obtenus concernant l'utilisation des extraits de safran, cultivé au Liban, comme un puissant antioxydant efficace contre la génération des radicaux libres par électrolyse in vitro. Partant de ces données et compte tenu de la panoplie d'effets bénéfiques reconnus au safran, une coopération a été lancée entre l'université Libanaise: Equipe Stress Oxydatif et Antioxydants (SOA) et l'université de Reims Champagne- Ardenne : Laboratoire de Signalisation et Récepteurs Matriciels (SiRMa) de l'UMR CNRS 6237 MEDyC.

Notre projet de thèse vise à appréhender sur des modèles animaux :

- 1) La cardiotoxicité aiguë induite par la doxorubicine sur le cœur isolé de lapin sain et ischémique.
- 2) La cardiotoxicité chronique induite par la doxorubicine sur le cœur isolé de lapin par injections intra-péritonéales quotidiennes.
- 3) La potentialité de cardioprotection d'un composé naturel agissant sur le niveau du stress oxydatif (extraits de safran).
- 4) Les incidences des différents traitements associés appréciées au niveau du potentiel redox intracellulaire myocardique, de l'apoptose et des voies de signalisation.

Dans le contexte de la présente thèse en cotutelle entre les deux universités, le travail relatif à l'extraction et aux essais sur cœurs isolés a été réalisé au laboratoire libanais alors que l'analyse des voies de signalisation a été réalisée dans le laboratoire français.

TRAVAUX ANTERIEURS

*« La science n'est pas et ne sera jamais un livre acheté.
Tout progrès important fait surgir de nouvelles questions. Tout
développement révèle à la longue de nouvelles et plus grosses difficultés. »*

I. Radicaux libres et antioxydants

1. Généralités

Il y a à peu près 3 milliards d'années, l'atmosphère de notre planète était anaérobie jusqu'à l'apparition de l'algue bleue-verte. L'oxygène (O_2), sous forme gazeux, apparut ainsi lors de l'avènement de la photosynthèse (Blankenship & Hartman, 1998). Ce gaz, qui est indispensable à la plupart des espèces vivantes, fournit un énorme pouvoir métabolique pour la production d'énergie. Cependant, en raison de sa conformation chimique, la molécule d' O_2 peut, dans certaines circonstances, s'avérer toxique. Cette toxicité est induite par des éléments réactifs, instables et pro-oxydants : les radicaux libres de l'oxygène (RLO) ou espèces réactives de l'oxygène. Dérivés pour la plupart de l' O_2 et produits par divers mécanismes physiologiques; ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Inopportunément, ils peuvent induire des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de substrats biologiques. Afin que les RLO n'exercent pas de façon incontrôlée leurs effets délétères, l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense constitué par les Antioxydants (AO). Dans les circonstances quotidiennes normales, des RLO sont produits en permanence en faible quantité, et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par les AO qui sont produits d'ailleurs en fonction des radicaux générés. La balance oxydants/antioxydants est alors en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en AO ou par suite d'une surproduction de RLO, le déséquilibre observé correspond au "stress oxydatif" (Halliwell, 2013).

2. Les radicaux libres et le stress oxydatif

2.1. Définition et terminologie

Stricto sensu, un radical libre est une espèce chimique (atome ou molécule) contenant un électron non apparié. Il s'agit d'espèces chimiques très réactives, agressives et à durée de vie très courte (10^{-9} - 10^{-6} sec). Ces radicaux cherchent dans leur environnement un électron pour s'apparier en déclenchant alors une série de réactions en chaînes attaquant les structures voisines et aboutissant à des lésions cellulaires irréversibles.

2.2. Différents types de radicaux libres

Parmi les espèces radicalaires qui se forment dans les cellules, on distingue des composés qui jouent un rôle particulier en physiologie et dénommés radicaux primaires. Les autres RLO, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de radicaux primaires sur les composés de la cellule. Les radicaux primaires dérivent de l'O₂ tels le radical superoxyde (O₂^{•-}) et le radical hydroxyl (OH[•]), ou de l'azote tel le monoxyde d'azote (NO[•]). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces réactives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (¹O₂), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des RLO, mais des espèces réactives précurseurs de radicaux (Favier et al., 2003) (figure 1).

2.3. Formation des radicaux libres

1) Le radical superoxyde O₂^{•-} est formé chimiquement par l'addition d'un électron supplémentaire à la molécule d'O₂. Cette réaction peut se dérouler accidentellement dans la chaîne respiratoire mitochondriale suite à la fuite d'un électron de ses transporteurs qui se lie à l'O₂. Les Polymorphonucléaires (PMN) et les macrophages forment la source essentielle d'O₂^{•-} dans les tissus. Ce radical est considéré comme un agent antibactérien. La production se fait par l'enzyme membranaire NADPH oxydase qui catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène générant ainsi l'O₂^{•-}. Il est un radical de faible réactivité pourtant il peut attaquer les tissus et se dismuter spontanément en milieux aqueux pour donner H₂O₂ et ¹O₂. Ces derniers peuvent à leur tour causer des dommages cellulaires (Winterbourn & Kettle, 2013).

2) Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ peut être produit par certaines bactéries pathogènes, par les phagocytes, par la voie de la NADPH oxydase ainsi que par dismutation de l'O₂^{•-}. Malgré que ce soit un faible oxydant, sa capacité à produire des dommages est élevée en raison de son habileté de diffuser librement à travers les membranes. Il a été proposé que le H₂O₂ puisse agir comme un signal métabolique déclenchant des événements intracellulaires pré-inflammatoires (Dröge, 2002).

3) Le radical hydroxyl OH[•] est produit par une réaction entre le O₂^{•-} et le H₂O₂. C'est une procédure complexe catalysée par les ions métaux Fe²⁺ ou Cu²⁺ et résumée par l'équation appelée réaction de Haber-Weiss. Le radical hydroxyl est le plus réactif chez l'homme. Il peut attaquer la membrane cellulaire et préférentiellement l'acide arachidonique (Chen & Schopfer, 1999).

- 4) L'oxygène singlet $^1\text{O}_2$ n'est pas un vrai radical. Molécule instable capable d'oxyder d'autres molécules, elle est très réactive avec les lipides membranaires produisant les peroxydes.
- 5) L'acide hypochlorique est formé par l'action des myéloperoxydases des phagocytes et il est libéré dans le milieu extracellulaire. C'est un fort agent antibactérien, mais il est capable aussi d'interrompre certaines fonctions des protéines même à de très faibles concentrations. La lyse cellulaire s'opère à des concentrations élevées d'acide hypochlorique (Howes, 2006).
- 6) L'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote peut être produit par les macrophages et par l'endothélium vasculaire. C'est l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ qui interagit avec le $\text{NO}^{\bullet}$ et abouti au ONOO^- qui peut endommager les molécules biologiques (Howes, 2006).

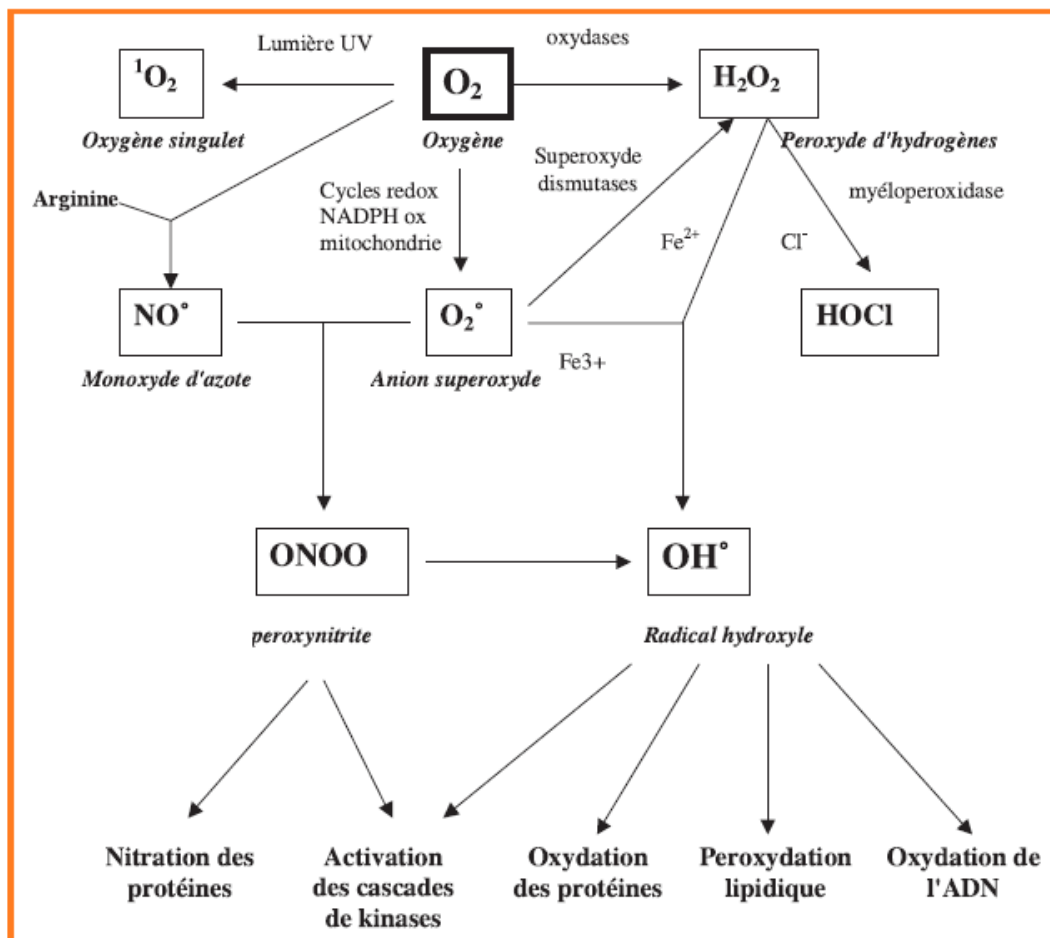


Figure 1. Radicaux libres : métabolites dérivés de l'oxygène (Favier et al., 2003).

2.4. Sources de radicaux libres

2.4.1. Les radicaux libres de source exogène

- 1) Les radiations ionisantes de la lumière: les rayons X et α ionisants sont capables de générer des RLO en scindant la molécule d'eau. Lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets, ils forment des RLO en activant des molécules photo-sensibilisantes.
- 2) Le stress: les facteurs personnels et émotionnels, les traumatismes physiques...
- 3) L'âge: avec l'âge les cellules sont moins actives et produisent ainsi beaucoup plus de RLO.
- 4) Les substances chimiques: les herbicides, insecticides...
- 5) L'alcool, le tabac: ils s'oxydent au niveau du cytochrome P₄₅₀. La fumée de la cigarette contient du fer et du cuivre qui stimule la production des radicaux OH $\cdot$.
- 6) Les médicaments: ceux contenant du fer administrés en grande quantité peuvent conduire à la formation de OH $\cdot$ très toxique pour l'organisme.
- 7) Les particules inhalées: l'amiante, la silice... sont susceptibles d'exacerber la phagocytose (Adly, 2010).

2.4.2. Les radicaux libres de source endogène

De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir la molécule d'oxygène est susceptible d'être à l'origine d'une production de RLO (Hamanaka & Chandel 2010; Alfadda & Sallam, 2013):

- 1) Au niveau des mitochondries (figure 2), au cours du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire, l'O₂ $\cdot^-$ est produit par réaction de l'O₂ avec un radical semi-ubiquinone. Son caractère continu et ubiquitaire pourrait être à l'origine d'un stress oxydatif responsable de dommages dont l'accumulation favoriserait le processus du vieillissement cellulaire.
- 2) Les ions métalliques, comme le fer et le cuivre, sont de remarquables promoteurs de processus radicalaires in vitro : ils transforment le H₂O₂ en radical OH $\cdot$, encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique. En situation physiologique, la concentration libre de fer ou de cuivre est particulièrement basse. En revanche, les destructions cellulaires entraînent une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydatif.

3) Aussi, des RLO sont produits au cours de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes de même que durant le catabolisme de certaines molécules exogènes ou endogènes comme les catécholamines.

4) Parmi les sources importantes de RLO, l'oxydation des médicaments, des drogues ou des composés chimiques au niveau du cytochrome P₄₅₀. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments.

5) Les cellules phagocytaires (PMN et macrophages) possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase spécialisée dans la fabrication du O₂^{•-}. Cette enzyme normalement dormante est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée. La forte consommation d'O₂ qui en résulte est appelée "respiratory burst". Cette production de O₂^{•-} est à l'origine de la synthèse de molécules comme le H₂O₂ ou l'HOCl, indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Cette voie est particulièrement stimulée au cours des processus inflammatoires.

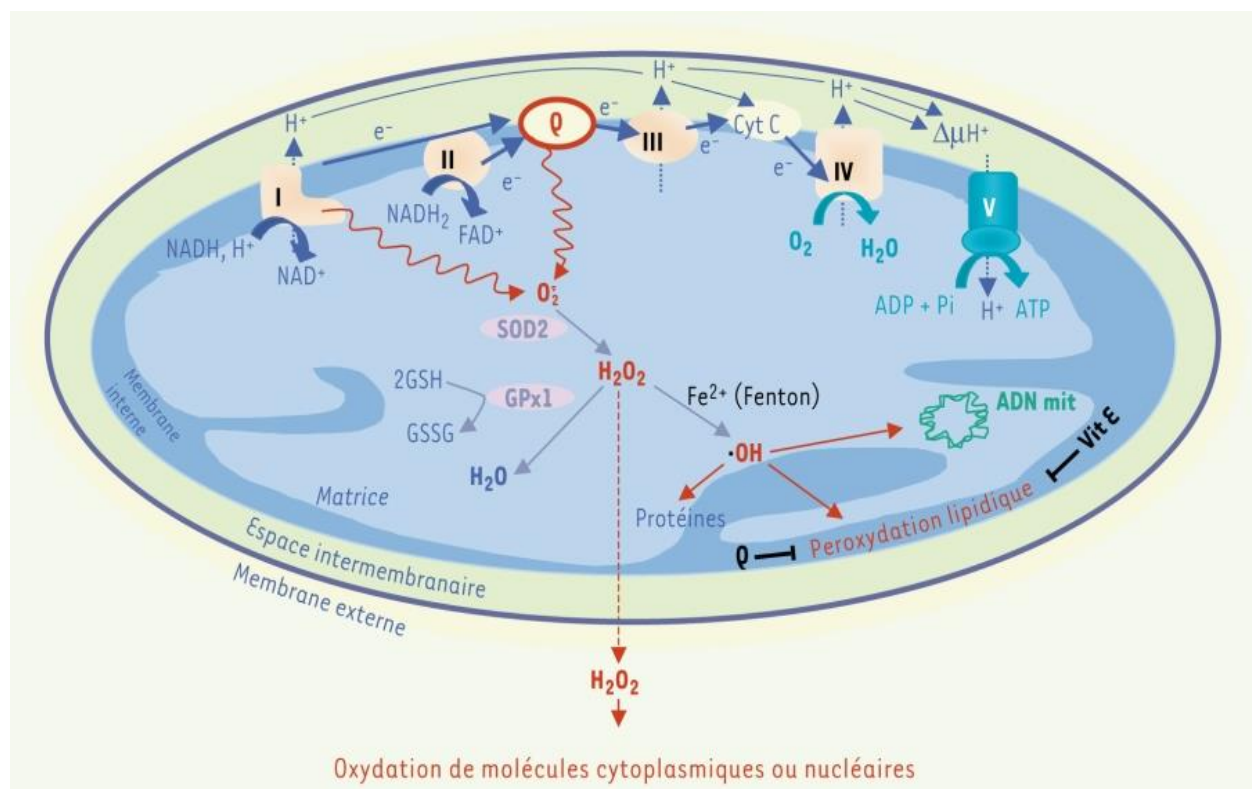


Figure 2. Production mitochondriale et prise en charge de l'anion superoxyde (Carriere et al., 2006).

2.5. Rôle physiologique des radicaux libres

Le paradoxe des RLO provient du fait qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. Ils remplissent en effet de très nombreuses fonctions utiles. Ils participent à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes (phagocytose des bactéries par les macrophages), à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au dysfonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la régulation des gènes, phénomène appelé contrôle redox des gènes... Les RLO pourraient être responsables de l'activation des kinases en cas de réponse à des agressions comme l'irradiation, les cytokines inflammatoires ou les carcinogènes chimiques. Ayant besoin d'une certaine quantité d'espèces réactives de l'O₂, l'organisme ne cherche pas à les détruire mais à contrôler leur niveau pour éviter le stress oxydatif (Dröge, 2002) (figure 3).

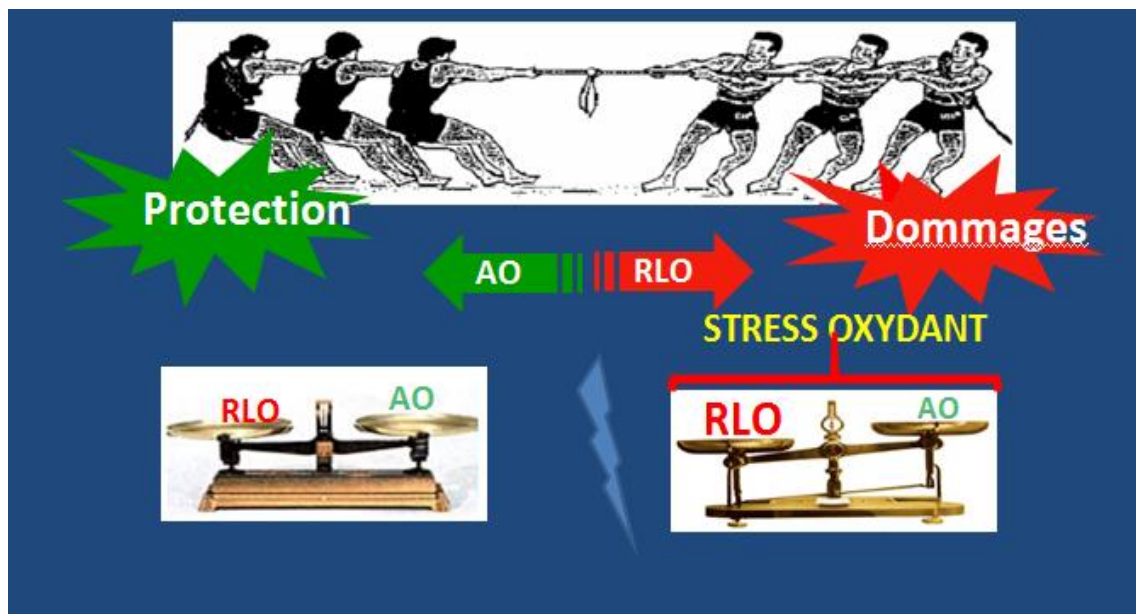


Figure 3. Balance des activités entre pro-oxydants et antioxydants.

2.6. Le stress oxydatif

Les causes essentielles du stress oxydatif sont d'origine (Deshmukh et al., 2013):

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

2.7. Conséquences du stress oxydatif

La production excessive de RLO provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (figure 4). L'organisme peut réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (Therond, 2006; Adly, 2010; Deshmukh et al., 2013).

1) Les lipides

Principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par $\text{OH}^\bullet$ capable d'arracher un H sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne (figure 4). L'attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes aboutissant à la formation de LDL oxydées qui formeront le dépôt lipidique de la plaque d'athérome des maladies cardio-vasculaires alors que l'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction du signal.

Peroxydation Lipidique induite par le radical $\cdot\text{OH}$

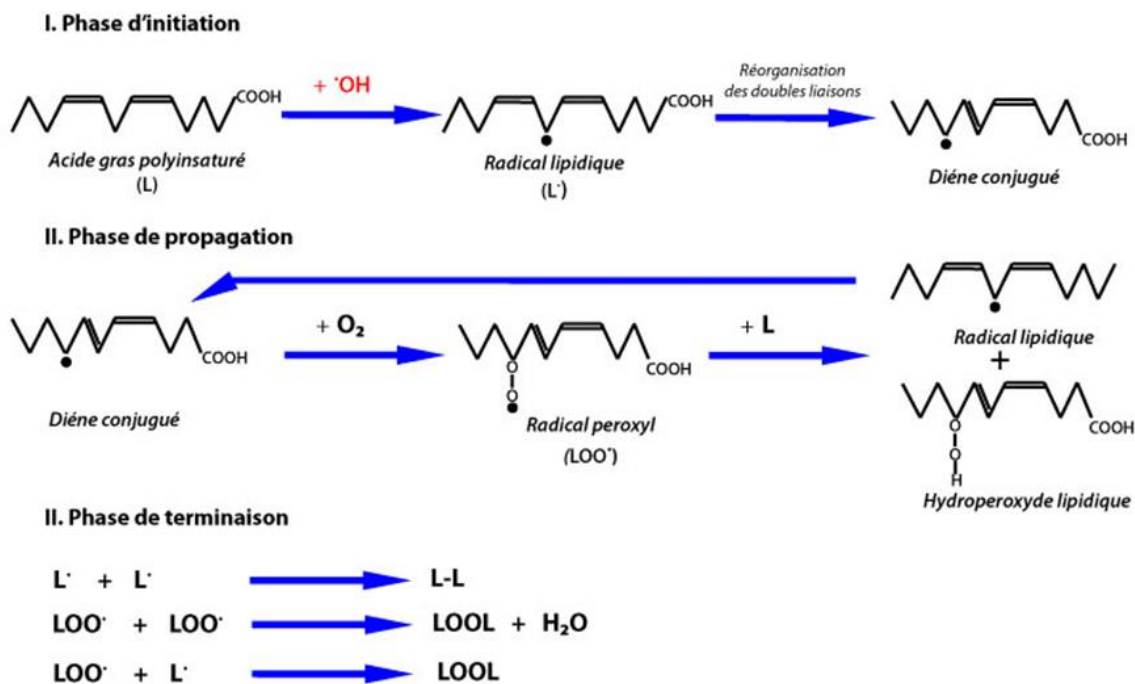


Figure 4. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier al., 2003).

2) L'ADN

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

3) Les polysaccharides

Les RLO attaquent les glycosaminoglycanes et notamment les protéoglycanes. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant du H_2O_2 et $\text{OH}\cdot$, qui entraîneront la coupure des protéines et leur glycation. Ce phénomène est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité des parois vasculaires.

4) Les protéines

De nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport sont oxydées et inactivées et perdent ainsi leurs propriétés biologiques (enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases. Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, elles vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules.

2.8. Stress oxydatif et maladies associées

Le stress oxydatif est impliqué dans l'étiologie de nombreuses maladies; parmi ces maladies on cite les maladies cardiovasculaires, le diabète, la carcinogenèse, les maladies auto-immunes (sclérose en plaque), l'immunodépression (SIDA), les maladies du système nerveux et les maladies neuro-dégénératives (Alzheimer, Parkinson...), les problèmes de vision (cataracte), les troubles rénaux, les maladies respiratoires, les maladies inflammatoires... (Pham-Huy et al., 2008) (figure 5).

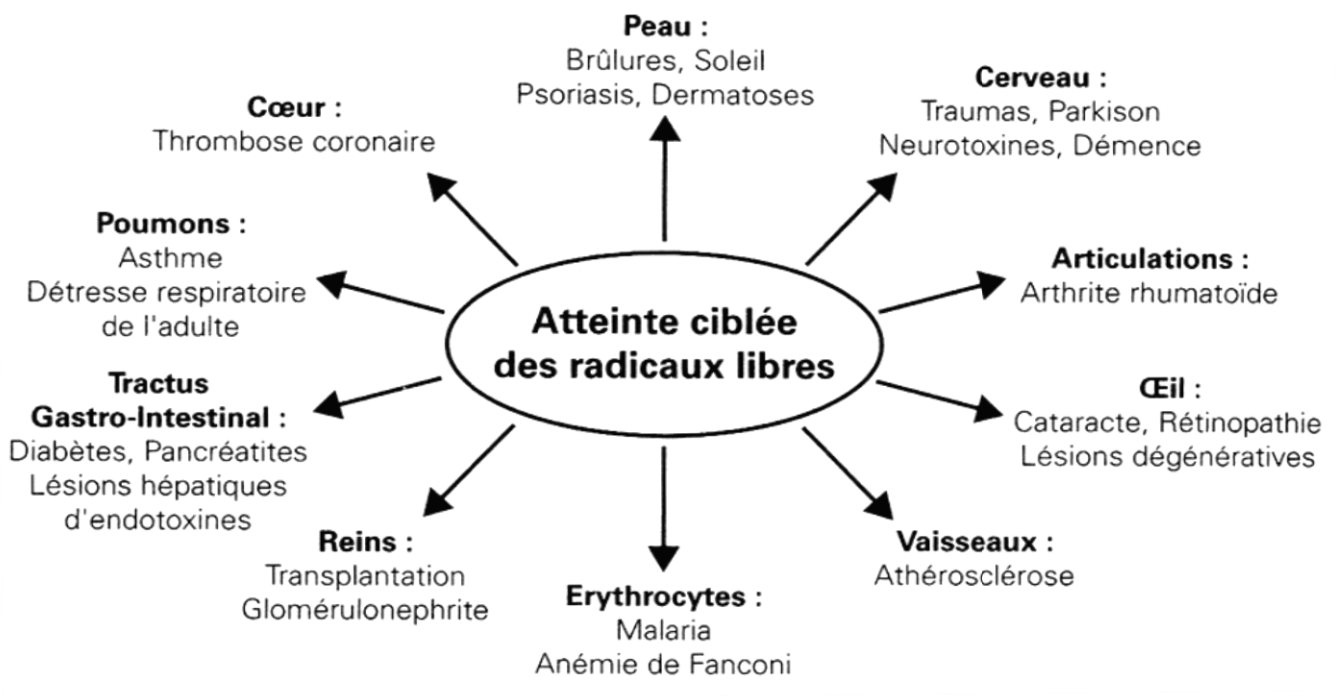


Figure 5. Troubles liés au stress oxydatif (www.lefruitdubienetre.com).

3. Les systèmes de défenses : les antioxydants (AO)

3.1. Définition

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

3.2. Différentes sources d'antioxydants

Il existe deux sources de défenses antioxydantes : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et de légumes riches en vitamine C, vitamine E, caroténoïdes, flavonoïdes... Tandis que l'autre est endogène et se compose d'enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ou de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligo-éléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des co-facteurs importants pour l'activité de certains enzymes AO (Pham-Huy et al., 2008).

3.3. Mode d'action des Antioxydants

Indépendamment de leur localisation, les AO peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de RLO par inhibition directe de leur production ($AO I^{res}$) ou en épurant les RLO ($AO II^{res}$) (figure 6).

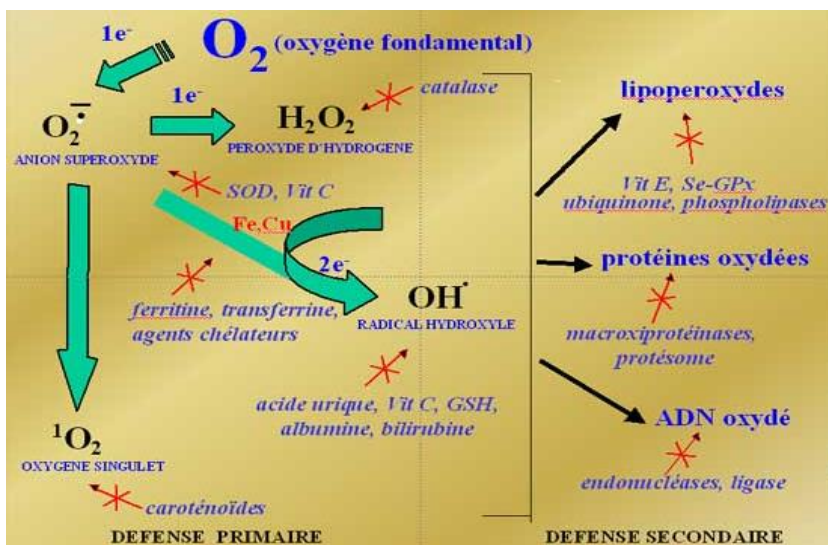


Figure 6. Antioxydants neutralisant les RLO (www.probiox.com).

En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (Obrenovich et al., 2011).

3.4. Le dispositif anti-radicalaire de protection

Les AO sont classifiés selon leur mode d'action. Les AO essentiels comprennent (Obrenovich et al., 2011) (figure 7):

1) Les AO piègeurs "scavengers" : vitamine E (α -tocophérol), vitamine C (acide ascorbique), provitamine A (β -carotène), urate, bilirubine et les substances contenant le groupe thiol.

2) Les AO préventifs : ferritine, transferrine, lactoferrine, céruloplasmine et acide ascorbique. Leur fonction est de séquestrer les métaux de transition et prévenir les réactions de Fenton (réactions d'oxydation au cours desquels le peroxyde d'hydrogène oxyde l'ion fer II aboutissant à la formation du radical hydroxyle).

3) Les enzymes antioxydantes : le système d'enzymes a pour rôle de catalyser des réactions pour neutraliser les RLO (superoxyde dismutase, catalase, et glutathion peroxydase).

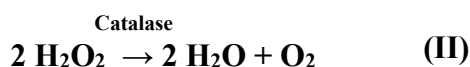
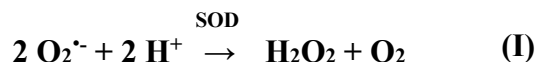
3.5. Les réactions de défense

Le système de défense dépend de la qualité et de la concentration des substances AO disponibles. Il dépend aussi de la concentration des RLO qui peuvent écraser ce système de protection s'ils sont présents en grandes quantités dans les fluides corporelles (Pham-Huy et al., 2008; Wahlqvist, 2013).

1) Le fer et le cuivre sous forme libre étant particulièrement promoteurs de dommages radicalaires, ces métaux sont physiologiquement séquestrés et transportés grâce à des protéines comme la ferritine, la céruloplasmine... qui agissent en tant qu'AO primaires. C'est donc indirectement que ces métaux possèdent une activité antioxydante.

2) Le superoxyde dismutase (SOD) (I) est une enzyme convertissant le superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est secondairement soit dismuté en oxygène et eau grâce à la catalase (II) soit transformé en eau lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion, catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px) (III).

La glutathion peroxydase ainsi que les différents isoformes de superoxyde dismutase sont des métallo-enzymes comprenant soit du sélénium (glutathion peroxydase) soit du manganèse (SOD mitochondriale) soit du cuivre et du zinc (SOD cytosolique).



3) Les AO liposolubles, comme la vitamine E et l'ubiquinol, sont concentrés dans les membranes cellulaires où ils sont particulièrement efficaces pour limiter la peroxydation lipidique. Leur effet protecteur est principalement lié à leur capacité à céder un de leurs électrons pour arrêter la propagation radicalaire tout en étant capable soit de céder un second électron lors d'une réaction d'oxydation conventionnelle soit de se régénérer par le remplacement de l'électron manquant.

4) Dans les milieux hydrosolubles, de nombreuses molécules semblent avoir un pouvoir antioxydant. C'est le cas par exemple de la vitamine C, de l'acide urique et de l'albumine.

Même si les mécanismes de défense sont différents, le dispositif mis en jeu permet d'assurer une protection anti-radicalaire sur l'ensemble de l'espace cellulaire. Tous les acteurs de cette lutte ne sont pas seulement complémentaires, ils sont synergiques.

3.6. Les vitamines antioxydantes

1) Vitamine E

Liposoluble, elle regroupe la famille des tocophérols et se trouve dans l'huile de germe de blé, les autres céréales germées, les légumes verts, la plupart des graines des oléagineuses et les huiles végétales, la margarine, le beurre, le foie, la viande, le jaune d'œuf et les produits laitiers. La vitamine E possède une activité antioxydante. Elle joue un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Au niveau des membranes cellulaires, elle inhibe le mécanisme de peroxydation des lipides et limite l'oxydation des LDL. Par ailleurs la vitamine E diminue le risque de maladie d'Alzheimer. Elle est régénérée par d'autres antioxydants comme l'acide ascorbique et le bêta carotène (Jomova & Valko, 2013).

2) Vitamine C

Elle appartient à la classe des vitamines hydrosolubles et se trouve dans les agrumes, le poivron rouge, la fraise, le brocoli... La vitamine C est un puissant antioxydant, elle intervient très tôt au niveau du plasma pour piéger énormément de radicaux libres comme le $O_2^{\bullet-}$, le H_2O_2 , le $OH^{\bullet}$ pour protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation. Elle est aussi responsable de la régénération de la vitamine E dans le corps. Plusieurs études ont montré que des valeurs de vitamine C inférieures à 4 mg/mL sont associées à un risque accru de développement de maladies cardiovasculaires (Sorg, 2004; Farbstein et al., 2010).

3) Les caroténoïdes

Ce sont des pigments orange, rouge et jaune, liposolubles, synthétisés par les plantes. Ils regroupent les carotènes (dont les lycopènes) et les xanthophylles. Certains caroténoïdes jouent un rôle important dans la synthèse de la vitamine A. Ils présentent des propriétés antioxydantes agissant surtout sur l'oxygène singlet 1O_2 . Une molécule de β -carotène ou provitamine A peut inactiver des centaines de molécules d'oxygène singlet. Les caroténoïdes jouent un rôle dans la prévention et la prise en charge des maladies cardio-vasculaires et du cancer; elles interviennent aussi pour retarder ou minimiser certains symptômes du vieillissement (Fiedor & Burda, 2014).

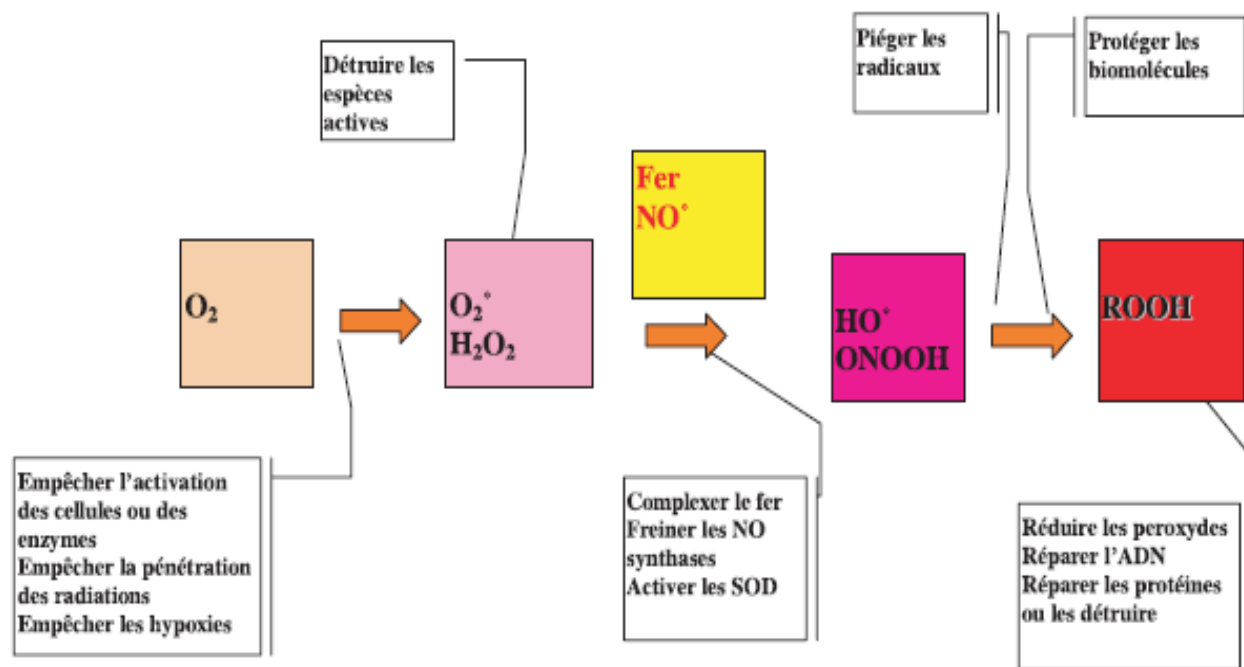


Figure 7. Stratégies de conception de systèmes AO susceptibles de prévenir la formation des RLO ou de permettre leur destruction (Favier et al., 2013).

3.7. Les polyphénols

Les polyphénols constituent une large classe de molécules organiques synthétisées par les fruits et les végétaux (racines, tiges, fleurs, graines, feuilles et fruits). Ils participent à la défense contre les agressions environnementales et ont des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoire, anti-carcinogénique... Les polyphénols sont caractérisés par la présence de nombreux groupes phénoliques arrangés en structures complexes. Ils ont en commun la présence de plusieurs noyaux benzéniques comportant des fonctions hydroxyle. Les polyphénols possèdent un poids moléculaire allant de 500 à 4000 kDa. Ils peuvent se présenter sous la forme de molécules simples comme l'acide gallique ou de polymères comme les tanins. Les polyphénols sont très abondants dans la nature, plus de 8000 composés ont été identifiés à date, pour cela leur classification est très complexe. Ils sont communément subdivisés en phénols simples, acides-phénols (café, thé, bleuets, fraises, grenade, laitue, épinards...), coumarines, naphthoquinones, stilbénoides, flavonoïdes, lignines et tanins (raisin, lentilles, noix...). Les flavonoïdes sont des pigments responsable de la coloration des plantes et des fruits, ils correspondent à la famille la plus large de polyphénols incluant plusieurs sous-classes: anthocyanes (couleur mauve et bleue: bleuet, cerise, mûre, prune, raisins...), flavonols, isoflavones... (Quideau et al., 2011).

Les polyphénols sont une source importante d'antioxydants et exercent cette action par divers mécanismes : ils peuvent former des complexes avec les métaux réactifs tels que le fer et le cuivre ce qui induit une réduction de leur absorption. À première vue, ceci peut sembler être un effet secondaire négatif (réduisant l'absorption nutritive), mais les fortes concentrations de ces métaux dans le corps peuvent favoriser la génération des RLO et contribuer aux dommages oxydants des membranes de cellules et de l'ADN cellulaire. En plus de leur effet de chélation sur des cations en métal, les polyphénols fonctionnent également comme extracteurs efficaces de radicaux libres dans le corps, où ils peuvent neutraliser directement les radicaux libres dans le sang avant qu'ils puissent endommager les cellules (Perron & Brumaghim, 2009).

Les composés phénoliques permettent également de préserver et d'économiser la vitamine E et la vitamine C qui sont eux-mêmes de puissants antioxydants. Ils peuvent en plus inhiber l'activité de certaines enzymes oxydatives comme la cyclooxygénase et la lipooxygénase qui aboutissent à la formation de prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes intervenant dans le mécanisme de l'agrégation plaquettaire et l'inflammation (Takano-Ishikawa & Yamaki, 2006).

II. La doxorubicine et sa cardiotoxicité

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

1. Le cancer

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, à l'origine de 8,2 millions de décès en 2012. Les cancers du poumon, de l'estomac, du foie, du côlon et du sein sont ceux qui entraînent le plus grand nombre de décès chaque année. Par ailleurs, les types de cancer les plus fréquents ne sont pas identiques chez les hommes et chez les femmes. D'après les projections, la mortalité due au cancer devrait augmenter de 50 % d'ici 2030 (OMS, 2013). Loin d'être une maladie récente, des écritures sur le cancer remontent à l'Egypte ancienne (3000 av. J-C). Hippocrate, le père de la médecine (460-370 av. J-C), fut le premier à comparer le cancer à un crabe, il utilisa alors le terme *carcinos* qui provient du mot grec *karkinos*, qui signifie crabe et dont le mot cancer est la forme latine. Cette image représente la façon qu'ont les cellules cancéreuses à adhérer et à se répandre en développant des ramifications ressemblant aux pattes des crabes (Hajdu, 2011). Le terme médical utilisé pour décrire le cancer est *néoplasie* qui provient du grec et signifie nouvelle formation. Le cancer est donc le résultat de la multiplication anarchique de cellules anormales mutées d'un tissu, qui échappent aux mécanismes habituels de différenciation et de régulation lors de leur multiplication. Ces cellules sont capables d'envahir un tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis de migrer dans d'autres compartiments de l'organisme pour former des métastases (Diamandopoulos, 1996; Sudhakar, 2009).

Plusieurs voies thérapeutiques ont été décrites:

1) La chirurgie: c'est un traitement local du cancer qui a pour objectif d'enlever la tumeur et les ganglions, elle peut être conservatrice ou radicale. La chirurgie est utilisée seule ou en combinaison avec d'autres traitements (Weinberger et al., 2012).

2) La radiothérapie: c'est un traitement régional des cancers qui consiste à utiliser des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se

multiplier. Elle a pour but de détruire toutes les cellules tumorales en dirigeant précisément les radiations sur la zone à traiter tout en épargnant les tissus sains périphériques pour les préserver le mieux possible. La radiothérapie peut être utilisée seule ou associée à la chirurgie et à la chimiothérapie. Elle complète la chirurgie en détruisant les éventuelles cellules cancéreuses restantes dans le but de diminuer le risque de récurrence locale (Lancet, 2000; Murphy et al., 2013).

3) L'hormonothérapie: c'est un traitement qui intervient dans les mécanismes hormonaux, pour éviter la stimulation par les hormones de la prolifération des cellules tumorales. En effet, il a été constaté que l'ovariectomie bilatérale améliore les conditions de vie de femmes souffrant de cancer du sein. L'hormonothérapie se fonde sur trois mécanismes d'action: la disparition de l'hormone circulante, l'inhibition de la synthèse du dérivé actif ou le blocage du récepteur hormonal. Elle n'est indiquée que si les dosages des récepteurs hormonaux (oestrogéniques et progestéroniques) dans la tumeur sont positifs (Pouillart, 1998; Padilha et al., 2013).

4) La chimiothérapie: c'est un traitement qui fait appel à la capacité de certaines molécules chimiques à favoriser la mort des cellules cancéreuses par arrêt de la division des noyaux. La chimiothérapie fut initiée pendant la deuxième guerre mondiale mais ce n'est qu'en 1970 qu'apparaissent la majorité des médicaments qui se divisent en : agents alkylants (cisplatine), antimétabolites (5-fluorouracile, méthotrexates), alcaloïdes végétaux (vinca-alcaloïdes, taxanes), inhibiteurs de la topoisomérase et antibiotiques antitumoraux (anthracyclines). Ils affectent la mitose, la synthèse ou la fonction de l'ADN. En clinique, l'usage veut que des molécules à cibles différentes soient utilisées en association. Une soixantaine de produits actifs sont utilisés et parmi eux, les anthracyclines, le sont dans 80 % des traitements. La chimiothérapie présente des effets secondaires touchant en général les cellules à division rapide provoquant des alopecies, nausées, diarrhée et mucites, ainsi qu'une cardiotoxicité, hépatotoxicité, neurotoxicité et néphrotoxicité (Cvitkovic-Bertheault et Rouessé, 1999; Teuffel et al., 2013).

5) Thérapies ciblées: c'est un traitement qui vise à prévenir la croissance tumorale en intervenant avec une cible moléculaire spécifique telle que, par exemple un facteur de croissance indispensable à la prolifération cellulaire. Les progrès récents en termes de biologie moléculaire sur la compréhension des mécanismes cellulaires dans les tissus sains et tumoraux, ont mis en lumière plusieurs processus de transmission de signaux. Ceci a permis l'avènement des thérapies

ciblées anticancéreuses qui englobent la mise au point d'anticorps monoclonaux et d'inhibiteurs capables de neutraliser certains transmetteurs des cellules cancéreuses. Ce traitement sous-entend une plus grande efficacité à des doses pharmacologiques faibles, une toxicité limitée et la possibilité d'individualiser le traitement selon le profil pathologique et moléculaire du patient. De telles voies constituent des cibles idéales, toutefois ces nouvelles thérapies, aussi prometteuses soient elles, sont très spécifiques et coûteuses (Slamon et al., 2011; Roché, 2013).

C'est pourquoi, la chimiothérapie est encore très employée malgré les effets secondaires qui peuvent en résulter. Parmi les agents chimio-thérapeutiques les plus utilisés en milieu clinique pour le traitement de formes variées de cancers, figurent les anthracyclines. Cette famille d'agents anti-tumoraux regroupe de nombreuses molécules analogues. Parmi les anthracyclines les plus prescrits, jusqu'à ce jour, on retrouve la doxorubicine (DOX).

2. La Doxorubicine

2.1. Historique

La doxorubicine (ou adriamycine) est un médicament antibiotique anticancéreux de la famille des anthracyclines. L'histoire de la doxorubicine peut être rapportée aux années 1950, lorsqu'un laboratoire italien "Farmitalia Research Laboratories" était à la recherche d'un composé anticancéreux. Dans ce cadre, une nouvelle souche de bactérie *Streptomyces peucetius* a été découverte, produisant un pigment rouge brillant qui a été isolé. L'antibiotique fabriqué par cette bactérie a présenté une activité anticancéreuse importante contre certains modèles de tumeurs murines. Ainsi, la première anthracycline découverte et utilisée fut la daunorubicine. Le suffixe -rubicine rappelle la couleur rouge intense. Les essais cliniques ont débuté en 1960 et le médicament reconnu un succès dans le traitement des leucémies aiguës et des lymphomes. Mais, en 1967 il a été démontré que la daunorubicine produit une toxicité cardiaque fatale. Des modifications ont été réalisées sur la machinerie génétique des *Streptomyces* pour produire un antibiotique différent. Ils nommèrent le nouveau composé adriamycine, puis a été changé en doxorubicine pour devenir conforme avec la convention pharmaceutique et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974. En 1976, il est apparu une troisième génération

de ces molécules avec l'idarubicine, d'origine synthétique, obtenue en supprimant le radical méthoxyl de la daunorubicine (Kufe et al., 2003; Minotti et al., 2004).

À ce jour, la doxorubicine est la molécule de référence la plus utilisée en chimiothérapie malgré sa cardiotoxicité élevée. Elle possède un large spectre anticancéreux y compris les leucémies, les lymphomes (maladie de Hodgkin) et les tumeurs solides (cancer du sein et de l'ovaire, sarcomes osseux et tissulaires, neuroblastomes) (Tacar et al., 2013).

2.2. Pharmacologie

2.2.1. Structure moléculaire

La structure des anthracyclines comprend deux parties:

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

La doxorubicine (ou adriamycine) a une masse moléculaire de 578.98 Da, elle est composée d'un noyau tétracyclique chromophore relié par une liaison glycosidique à un substitut glucosamine; c'est l'anthracycline de référence (figure 8). La structure particulière des anthracyclines, en l'occurrence la DOX, leur permet d'interagir avec l'ADN et de s'intercaler entre deux paires de bases de la double hélice, ainsi qu'avec les lipides pour lesquels elles ont une forte affinité. Ces molécules réactives sont sensibles aux oxydoréductions cellulaires (Hortobágyi, 1997).

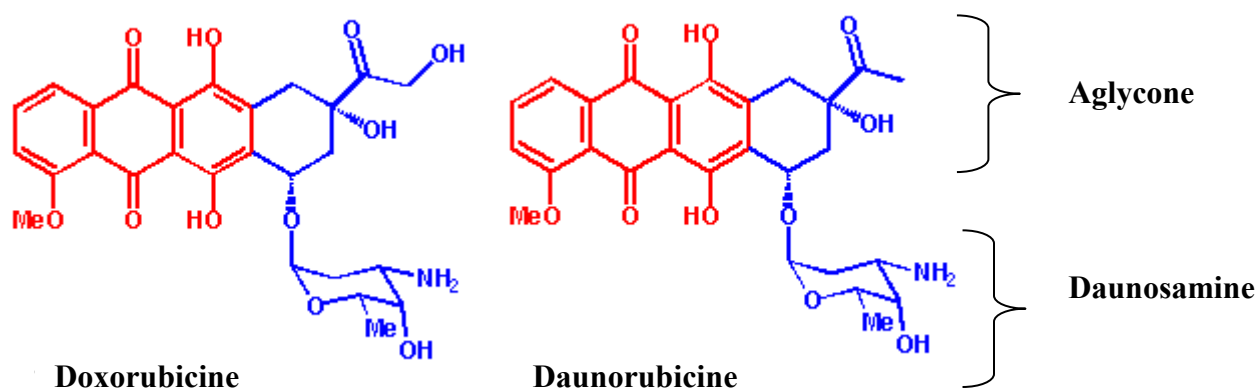


Figure 8. Les structures moléculaires de la doxorubicine et daunorubicine.

2.2.2. Pharmacocinétique

L'hydrophobicité de la doxorubicine associée à sa nature de base faible non chargée lui permet de diffuser passivement à travers la membrane plasmique par un mouvement de flip-flop du feuillet externe au feuillet interne (figure 9) (Ferte, 2000). Elle atteint le noyau toujours par diffusion pour enfin se lier à l'ADN. Au pH physiologique intracellulaire (7.2-7.4), le groupement sucre se charge positivement, ce qui permet de stabiliser la drogue intercalée via des liaisons électrostatiques. Le transport transmembranaire de la doxorubicine associe ainsi une diffusion passive et un efflux actif par la P-glycoprotéine (P-gP) dont le mécanisme d'action n'est pas encore complètement élucidé. Son accumulation intracellulaire est fonction de la cinétique d'incorporation qui dépend des mécanismes d'influx et d'efflux (figure 10) (Gallois et al., 1996).

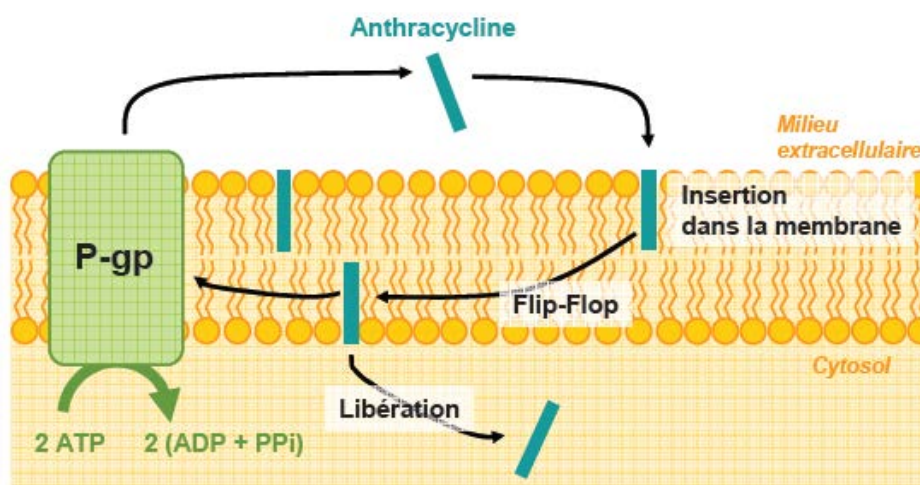


Figure 9. Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline par flip-flop (changement de position des molécules d'un feuillet de la bicouche à l'autre).

Les anthracyclines sont administrées par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée, et en injection rapide, pour éviter une extravasation à côté de la veine qui endommagerait les tissus. Ces substances possèdent une importante diffusion tissulaire et sont rapidement captées par différents organes : cœur, reins, poumons, foie et rate, mais ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique (Hande, 1998).

Les études pharmacocinétiques montrent que la doxorubicine a un profil multiphasique, la phase initiale de distribution est rapide avec un temps de demi-vie entre 5 et 30 min et la phase finale d'élimination est lente avec un temps de demi-vie de 30 à 40 h. Elle est liée à 75 % aux protéines plasmatiques, surtout l'albumine (Campos et al., 2012). La DOX est métabolisée, au niveau du foie, en doxorubicinol, son métabolite actif principal (Lal et al., 2010). Elle est éliminée principalement par voie biliaire, mais également par voie rénale. En effet, 10 à 15 % de la dose administrée sont retrouvées dans les urines, ce qui explique la coloration rouge de l'urine, quelques jours après le traitement (Hortobágyi, 1997; Tannock et al., 2004).

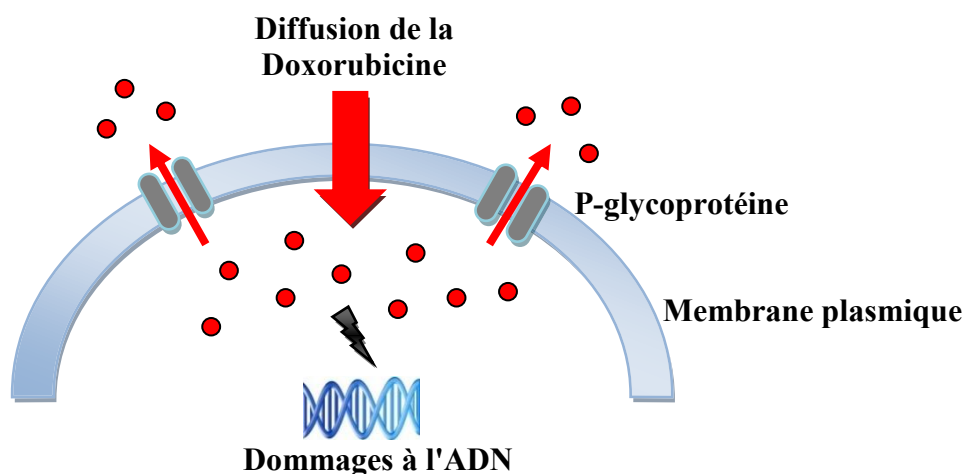


Figure 10. Diffusion passive de la doxorubicine à travers la membrane plasmique et son efflux actif par la P-glycoprotéine.

2.3. Principaux mécanismes d'action

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

1) Intercalation dans la molécule d'ADN: les anthracyclines se lient de façon covalente aux doubles-brins de l'ADN pour former un complexe [ADN-anthracycline]. Ces liaisons se font principalement sur les résidus guanine de l'ADN et sont réversibles. Leur structure multicyclique plane leur permet de former des adduits ou ponts (crosslink) en s'interposant entre deux paires de bases adjacentes dans la double hélice et d'y contracter des liaisons hydrophobes et électrostatiques. En s'intercalant dans l'ADN, les anthracyclines inhibent la réplication, la transcription et donc la synthèse protéique (figure 11) (Szulawska et Czyz, 2006).

2) Inhibition de l'enzyme topoisomérase II : les topoisomérases sont des enzymes chargées de réguler les conversions topologiques de l'ADN. Leur fonction est essentielle durant de nombreuses étapes du métabolisme de l'ADN et permettent le bon fonctionnement nucléaire. Les topoisomérases II induisent des cassures doubles brins transitoires de l'ADN afin de permettre à un segment de l'ADN de passer à travers un autre et ensuite ressouder les segments coupés. Les anthracyclines en s'intercalant à l'ADN stabilisent le complexe transitoire de clivage [ADN-enzyme] et empêchent la religation des brins par les topoisomérases II. Ainsi, la formation du complexe ternaire stable [anthracycline-ADN-topoisomérase II] stabilise les coupures double brins et prévient la topoisomérase II de relier les extrémités libres des segments coupés pour la restitution de la structure tridimensionnelle de l'ADN (figure 11). L'inhibition de cette enzyme provoque un arrêt du cycle cellulaire en G₂/M et la mort cellulaire. Les cellules en phase G₀ ne possédant que peu de topoisomérases II sont peu sensibles à ces agents (Isaacs et al., 1995).

3) Inhibition de la synthèse d'ADN: l'action pro-apoptotique des anthracyclines est en partie initiée par une voie de signalisation impliquant la protéine P53. En effet, la doxorubicine peut induire l'expression de cette protéine de manière dose dépendante. La p53 se fixe sur l'ADN, y active la transcription du gène Bax (médiateur pro-apoptotique), qui induit la libération du cytochrome c par ouverture des pores mitochondrial, et inhibe celle du gène Bcl-xL (médiateur anti-apoptotique). La synthèse d'ADN est donc inhibée (Minotti et al. 2004).

4) Interaction avec les membranes plasmiques: la doxorubicine et les anthracyclines en général ont une très forte affinité pour les membranes lipidiques à travers lesquelles elles diffusent passivement. Elles s'associent directement avec les phospholipides par interactions

ionique. La présence d'anthracyclines au sein de la bicouche lipidique peut altérer la structure et la fonction membranaire en modifiant les interactions lipides-lipides et lipides-protéines, notamment les protéines membranaires impliquées dans les voies de signalisation cellulaires. La doxorubicine peut ainsi exercer son action cytotoxique directement en modifiant les propriétés de fluidité membranaire (Lubgan et al., 2006).

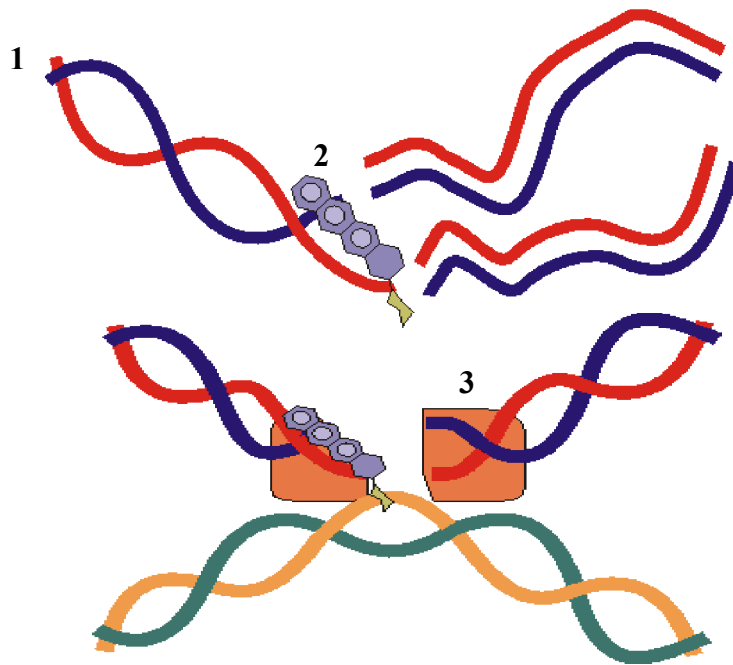


Figure 11. Mécanisme d'action des anthracyclines: intercalation dans l'ADN et stabilisation de l'enzyme topoisomérase II. 1. ADN 2. Anthracycline 3. Topoisomérase II.

2.4. Mécanismes de résistance à la doxorubicine

Les mécanismes de résistances aux anthracyclines sont de deux sortes (Nielsen, 1996) :

- 1) Accompagnées d'une diminution de la concentration intracellulaire du médicament, elles sont dues à la surexpression de P-gp ou d'autres pompes membranaires.
- 2) Non accompagnées d'une diminution de l'entrée du médicament, il s'agit au contraire d'une tolérance de la présence d'anthracyclines dans la cellule par augmentation des mécanismes de détoxification, augmentation de la réparation de l'ADN et inhibition du processus d'apoptose.

2.5. Indications thérapeutiques et toxicité

Le schéma d'administration de la doxorubicine est modulé par la dose, selon la toxicité cardiaque potentielle. Généralement les anthracyclines sont utilisées en association ou en relais avec d'autres agents chimiothérapeutiques comme par exemple, le 5-fluorouracile, le cyclophosphamide, le paclitaxel ou la vincristine. La posologie moyenne est de 40 à 75 mg/m² tous les 3 à 4 semaines. Les cycles sont répétés jusqu'à une dose totale maximale de 550 mg/m². On administre la dose de doxorubicine en 3 à 5 min dans la tubulure d'une perfusion intraveineuse de solution de chlorure de sodium isotonique ou de solution de glucose à 5% en une ou deux fois au cours de la journée (Pfizer, 2012).

Les indications de la doxorubicine sont assez nombreuses:

Cancer du sein (taux de réponse 40 à 50%), cancer de l'ovaire, cancer de la prostate, cancer du foie, cancer de l'estomac, cancer de la vessie, cancer du poumon, tumeurs solides de l'enfant, sarcome des os, leucémies aiguës et chroniques, maladie de Hodgkin, lymphome non hodgkinien et neuroblastome (Polovich et al., 2005).

Les noms commerciaux des principales anthracyclines utilisées en clinique sont:

- Daunorubicine : Cérubidine®, Daunoxome®
- Doxorubicine ou Adriamycine : Adriablastine® (laboratoire Pfizer), Caelyx® (laboratoire Schering-Plough) et Myocet® (Zeneus Pharma)
- Epirubicine : Farmorubicine®
- Idarubicine : Zavedos®
- Pirarubicine : Théprubicine®

Les effets secondaires de la doxorubicine sont:

1) Les effets secondaires divers : alopecie, nausée, diarrhée, vomissement, mucite, œdème, toxicité hématologique (anémie, leucopénie et thrombopénie), neurotoxicité, troubles digestifs, fatigue et immunodépression.

2) Les effets secondaires spécifiques aux anthracyclines : toxicité rénale et cardiaque. La toxicité cardiaque est cumulative et liée à la dose, avec une dose totale maximale tolérée de 550 mg/m² pour la doxorubicine (Bonita et Pradhan, 2013).

3. Toxicité cardiaque

Les anthracyclines représentent un pilier de la chimiothérapie; mais, leur cardiotoxicité est le facteur limitant dans la prescription de cette classe thérapeutique. En effet, l'utilisation des ces drogues s'accompagne d'un risque de 10 à 50 % de cardiotoxicité cumulative se traduisant par une cardiomyopathie. Celle ci pouvant évoluer à plus ou moins long terme vers une insuffisance cardiaque (IC) congestive sévère et irréversible, engageant parfois le pronostic vital alors même que la tumeur est guérie ou contrôlée (Wojtacki et al., 2000; Monsuez et al., 2010).

3.1. Principaux mécanismes de la cardiotoxicité des anthracyclines

Les études ont montré que les anthracyclines ont deux mécanismes d'actions distincts. En effet, l'activité antitumorale et la cardiotoxicité correspondent à des cibles intracellulaires différentes. L'action anticancéreuse est rapportée à un effet intercalant du médicament au niveau de l'ADN et à l'inhibition de l'enzyme nucléaire, la topoisomérase II, inhibant ainsi la transcription et la synthèse protéique. Cependant, cette enzyme est très peu exprimée dans les cellules cardiaques. Ce constat a conduit à la recherche d'autres mécanismes susceptibles de rendre compte de la toxicité cardiaque des anthracyclines (Zhang et al., 2012). Le mécanisme de cardiotoxicité n'est pas totalement connu. Les données les plus convaincantes supposent que les effets secondaires de toxicité cardiaques sont attribués à la génération de radicaux libres (RL) au cours d'une réaction redox entre la forme quinone de l'anthracycline et sa forme semi-quinone qui auraient un potentiel délétère au niveau des cardiomyocytes du fait de leur faible capacité antioxydante (Monsuez et al., 2010). Ceci pourrait être à l'origine des cardiomyopathies développées plus de 10 ans après un traitement par les anthracyclines (De Angelis et al., 2010; Huang et al., 2010). Plusieurs hypothèses ont été avancées:

3.1.1. Production de radicaux libres par les anthracyclines

La pathogénie de la toxicité cardiaque des anthracyclines n'est pas clairement définie; elle est probablement multifactorielle, avec principalement production de RL de l'oxygène et de l'azote, perturbation de l'homéostasie calcique, apoptose cellulaire et modulation de l'expression de certains gènes de la signalisation cellulaire. L'hypothèse du développement d'un stress oxydatif

induit par les anthracyclines est le plus communément admis. L'augmentation de la production de RL associée à une diminution des systèmes de défenses AO serait à l'origine des atteintes irréversibles observées au niveau des cardiomyocytes (Daloz et al., 1999; Floyd et al., 2005). Les oxydants appartiennent à deux familles principales: les espèces réactives d'oxygène, dont le parent est $O_2^{\bullet-}$, et les espèces réactives d'azote, dont le parent est le $NO^{\bullet}$ (figure 12).

1) Formation d'espèces activées de l'oxygène

Le métabolisme de la doxorubicine entraîne l'apparition de RL, principalement l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$. Ces molécules chargées négativement sont très instables et responsables de l'oxydation des lipides polyinsaturés, avec désorganisation membranaire et dysfonctionnement de la respiration mitochondriale. Les cellules myocardiques sont particulièrement sensibles aux RL car elles sont pauvres en agents AO comme la catalase et la SOD (Zucchi et al., 2003). Ces RL sont créés par deux voies différentes :

- La voie de la réduction par les flavine réductases placées au niveau de la membrane mitochondriale avec transformation de l'anthracycline en dérivé semi-quinone puis hydroquinone en cédant des électrons. Les anthracyclines ont une structure de type quinone pouvant subir une réduction par les flavines réductases (cytochrome P450 réductase, NADH déshydrogénase), pour aboutir à la formation d'un dérivé semi-quinone radicalaire et induire une production accrue de RLO (Olson et Mushlin, 1990). Ce dérivé peut subir une réduction en hydroquinone, ou retourner à sa forme initiale en cédant son électron célibataire à l'oxygène, produisant ainsi des radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) (figure 12).

- La voie non enzymatique par la réaction d'Haber-Weiss avec liaison du cation Fe^{3+} avec trois molécules de doxorubicine puis réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} avec transfert d'électrons (Cummings et al., 1991). Cette voie fait intervenir la formation d'un complexe entre les anthracyclines et le fer. Dans la cellule, l'ion ferrique Fe^{3+} est libéré de ses sites de stockage, transferrine et ferritine, par l'attaque des anthracyclines. Le Fe^{3+} se lie alors à trois molécules d'anthracyclines pour former un complexe très stable : $Fe^{3+}-(anthracycline)^3$. Ce complexe subit un cycle d'oxydoréduction, donnant naissance à un complexe radicalaire $Fe^{2+}-(anthracycline)^3$. Ce dernier peut céder son électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire et aboutir ainsi à la formation de radicaux $O_2^{\bullet-}$ (Minotti et al., 1999) (figures 12 et 13).

Figure 12. Production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) par réaction enzymatique d'oxydoréduction de la fonction quinone des anthracyclines et formation de peroxyntrites ($ONOO^-$).



2) Formation d'espèces activées de l'azote

Le NO[•] est produit à partir de L-arginine et d'oxygène par le domaine oxydase de l'enzyme NO synthase endothéliale (eNOS). De plus, sous l'effet de stimuli inflammatoires induit par les anthracyclines, le NO[•] est également produit à partir de L-arginine par l'enzyme NO synthase sous sa forme inductible (iNOS) présente au niveau des macrophages et des cellules vasculaires. Les anthracyclines peuvent aussi être réduites par le domaine réductase des eNOS en dérivé radicalaire semi-quinone qui, en présence d'oxygène, peut conduire à la formation d'O₂^{•-} (Vasquez-Vivar et al., 1997). Les deux radicaux O₂^{•-} et NO[•] sont modérément toxiques individuellement, mais lorsqu'ils sont produits de façon concomitante et en grandes quantités, ils se combinent immédiatement pour former un oxydant puissant, le peroxy-nitrite (ONOO⁻). Celui-ci peut générer le radical OH[•] indépendamment des processus faisant intervenir le fer (Beckman et al., 1990; Pacher et al., 2003) (figures 12 et 13).

3) Effets toxiques cellulaires de la production des RL

Dans les cellules myocardiques, en présence de la doxorubicine, les RL sont formés à des concentrations très élevées ne pouvant pas être prises en charge par les systèmes de détoxification (Pelicano et al., 2004). Les RL sous formes d'anthracyclines radicalaires, H₂O₂, O₂^{•-}, OH[•], ONOO⁻ ou autres jouent un rôle très important dans la cardiotoxicité induite par les anthracyclines. Ils induisent l'oxydation des constituants cellulaires (lipides, protéines, ADN) altérant leurs structures et leurs fonctions (Weinstein et al., 2000).

La peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés est responsable de l'altération et dégradation des fonctions membranaires: elle altère la physiologie des membranes cellulaires en induisant une diminution de leur fluidité membranaire, modifie leur perméabilité aux ions, entraîne l'inactivation d'enzymes et de récepteurs... L'oxydation des acides aminés modifie les structures secondaires et tertiaires des protéines, et entraîne des dénaturations, des fragmentations et la formation d'agrégats (Minotti et al., 2004). L'homéostasie calcique est perturbée, ce qui entraîne une diminution de la contractilité myocardique ainsi qu'un défaut de relaxation par excès du calcium. En effet, les anthracyclines sont responsables d'un relargage intracellulaire de Ca²⁺ à partir du réticulum endoplasmique, ce qui induit une augmentation de la concentration du calcium intra-cytoplasmique (Kusuoka et al., 1991). De plus, les lésions de la

paroi des organites engendrées par les radicaux libres entraînent aussi une surcharge calcique mitochondriale. En effet, le stress oxydatif associé au traitement par les anthracyclines peut induire des lésions mitochondriales ayant pour conséquence une évolution de la cellule vers l'apoptose (figure 13). Des études ont montrés que des souris transgéniques surexprimant la manganèse-SOD (MnSOD), qui est une SOD mitochondriale, acquièrent une résistance à la toxicité des anthracyclines. Ainsi, l'administration de doxorubicine à ces souris n'entraîne pas de lésions cardiaques; suggérant que la prévention du stress oxydatif intra-mitochondrial prévient la cardiotoxicité de cette drogue (Hsiu-Chuan et al., 1996).

Ceci représente les déterminants clés de la signalisation cellulaire dans la réponse à de nombreux stress et la régulation des fonctions cellulaires impliquant la prolifération et l'apoptose (Thannickal et Fanburg, 2000; Yeh et al., 2009).

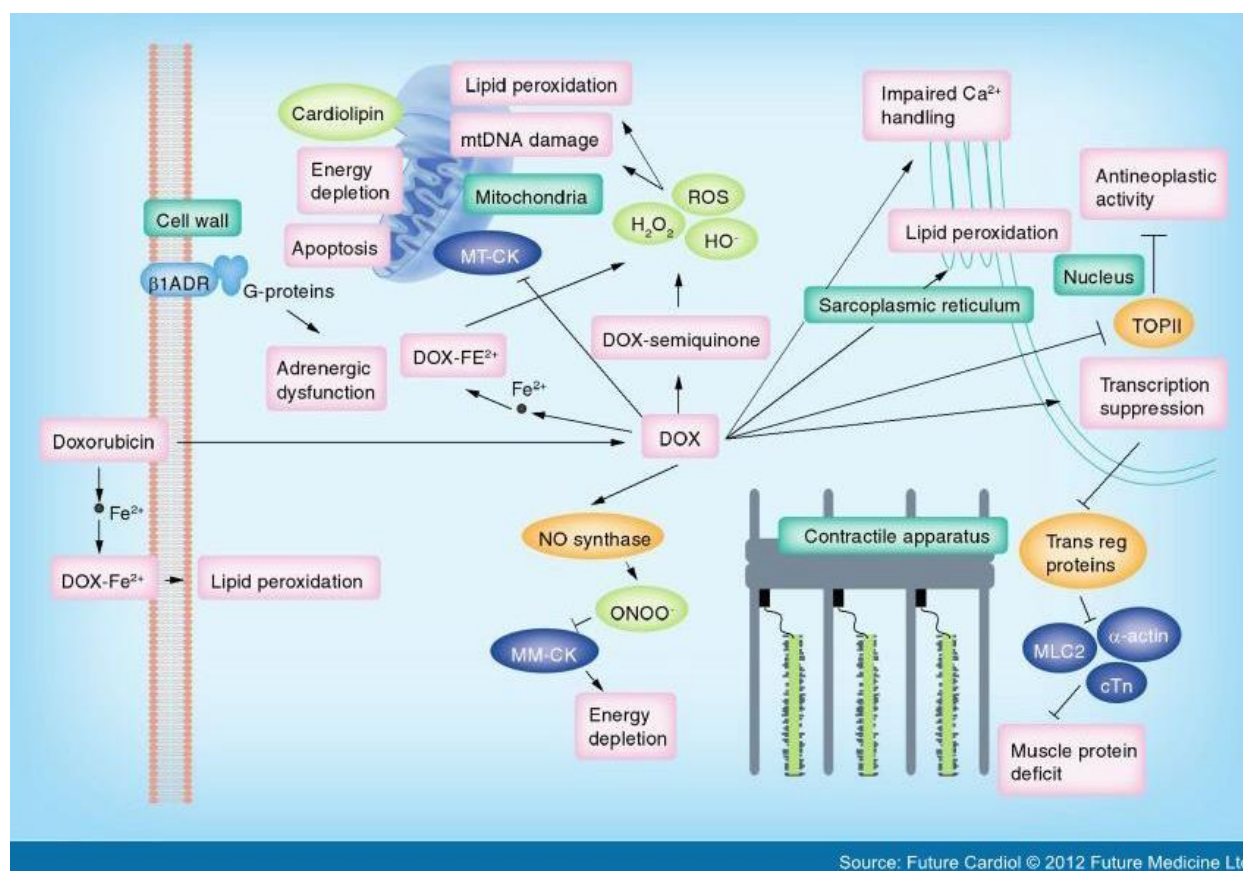


Figure 13. Mécanisme de toxicité cardiaque de la doxorubicine dans les cardiomyocytes.

3.1.2. Apoptose cellulaire induite par les anthracyclines

Une hypothèse physiopathologique est née du fait que les anthracyclines sont de puissants inductrices d'apoptose impliquées dans le développement de l'insuffisance cardiaque. La maîtrise des mécanismes réactionnels cytotoxiques des anthracyclines s'intègre dans la compréhension des processus d'induction de la mort cellulaire (Anversa et al., 1996). Cette voie a été mise en évidence au cours de nombreuses expérimentations in vitro et in vivo qui ont montré que les anthracyclines pouvaient conduire à une perte de cellules cardiaques par apoptose. Il a été démontré chez le rat traité par une dose cumulative de 20 mg/kg de DOX, que l'apoptose peut être induite via une activation de la caspase 3, une augmentation de Bad et une diminution de Bcl-2 (Childs et al., 2002). In vitro, une incubation de myocytes ventriculaires de rat adulte pendant une heure avec de faibles concentrations de DOX (0.1–0.5 μ M) entraîne l'apoptose cellulaire (Depledge et al., 1999). La cardiotoxicité provient de l'action pro-apoptotique initiée par les RLO qui activent la protéine p53. En effet, l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ entraîne l'activation de p53 qui à son tour active Bax pour ensuite permettre l'induction de la cascade pro-apoptotique par ouverture des pores mitochondrial et libération du cytochrome c (Collins et al., 2006). Ainsi, il a été prouvé que l'apoptose induite par la DOX dans les cardiomyocytes est médiée par les RLO via la voie intrinsèque mitochondriale et l'activation des caspases. De plus, l'induction de lésions de l'ADN mitochondrial est à l'origine d'une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale entraînant l'apoptose (Lebrecht et al., 2003). Par ailleurs, la DOX module l'activité de nombreuses protéines comme les facteurs de transcription, les kinases P38, la voie PI3K/AKT... Il est aussi constaté une inhibition par les anthracyclines de l'expression des gènes actine, myosine et troponine codant des protéines qui participent à la contraction du myocarde (Briehl et al., 1997; Zucchi et al., 2003).

3.2. Anatomo-pathologie des lésions cardiaques induites par les anthracyclines

L'administration d'anthracyclines entraîne des lésions au niveau des cardiomyocytes et du tissu interstitiel cardiaque. L'évaluation histologique de la toxicité des anthracyclines a été rendue possible grâce au développement des techniques de biopsie endomyocardique. Macroscopiquement, le cœur endommagé par les anthracyclines est flasque et ses ventricules sont souvent dilatés. L'examen montre un épaississement endocardique et une fibrose

interstitielle. L'administration de DOX entraîne des remaniements importants de la matrice extracellulaire : raréfaction, voir disparition du réseau fibreux périmyocytaire, remplacé par des plaques de tissu fibreux cicatriciel dense. Microscopiquement, des anomalies quantitatives et qualitatives des cardiomyocytes ont été observées (Billingham et al., 1978). Les myocytes apparaissent petits, rétractés avec un cytoplasme présentant une accumulation lipidique, des lysosomes nombreux, une perte myofibrillaire et un aspect vacuolaire par distension du réticulum sarcoplasmique, puis un œdème interstitiel et une dégénérescence nucléaire surviennent, conduisant à la mort cellulaire. Ces lésions pourraient être évolutives même après l'arrêt de la chimiothérapie avec hypertrophie compensatrice des myocytes intacts et fibrose cicatricielle menant à la diminution des capacités de contraction et la rigidification du myocarde (Lefrak et al., 2006). Les cardiomyocytes perdus par nécrose ne sont pas remplacés, mais ceux restant augmentent de taille pour les compenser. La microscopie électronique peut révéler une déplétion en granules de glycogène et des perturbations au niveau des membranes et des crêtes mitochondriales (Singal et Iliskovic., 1998). Ces anomalies sont classées selon un score indiquant 3 stades de gravité, en fonction des lésions histologiques constatées et de la sévérité des altérations. Le stade I correspond aux modifications histologiques quasi obligatoires chez tout sujet traité par une anthracycline au-delà d'une dose cumulative totale (DCT) de 250 mg/m². Des anomalies précoces portant sur moins de 5 % des cellules sont observés. Le stade II correspond à des anomalies portant sur 5 à 35 % des cellules, c'est le score moyen des malades ayant reçu une DCT de 500 mg/m². D'où la remise en cause de la suite du traitement. Le stade III représente une toxicité cardiaque certaine, incompatible avec la poursuite du traitement. Les lésions cellulaires portent sur plus de 35 % des cellules avec altérations sévères: perte totale des myofibrilles, des organites intracellulaires, dégénérescence nucléaire et mitochondriale (Billingham et al., 1978). Il existe une relation linéaire entre le score biopsique et la DCT d'anthracyclines. Le risque de développer une insuffisance cardiaque (IC) est d'autant plus grand que le grade est élevé.

3.3. Aspects cliniques de la cardiotoxicité des anthracyclines

En clinique, la cardiotoxicité induite par les anthracyclines peut être aiguë, sub-aiguë, chronique ou tardive. Selon les manifestations et les conséquences, en fonction du délai d'apparition par rapport à l'introduction de l'anthracycline (Wojtacki et al., 2000).

3.3.1. Cardiotoxicité aiguë et subaiguë

Elle survient immédiatement pendant l'administration de l'anthracycline ou dans les heures et jours après l'injection et consiste en plusieurs types d'effets : les manifestations immédiates de la cardiotoxicité des anthracyclines sont principalement représentées par des troubles du rythme et de la conduction observés chez 30% des patients, des tachycardies sinusales ou des anomalies de l'électrocardiogramme (ECG). Certaines complications aiguës, comme les troubles du rythme ventriculaires, fibrillations auriculaires, troubles de la repolarisation, IC aiguë, tachycardies et fibrillations peuvent être responsables d'une mort subite. L'IC aiguë se manifeste par une péricardite et/ou une myocardite. Ces modifications électrocardiographiques sont très fréquentes, ne semblent pas être dose-dépendantes et sont indépendantes du type d'anthracycline administrée (Nousiainen et al., 2002; Guglin et al., 2009).

3.3.2. Cardiotoxicité chronique

La survenue des signes cliniques est décalée par rapport à l'administration de l'anthracycline. La survenue de cette forme de complication apparaît de 1 à 3 mois après la dernière injection, délai pouvant aller jusqu'à 2 ans. Son risque d'apparition est dépendant de la dose cumulée d'anthracycline reçue par le patient. Elle consiste le plus souvent en une insuffisance cardiaque congestive cumulative de survenue précoce, d'installation progressive, se traduisant par une dysfonction systolique et diastolique du ventricule gauche et s'avère fatale dans 60 % des cas. Elle se présente cliniquement sous la forme d'une insuffisance ventriculaire gauche et une cardiomyopathie dilatée, comprenant une dyspnée d'effort, un œdème aigu du poumon, des sueurs, une toux incessante, une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche, un accroissement de la taille des cavités, un remodelage du ventricule gauche et une altération des fonctions systoliques et diastoliques gauches. La mortalité est importante, mais l'évolution à long terme est variable et peut être marquée par une amélioration de la fonction ventriculaire gauche, une stabilisation ou une aggravation de l'IC (Lipshultz et al., 2005).

3.3.3. Cardiotoxicité tardive

Une cardiotoxicité tardive peut survenir plusieurs années après la fin du traitement, menant à un mauvais pronostic. Le suivi à long terme des patients traités par les anthracyclines a montré,

qu'une forme de toxicité cardiaque pouvait être diagnostiquée plusieurs années après la dernière perfusion d'anthracycline. Le suivi a permis de détecter chez plus de 40% d'entre eux des décompensations très tardives se manifestant par des anomalies électriques et échographiques de contractilité myocardique 20 ans après la fin du traitement par la DOX (Steinherz et al., 1991; Van der Pal et al., 2010).

3.3.4. Histopathologie

Des études anatomo-pathologiques réalisées sur des cœurs de rats ayant reçu la DOX d'une façon aigue, montre des changements structuraux au niveau des myocytes tel que la réduction de la densité des myofibrilles, altération des stries Z et vacuolisation cytoplasmique. Les dommages s'accroissent en cumulant les doses de DOX (figure 14).

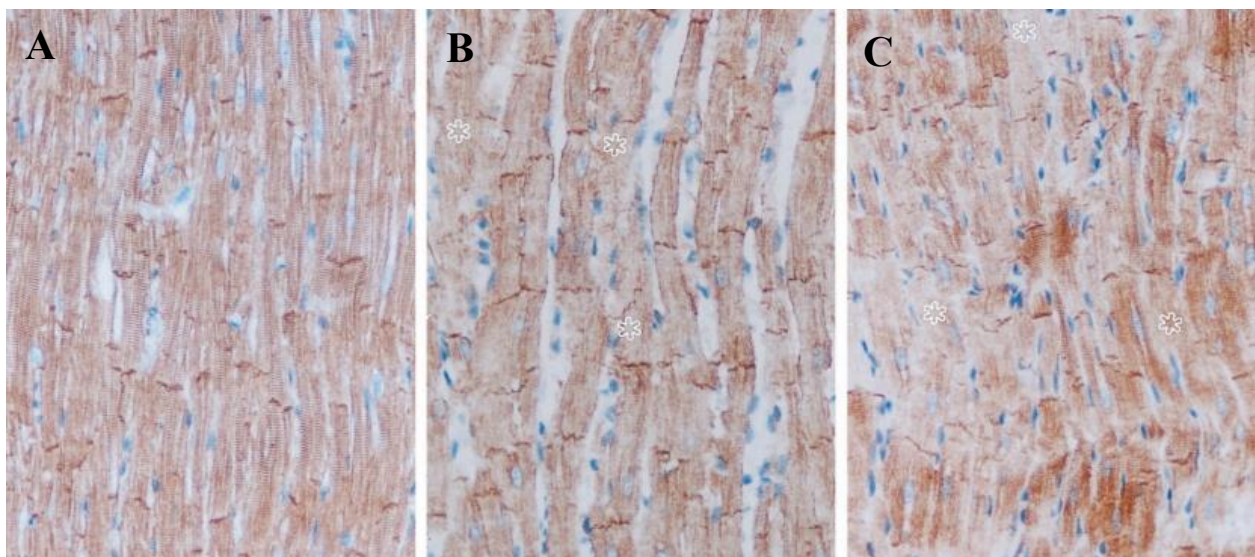


Figure 14. Coupes histologiques à travers le myocarde de rat. A. Cœur contrôle B. Cœur ayant reçu une injection unique de DOX (2.5 mg/kg) C. Cœur ayant reçu une dose cumulative de DOX durant 7 jours (15 mg/kg) (Olli et al., 2000).

3.4. Facteurs de risque cardiovasculaires

Certains facteurs augmentent le risque de développer des complications cardiaques suite à la chimiothérapie. En effet, la toxicité cardiaque après exposition aux anthracyclines est corrélée à la dose totale cumulée de ces drogues bien que soumise à une grande susceptibilité individuelle et à divers facteurs de risque associés.

D'abord, la fréquence de l'apparition d'une insuffisance cardiaque est fonction de la dose de doxorubicine administrée. Elle atteint 7% pour une dose cumulée totale de 550 mg/m², 18% pour une dose cumulée totale de 700 mg/m² et 50% pour une dose cumulée totale de 1000 mg/m². En plus, il est établi que les âges extrêmes (< 15 ans et > 65 ans) représentent aussi un facteur de risque de toxicité cardiaque vis-à-vis des anthracyclines. Le nombre de cardiomyocytes est définitif à l'âge de 6 mois et ceux qui sont détruits ne sont pas remplacés. Ainsi, le traitement d'un enfant par des anthracyclines perturbe le myocarde avec apparition d'une atrophie ventriculaire (Lipshultz et al., 1991). Dans une étude portant sur 115 enfants traités par la doxorubicine pour une leucémie aiguë, 57 % des patients présentaient des anomalies de contractilité du ventricule gauche et 10 % souffraient d'insuffisance cardiaque congestive lors de la première année suivant la fin du traitement (Lipshultz et al., 1991). D'autre part, dans le cancer du sein, la limite de 65 ans a été avancée comme le seuil majorant la cardiotoxicité de la doxorubicine (Doyle et al., 2005; Fumoleau et al., 2006). Deux études rétrospectives portant sur 630 et 2553 patients, ont montré que l'âge supérieur à 65 ans est un facteur de risque d'IC secondaire aux anthracyclines (Fumoleau et al., 2002; Swain et al., 2003). Une surcharge pondérale ressort aussi comme un facteur de risque de toxicité cardiaque (Fumoleau et al., 2006). L'augmentation des doses d'anthracyclines corrélée à la plus grande surface corporelle des patientes en surcharge pondérale semble une cause évidente de ce risque. En outre, l'association simultanée d'une anthracycline avec d'autres composés cytotoxiques majore la toxicité cardiaque. Cela a été notamment décrit avec le paclitaxel, le cyclophosphamide, l'actinomycine D, la mitomycine, la bléomycine, l'étoposide, le cisplatine, le méthotrexate et la vincristine (Wojtacki et al., 2000). En association avec le paclitaxel, il est maintenant conseillé d'éviter une dose cumulée de doxorubicine supérieure à 360 mg/m² et de respecter un délai d'au moins 4 heures entre les deux perfusions (Valero et al., 2001). La radiothérapie préalable est aussi retrouvée comme facteur de risque de la cardiotoxicité des anthracyclines (Ryberg et al., 1998). En effet, l'irradiation mammaire gauche peut augmenter la toxicité myocardique. Une étude à l'Institut National des Tumeurs de Milan portant sur 637 patientes traitées avec la doxorubicine montre une cardiotoxicité de 3% avec irradiation mammaire gauche contre 0,4% sans irradiation mammaire (Zambetti et al., 2001). Il a été montré que les femmes seraient plus vulnérables à la toxicité cardiaque des anthracyclines, avec un risque multiplié par deux par rapport aux hommes (Lipshultz et al., 1995; Krischer et al., 1997). Cette différence serait liée à des variations

métaboliques constatées chez les femmes entraînant un stockage de l'anthracycline dans une masse lipidique plus importante et une diminution de sa clairance (Grenier et al., 1998). Enfin, l'agression du myocarde dans d'autres situations comme le diabète, l'hypercholestérolémie et l'existence préalable de tares cardiovasculaires telles que l'hypertension artérielle ou une cardiomyopathie ischémique, favorise l'apparition d'une IC après traitement par des anthracyclines (Yeh et al., 2004; Carver et al., 2008).

3.5. Prévention et réduction de la toxicité cardiaque des anthracyclines

Les études de suivi évaluent à environ 5 % les patients traités par des anthracyclines et développant une insuffisance cardiaque plusieurs années après le traitement. Il est donc nécessaire d'anticiper le risque de cardiotoxicité dès le début du traitement, en choisissant un schéma d'administration optimal, en respectant la dose cumulée maximale, en favorisant l'emploi d'anthracyclines moins cardiotoxiques ou en prescrivant un cardioprotecteur. Il faut également savoir que la cardiotoxicité potentielle de l'anthracycline pourra être majorée par les thérapies concomitantes. La surveillance attentive en cours du traitement et lors du suivi post-thérapeutique permet le diagnostic précoce de la cardiotoxicité et l'adaptation thérapeutique.

3.5.1. Surveillance de la fonction cardiaque

L'évaluation et la surveillance cardiaque lors du traitement par les anthracyclines a pour but de dépister l'atteinte précoce et d'éviter sa progression vers la dysfonction ventriculaire gauche et l'insuffisance cardiaque. Plusieurs méthodes sont utilisées: l'échocardiographie, l'imagerie isotopique, la biopsie endomyocardique et les marqueurs plasmatiques. La réalisation d'un électrocardiogramme (ECG), la mesure de la fraction d'éjection du ventricule gauche et la fonction cardiaque du patient doivent être surveillés pendant toute la durée du traitement (Remme et al., 2001).

1) L'échocardiographie est l'examen le plus facile. Les anthracyclines altèrent la fonction systolique et induisent une dysfonction diastolique. Il est ainsi possible de constater une augmentation du temps de relaxation isovolumétrique, une diminution de la contractilité ventriculaire une dilatation ventriculaire (Stoddard et al., 1992).

2) L'imagerie isotopique présente des avantages sur l'échocardiographie, elle est plus sensible et plus fiable. Elle montre la baisse de la fraction d'éjection isotopique suite à l'administration de doxorubicine correspondant à une dysfonction ventriculaire gauche latente.

3) La biopsie myocardique montre des modifications histologiques qui sont constantes chez tous les patients ayant reçu une dose totale cumulée de 250 mg/m² d'anthracyclines; alors que l'étude de la fraction d'éjection isotopique et l'échocardiographie peuvent rester normales à ce stade (Doroshov et al., 1991). Les lésions myocardiques restent longtemps infra-cliniques et le premier symptôme se manifeste habituellement à l'effort. En conséquence, l'apparition d'anomalies à l'examen clinique est trop tardive et peu spécifique pour représenter un moyen fiable de surveillance de la fonction cardiaque.

4) La libération de protéines par les cellules cardiaques altérées est un reflet précoce des lésions myocardiques. La libération de peptides natriurétiques comme l'Atrial Natriuretic Peptide (ANP) et le Brain Natriuretic Peptide (BNP), est aussi un signe d'agression myocardique (Perik et al., 2005). En effet, l'utilisation du dosage du BNP comme marqueur biologique semble présenter un intérêt majeur dans l'aide au diagnostic et dans le suivi de l'insuffisance cardiaque (Jeyakumar et al., 2012). De plus, le dosage de la troponine cardiaque, un complexe protéique, pendant un traitement par la doxorubicine, permettrait de sélectionner les patients ayant un risque élevé de développer une toxicité cardiaque. En effet, une diminution de sa concentration est observée suite à la perte des cardiomyocyte (Ewer, 2010).

3.5.2. Modifications des modalités thérapeutiques

1) Développement d'analogues des anthracyclines

L'utilisation d'analogues de la doxorubicine, comme l'épirubicine et l'idarubicine, s'est répandue. L'épirubicine est un isomère de la doxorubicine avec un profil de tolérance plus favorable que celui de la doxorubicine. À la dose de 50 mg/m², la doxorubicine et l'épirubicine permettaient d'obtenir des taux de réponse et des survies identiques. La toxicité cardiaque étant significativement plus faible chez les patientes traitées par l'épirubicine. Par contre, pour les formes de tumeurs les plus graves en situation métastatique, l'utilisation d'analogues moins cardiotoxiques peut conduire à l'augmentation des doses, ce qui n'amène plus un bénéfice car la

toxicité devient équivalente à celle de la doxorubicine à dose classique (Kaklamani et al., 2003; Ryberg et al., 2008).

2) Limitation de la dose cumulée totale

Il est recommandé de limiter la dose cumulée totale des anthracyclines afin de diminuer la cardiotoxicité. Une dose cumulée maximale a été définie pour chaque anthracycline. Cette dose est de 550 mg/m² pour la doxorubicine, 900 mg/m² pour la daunorubicine, 950 mg/m² pour l'épirubicine et 225 mg/m² pour l'idarubicine. Cette stratégie n'est pas suffisante à cause de la grande variabilité des susceptibilités individuelles. Cette limitation peut conduire à arrêter un traitement chez un patient qui pourrait supporter des doses plus importantes sans manifester de cardiotoxicité. De plus, la diminution du pic de concentration maximale ne permet pas d'éliminer le risque de cardiotoxicité, puisque 3 % des patients traités développeront une IC pour des doses cumulées inférieures aux doses limites (To et al., 2003; Van Dalen et al., 2009).

3) Modification du schéma d'administration

Une des approches pour tenter de réduire la toxicité myocardique des anthracyclines consiste à les administrer en perfusion continue. Plusieurs essais cliniques ont été réalisés en utilisant une perfusion continue plusieurs jours de suite plutôt qu'une injection en bolus toutes les trois semaines. L'allongement de la durée de perfusion de doxorubicine n'offrait pas d'avantages en termes de cardioprotection par rapport au schéma d'administration classique. De plus, la toxicité au niveau des muqueuses est beaucoup plus importante; ajoutant à ceci un allongement considérable des durées d'hospitalisation posant des problèmes économiques. De ce fait, cette approche a été abandonnée en pratique clinique (Lipshultz et al., 2002).

4) Formes liposomales

Une méthode substitutive consiste à développer des anthracyclines encapsulées au sein de structures liposomales. En servant de véhicule pour des agents cytotoxiques, les liposomes favorisent leur distribution dans la tumeur en limitant leur diffusion dans les tissus sains. Leur taille les empêche de franchir les capillaires au niveau du cœur, ce qui devrait ainsi nettement réduire le risque de cardiotoxicité (Theodoulou et al., 2004). Des études de phase II ont été

achevées chez l'adulte prouvant la réduction de la toxicité cardiaque tout en conservant l'activité antitumorale; mais aucune donnée de phase III n'existe encore avec les anthracyclines liposomales, des études sont donc à compléter. En revanche, le coût de ces médicaments et leurs modalités de préparation plus longues pourraient être un frein important à une utilisation de plus grande ampleur (Lawrie et al., 2013).

3.5.3. La cardioprotection

L'utilisation d'agents protecteurs vis-à-vis de la toxicité cardiaque des anthracyclines et les voies de protection potentiellement envisagées seront abordées.

1) Antioxydants

Les mécanismes de la toxicité myocardique des anthracyclines reposent sur la production de RL, plusieurs thérapies AO ont été donc proposées afin de limiter la production d' $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 et $OH^{\bullet}$. Les recherches se sont orientées vers plusieurs composés, ayant des propriétés antioxydantes et cardioprotecteurs in vitro. En revanche les approches in vivo sont apparues parfois décevantes.

Plusieurs essais de médicaments cardioprotecteurs ont fait l'objet de publications. Ainsi, des substances antioxydantes comme la N-acétylcystéine, le coenzyme Q, la vitamine C (acide ascorbique) et la vitamine E (α -tocophérol) possèdent des effets bénéfiques sur des modèles de cardiotoxicité induite par les anthracyclines chez l'animal; mais, ils ne préviennent pas les dommages myocardiques chez l'homme (Dorr, 1991). Il existe donc une certaine discordance entre l'importance du stress oxydatif qui induit la cardiotoxicité des anthracyclines et le manque de résultats obtenus en clinique, en ce qui concerne les défenses antioxydantes.

Il a été montré, chez des animaux surexprimant des enzymes possédant une activité antioxydante comme la catalase (Kang et al., 1996) ou la MnSOD (Yen et al., 1996), que les effets cardiotoxiques de la doxorubicine étaient atténués. En effet, la catalase limite le degré des lésions cardiaques après incubation des cellules en présence de doxorubicine. Le rôle des radicaux libres dans la toxicité cardiaque des anthracyclines a été donc confirmé (Lee et al., 1991).

Le probucol est un anti-lipidémiant qui agit aussi en tant que puissant antioxydant; sa structure chimique se rapproche de la vitamine E. Il prévient les lésions myocardiques induites par la

doxorubicine dans plusieurs modèles animaux, en augmentant l'activité de la SOD et celle de la glutathion-peroxydase myocardique, qui sont réduites par les anthracyclines. Aucun décès n'a été observé dans le groupe de rats traités par l'association probucol-doxorubicine contre 32% de mortalité dans le groupe de rats traités par la doxorubicine seule, sans affecter l'activité antitumorale. Cette protection n'est pas obtenue par les autres hypo-lipidémiants, dépourvus d'action antioxydante (Singal et al., 1995; El-Demerdash et al., 2003).

La trimétazidine, est un anti-ischémique ayant des effets protecteurs contre les RL. Administrée de manière adjuvante à la chimiothérapie, elle permet de maintenir la contractilité normale du myocarde en prévenant les perturbations calciques dans le cytoplasme (Piccinini, 1987).

2) Chélateurs de fer

L'association d'un cardioprotecteur du type dexrazoxane (Cardioxane®, laboratoire Iprad) a été étudiée. Son principe d'action majeur est lié à sa capacité de chélater le fer présent au sein des complexes Fe^{3+} -(anthracyclines)³ et ainsi éviter la production de RLO par ce dernier. C'est une prodrogue qui se transforme après pénétration dans la cellule en métabolites chélateurs du fer. Lorsque le dexrazoxane est administré en même temps qu'une anthracycline comme la DOX, le complexe anthracycline/fer formé dans la cellule hydrolyse le dexrazoxane en métabolites dont la structure est proche de celle de l'EDTA. Ces métabolites, piègent le fer intracellulaire et forment un complexe avec l'anthracycline/fer, réduisant ainsi la production de radicaux libres. Ainsi, le dexrazoxane est indiqué dans la prévention de la cardiotoxicité chronique cumulative liée à l'utilisation de la DOX. Ce médicament, doit être administré par perfusion intraveineuse brève environ 30 minutes avant l'administration de l'anthracycline à une dose égale à 20 fois celle de l'équivalent de DOX (Tebbi et al., 2007). Les études montrent que le dexrazoxane prévient la survenue d'une cardiotoxicité dans la majorité des modèles animaux, sans compromettre l'efficacité antitumorale. En effet, le prétraitement avec le dexrazoxane de patientes atteintes de cancer du sein recevant des cycles de chimiothérapie comprenant de la doxorubicine, montre que la diminution de la fraction d'éjection est moins importante dans le groupe recevant le dexrazoxane (2,7%) que dans le groupe témoin (14,7%). De plus, la probabilité de développer des signes de dysfonction ventriculaire gauche échographique ou une insuffisance cardiaque clinique est 2,63 fois plus élevée au cours du traitement de 534 femmes

atteintes de cancer du sein à un stade avancé, lorsque le dexrazoxane n'est pas administré, par rapport aux patientes qui le reçoivent (Swain et al., 1997). En revanche, son utilisation a été interrompue à cause des risques de développement de métastases (Jones, 2008).

D'autre part, la coadministration d'anthracycline et de carvedilol, un bêta bloquant utilisé en clinique dans le traitement de l'IC a conduit à des résultats très intéressants dans la protection de la cardiotoxicité induite par les anthracyclines chez le rat. Cet effet protecteur serait lié à son activité antioxydante et attribué à sa capacité de chélater le fer libre (Oliveira et al., 2004).

3) Accélérateurs de la dégradation des peroxynitrites

Une production excessive de peroxynitrite (ONOO^-) joue un rôle clé dans les lésions impliquant un stress oxydatif telles que l'insuffisance cardiaque, l'ischémie-reperfusion et le traitement par la DOX, présentant un dysfonctionnement ventriculaire gauche (Weinstein et al., 2000). La formation de peroxynitrite est suspectée en pathologie au niveau cardiaque en altérant la fonction cardiaque et dénaturant les protéines contractiles. Dans ces conditions, diverses métalloporphyrines de synthèse capables de dégrader le peroxynitrite en nitrate, ont montrés d'importants effets bénéfiques cardioprotecteurs chez l'animal, et pourraient ainsi représenter de nouveaux agents pharmacologiques dans le traitement de la cardiotoxicité de la DOX. Ces molécules, contenant un métal de transition localisé au centre de leur structure, peuvent mimer l'activité de la SOD et de la catalase. Ils peuvent être efficaces pour prévenir ou traiter les dommages oxydatifs suite à la production d'espèces activées de l'oxygène et de l'azote dans le contexte de l'administration d'anthracyclines (Pacher et al., 2003; Mukhopadhyay et al., 2009).

3.6. Conclusion

La problématique de la cardiotoxicité des anthracyclines se pose de plus en plus en pratique quotidienne. La toxicité cardiaque limite leur utilisation prolongée et induit une cardiomyopathie chronique pouvant évoluer à plus ou moins long terme vers une IC de mauvais pronostic. La prévention de cette cardiotoxicité repose actuellement sur des stratégies de modifications des modalités thérapeutiques ne tenant pas en compte la susceptibilité individuelle. Il est impératif de connaître, avant toute prise en charge, l'état cardiovasculaire du patient, ses antécédents, ses prises médicamenteuses et la toxicité cardiaque potentielle des thérapies proposées. Avec dans

tous les cas une évaluation précise du rapport bénéfice/risque. La protection myocardique nécessitant l'emploi d'agents cardioprotecteurs couplés à la chimiothérapie, tels que des composés pharmacologiques agissant sur le niveau du stress oxydatif, fait actuellement l'objet de recherches poussées, en vue d'une utilisation optimale des anthracyclines.

4. Les voies de signalisation intracellulaires

La plupart des médicaments anticancéreux ont une faible spécificité et affectent les tissus normaux avec une forte cytotoxicité. Les anthracyclines, et plus spécifiquement, la doxorubicine qui est largement utilisée en chimiothérapie contre le cancer, entraîne de sérieux problèmes cardiaques, très documentés, mais dont le mécanisme reste inconnu. Les études se sont focalisées sur l'effet particulièrement nocif de la doxorubicine sur le cœur. Plusieurs chercheurs ont montré qu'elle induit un stress oxydatif, épuise l'énergie et modifie la signalisation cellulaire de cardioprotection (Takemura et al., 2007).

L'activation de plusieurs voies de signalisation a été décrite dans la cardioprotection contre les lésions de reperfusion suite à l'ischémie cardiaque (Hausenloy et al., 2004). Ces voies ont été aussi explorées vis-à-vis de leur participation à la signalisation impliquée dans la protection du myocarde ayant subi les effets délétères de la DOX. Plusieurs études ont confirmés que l'activation de certaines voies de cardioprotection pourraient sauver le cœur des dommages causés par les anthracyclines (Volkova et al., 2011; Octavia et al., 2012).

L'action cardiotoxique de la doxorubicine résulterait principalement d'un impact sur les voies de signalisation impliquant surtout PI3K/AKT/mTOR et MAPK (Zhang et al., 2011). L'approche phospho-protéomique a mis en évidence plusieurs protéines dans un état phosphorylé, impliquées entre autres dans le fonctionnement des cardiomyocytes. Ainsi, les chercheurs ont employé des méthodes in vivo et ex vivo et une approche protéomique pour détecter de nouveaux événements de phosphorylation expliquant la réponse à la doxorubicine. Ces modifications pourraient expliquer certains des symptômes de dysfonctionnement cardiaque causés par le traitement à la doxorubicine (Gratia et al., 2012; Stěrba et al., 2013). Nous allons détailler la voie principale de cardioprotection: la voie RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase).

5. Les stratégies de cardioprotection

5.1. Les activateurs de la voie RISK

Les voies en amont de RISK les mieux caractérisées sont celles activant des récepteurs tyrosine kinase et des récepteurs couplés aux protéines G. Les activateurs connus de RISK sont l'insuline, certains facteurs de croissance, l'angiotensine II, l'endothéline 1, la phényléphrine (Hausenloy et Yellon. 2004), l'érythropoïétine (Bullard et al., 2005), la bradykinine (Bell & Yellon. 2003) et l'adénosine (Maddock et al., 2002). Le préconditionnement (Hausenloy et al. 2005) et le postconditionnement ischémique (Tsang et al. 2004) activent aussi la voie RISK.

1) Les récepteurs tyrosine kinases (RTK) sont des protéines transmembranaires essentielles à la communication cellulaire grâce à leur capacité à la transduction des signaux extracellulaires. Ce sont des enzymes ayant une activité tyrosine kinase intrinsèque, qui catalysent le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule ATP (Adénosine tri-phosphate) à un substrat protéique (Robinson et al., 2000). La famille des RTKs comprend les récepteurs de l'insuline et plusieurs facteurs de croissance (Epidermal Growth Factor Receptor EGFR, Insulin like Growth Factor Receptor IGF...). Les RTKs ont un rôle fondamental dès le stade embryonnaire et au cours de la vie adulte dans de nombreux tissus et organes. Ils contrôlent des processus vitaux tels que la prolifération, la différenciation, le cycle cellulaire, la survie cellulaire et les changements métaboliques (Schlessinger, 2000). Ces récepteurs comportent 3 domaines: un domaine extracellulaire de liaison au ligand polypeptidique, un domaine transmembranaire et un domaine kinase cytoplasmique qui catalyse le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à un groupement hydroxyle d'un résidu tyrosine d'une protéine. La phosphorylation des résidus tyrosine des protéines est une modification post-traductionnelle fortement régulée et qui est importante dans la communication inter et intra-cellulaire. Les ligands peuvent être des facteurs de croissance (EGF, IGF, Vascular Endothelial Growth Factor VEGF, Platelet Derived Growth Factor PDGF...) et des cytokines (interleukines) (Lodish et al., 2000).

De grand progrès ont été accomplis depuis les années 1990 dans la compréhension des voies de signalisation intracellulaires induites par les RTKs. Les deux voies majeures de la signalisation des RTKs sont la voie Ras/MAPK et la voie PI3K/AKT. L'ensemble de ces voies contrôlent l'expression des gènes dans le noyau, régulant ainsi des processus fondamentaux de la

physiologie cellulaire. La coordination de ces processus biologiques variés exercés par les RTKs est sous le contrôle de multiples mécanismes de régulation dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire (Blume-Jensen & Hunter, 2001). Ces récepteurs vont activer les cascades de voies cardioprotectrices, comprenant la voie RISK (figure 15).

2) La voie RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) est constituée de la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol-3-Kinase) et de la voie p42/44MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) ou ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) (figure 14). L'activation de la voie RISK au moment de la reperfusion myocardique induit une cardioprotection en limitant les lésions de reperfusion (qui va être développée plus loin) (Hausenloy & Yellon, 2004). Plusieurs données précliniques indiquent que l'activation de la voie RISK par des agents pharmacologiques (Hausenloy & Yellon, 2004; Hausenloy & Yellon, 2007) ou par des interventions tels que le préconditionnement ou le postconditionnement (Hausenloy et al., 2005) peut entraîner une réduction de plus de 50% de la taille d'infarctus. De même, plusieurs études ont montré que l'activation de PI3K/AKT et ERK/MAPK pourrait diminuer les effets secondaires de la toxicité cardiaque due au traitement par la doxorubicine (Chan et al., 2011; Gharanei et al., 2013).

- Au niveau cardiaque, le rôle protecteur de la PI3K contre les effets délétères des lésions de reperfusion passe par l'activation de AKT qui à son tour active mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) (figure 14). PI3K est un hétérodimère à activité kinase constitué de deux protéines: une sous-unité régulatrice p85, et une sous-unité catalytique p110. L'activation de la PI3K est associée à une cardioprotection et à une réduction de l'apoptose. En effet, son inhibition pharmacologique par la wortmannine ou le LY294002 bloque son effet cardioprotecteur lors du préconditionnement (Matsui et al., 2001; Uchiyama et al., 2004). De même, PI3K apparaît être cardioprotecteur vis-à-vis du traitement par la doxorubicine puisque son activation diminue l'apoptose des cardiomyocytes et augmente la survie cellulaire (Negoro et al., 2001; Kim et al., 2008). AKT (ou protéine kinase B) est une sérine/thréonine kinase qui contrôle une grande variété de réponses cellulaires, incluant l'inhibition de l'apoptose, la régulation de la prolifération cellulaire, et l'hypertrophie liée au stress (Hanada et al., 2004). En effet, il a été montré sur un modèle de cultures primaires de myocytes ventriculaires de rat, que l'expression d'un dominant négatif d'AKT bloque la protection cardiaque lors de la reperfusion (Uchiyama et al., 2004). De plus, il a été démontré que l'activation de AKT pourrait diminuer les lésions

cardiaques consécutives au traitement par la doxorubicine (Maruyama et al., 2011). mTOR est une sérine/thréonine kinase impliquée dans une grande variété de fonctions cellulaires, incluant la progression et le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. En effet, Shen et al., ont démontré que des souris knock out pour mTOR possèdent des fonctions cardiaques altérées (Shen et al., 2008). De plus, mTOR est capable de moduler la phosphorylation et l'activation de p70S6K et de 4EBP1 (4E-Binding Protein 1). p70S6K est une cible de mTOR impliquée dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et a un rôle anti-apoptotique. En effet, l'activation de p70S6K induit la phosphorylation de Bad et inhibe son rôle pro-apoptotique (Harada et al., 2001). De plus, il a été démontré que mTOR et p70S6K jouent un rôle important dans les cardiomyopathies induites par la chimiothérapie (Hosono et al., 2010). Une autre cible importante de mTOR est la protéine 4EBP1, qui est un régulateur négatif du facteur eIF4E (Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E), lui-même régulateur de la traduction et inhibiteur de l'apoptose. La phosphorylation de 4EBP1 par mTOR résulte en une dissociation de eIF4E, suivi par la suppression de l'effet inhibiteur de 4EBP1 sur l'initiation de la traduction dépendante de eIF4E (Zhang et al., 2010).

- En réponse à différents stress, une cascade de sérine/thréonine protéines kinases, regroupées sous le terme de Mitogen Activated Protein kinases (MAPK), est activée. Ces protéines phosphorylent les résidus sérine et thréonine des protéines cibles, affectant ainsi l'expression des gènes, la mitose, le métabolisme et la mort cellulaire (Michel et al., 2001). Parmi ces MAPK; ERK et P38 MAPK sont celles identifiées dans le myocarde (figure 14). ERK (aussi nommée ERK1/2 ou p42/44 MAPK) est un membre de la famille des MAPK, c'est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation de la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Parmi les cinq isoformes d'ERK identifiées, ERK1 et ERK2 sont les deux formes les plus abondamment exprimées au niveau cardiaque (Lips et al., 2004). ERK1/2 sont les effecteurs des MEK1/2 qui sont elles-mêmes des effecteurs de Raf. La voie de signalisation Raf / MEK1/2 / ERK1/2 est activée par Ras, qui est responsable de plusieurs fonctions telles que la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Ces fonctions dépendent de la nature des stimuli et du type cellulaire (Rafiee et al., 2005). Durant la reperfusion, l'activation de ERK conduit à l'inhibition du mPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore) et à la diminution des lésions cardiaques (Ping et al., 1999). De plus, ERK peut phosphoryler, et donc inactiver la protéine pro-apoptotique Bad, libérant et activant ainsi les protéines anti-apoptotiques Bcl-xL et Bcl-2. Le

préconditionnement augmente la phosphorylation de ERK et préserve les fonctions du myocarde (Baines et al., 2002). En outre, les études ont montré que la phosphorylation de ERK peut aussi protéger le cœur contre les dommages induits par la doxorubicine (Liu et al., 2008; Tassigny et al., 2008). P38 MAPK est un membre de la famille des protéines kinase, activée par le stress et notamment lors de l'ischémie-reperfusion myocardique. Elle est impliquée dans la différenciation cellulaire et la cascade de signalisation pro-apoptotique. Il a été montré que l'ischémie entraîne la phosphorylation, et donc l'activation de la P38 MAPK conduisant ainsi à un effet délétère; alors que le preconditionnement inhibe la P38 et conduit à un effet cardioprotecteur (Chen et al., 2001). De plus, l'implication de P38 dans la cytotoxicité de la doxorubicine au niveau des cardiomyocytes a été confirmé par plusieurs études (Guo et al., 2013). L'inhibition de P38 par un inhibiteur spécifique, pourrait avoir un effet anti-apoptotique considérable au niveau du myocarde traité par la doxorubicine et ainsi améliorer les fonctions cardiaques (Wold et al., 2005).

5.2. Inhibition du mPTP et mécanisme anti-apoptotique

L'apoptose est une mort cellulaire programmée durant laquelle les cellules déclenchent leur autodestruction. On distingue 2 voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire: une voie extrinsèque, impliquant des récepteurs membranaires et une voie intrinsèque, mettant en jeu la mitochondrie qui a un rôle centrale dans les mécanismes de l'apoptose. Ces deux voies conduisent à l'activation des caspases. De par leur importance dans la production énergétique, les mitochondries occupent une place prépondérante dans la viabilité de la cellule. Ainsi, lors de l'apoptose, on observe une modification de la perméabilité membranaire mitochondriale liée à une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$), une ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) et la libération dans le cytoplasme de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c (cyt c) (Ruiz-Meana et al., 2009) (figure 16).

Durant l'ischémie-reperfusion myocardique, les études ont montré que lors des premières minutes de la réoxygénation tissulaire, il se produit une explosion de la production de RL, avec une prépondérance pour le peroxy-nitrite qui est reconnu comme étant impliqué dans les lésions de reperfusion (Roberts et al., 1990; Pacher et al., 2007). Cette augmentation radicalaire peut initier la peroxydation des acides gras de la membrane mitochondriale conduisant à une

ouverture des pores mPTP et à la diminution du potentiel membranaire $\Delta\psi_m$. Le maintien de l'ouverture du mPTP provoque un gonflement qui a pour conséquence une perte de tous les gradients ioniques indispensables à la phosphorylation oxydative responsable de la synthèse d'ATP et donc de la survie cellulaire. L'ouverture de ces pores est connue comme étant induite par la combinaison d'une surcharge calcique et du stress oxydant. Ainsi, les travaux ont démontré que la perte du $\Delta\psi_m$, l'ouverture du mPTP et la libération du cyt c sont à l'origine de la mort cellulaire durant la séquence d'ischémie-reperfusion (Griffiths & Halestrap, 1995). De plus, il a été prouvé que l'inhibition du mPTP permet de lutter contre les lésions du myocarde induites par la reperfusion (Hausenloy et al., 2003). D'autre part, des études ont aussi montré l'implication de l'ouverture du mPTP dans les lésions cardiaques suite au traitement par la doxorubicine (Montaigne et al., 2012). L'inhibition de l'ouverture de ces pores pourrait, entre autres, protéger le cœur contre les dommages de la chimiothérapie (Javadov et al., 2009; Gharanei et al., 2013). En effet, plusieurs stratégies de cardioprotection ont été développées pour diminuer les lésions cardiaques dues à la doxorubicine en ciblant spécifiquement les dysfonctions mitochondriales (Ahmed & El-Maraghy, 2013).

L'ouverture du mPTP semble être contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 qui regroupe des protéines pro-apoptotique (Bax, Bad et Bid) et anti-apoptotique (Bcl-2 et Bcl-xL). L'activation intrinsèque de l'apoptose conduit à l'insertion des protéines pro-apoptotique dans la membrane des mitochondries et la formation des complexes provoquant la rupture de ces membranes. Alors que Bcl-2 et Bcl-xL jouent un rôle anti-apoptotique à la surface de la mitochondrie en prévenant le relargage de cytochrome c dans le cytoplasme et empêchant l'activation des caspases. En outre, l'activation de la voie RISK s'est avérée cardioprotectrice par un mécanisme incluant l'inhibition de l'ouverture des pores mPTP. Ainsi, la limitation de la taille d'infarctus suite à l'activation de la voie RISK passe par un processus anti-apoptotique via l'inhibition des protéines pro-apoptotique Bax et Bad, l'inhibition de l'activité de la caspase 3 et l'activation des protéines anti-apoptotique Bcl-xL et Bcl-2 (Yellon & Baxter., 1999). En effet, l'inhibition de ces voies apoptotiques a montré une diminution de la cardiotoxicité de la doxorubicine et une amélioration des paramètres cardiaques (Negoro et al., 2001; Tacar et al., 2013) (figure 15 et 16).

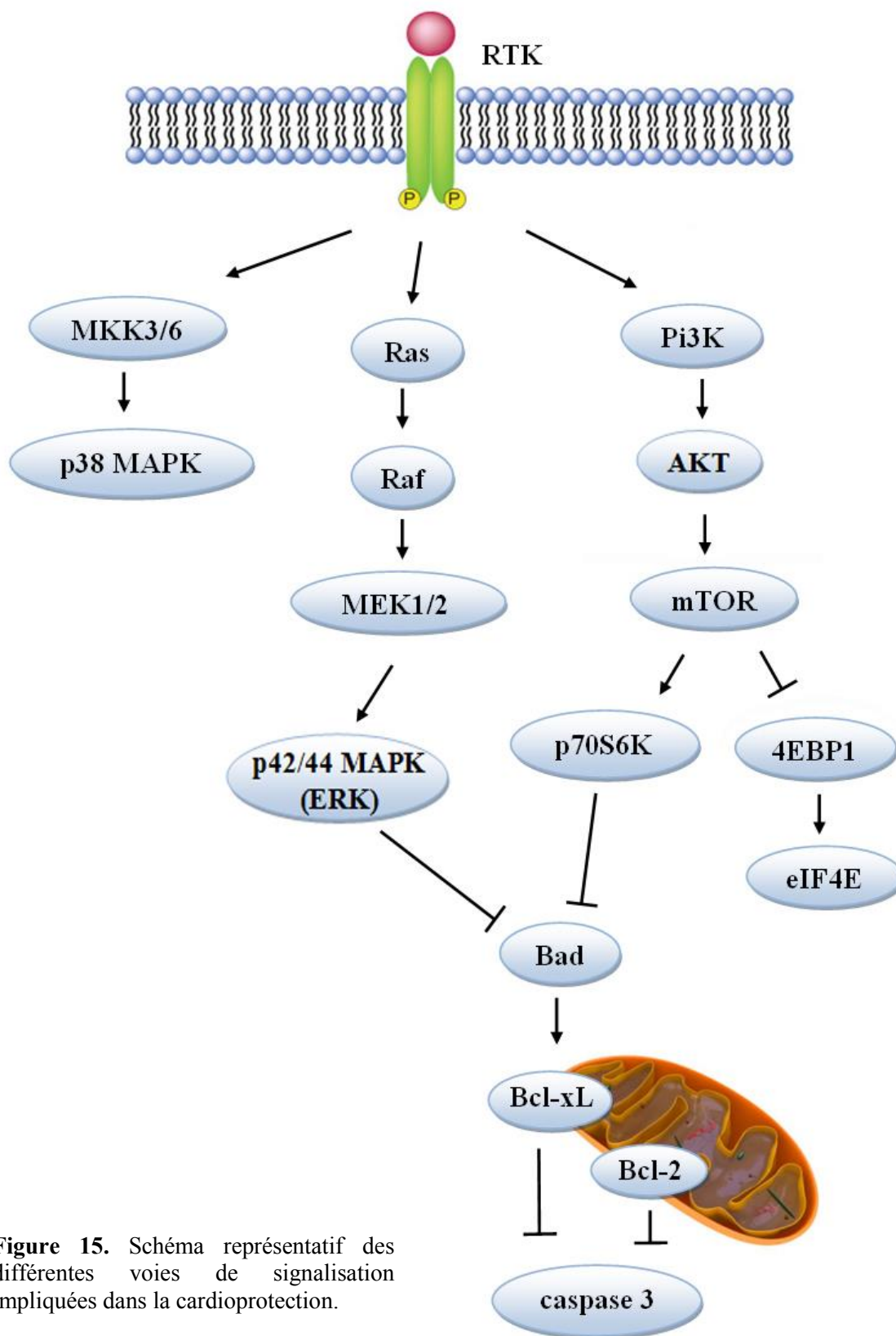


Figure 15. Schéma représentatif des différentes voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection.

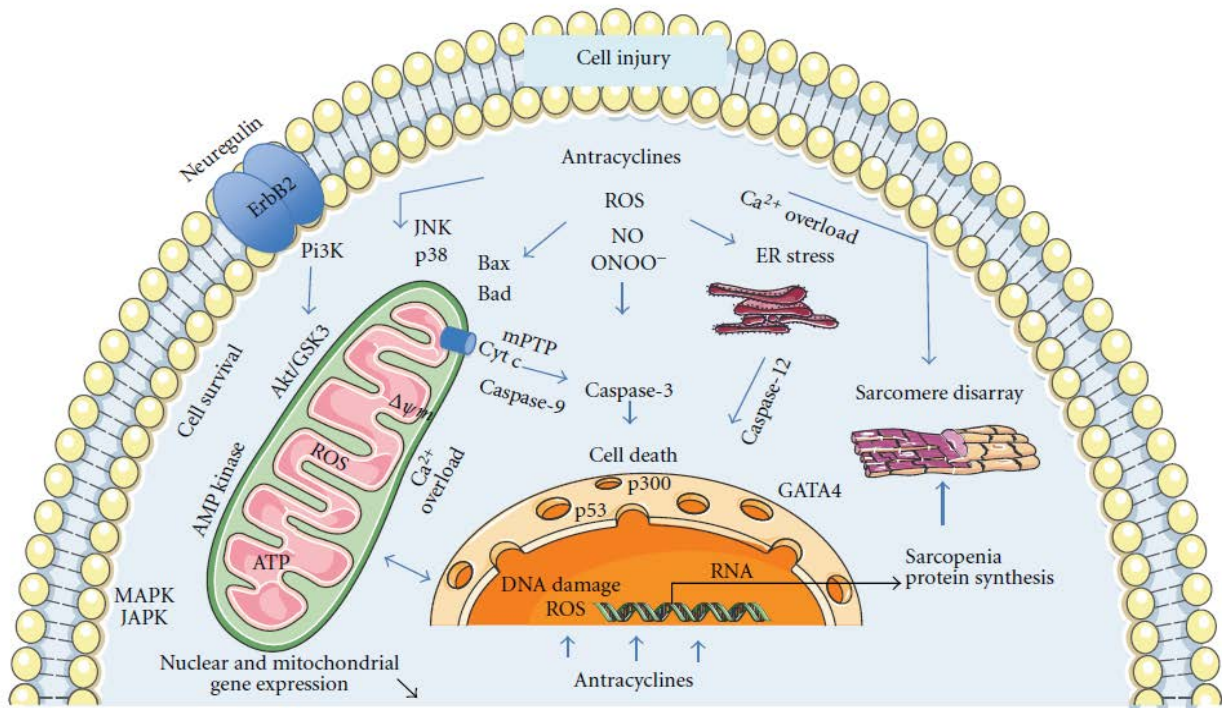


Figure 16. Les voies de signalisations potentielles impliquées dans l'atteinte des cardiomyocytes induite par les anthracyclines (Montaigne et al., 2012).

La mort cellulaire induite par les anthracyclines est contrebalancée par l'activation des voies de signalisation de cardioprotection incluant PI3K/AKT et MAPK jouant un rôle crucial dans la survie des cellules cardiaques. Le mécanisme principal de cardiotoxicité est lié à la génération de radicaux libres induisant la peroxydation lipidique et des dommages membranaires. Le stress oxydatif (NO et ONOO⁻) module les voies kinases (MAPK, PI3K et JNK) et active les voies de l'apoptose (P38, Bax, Bad et caspase). Dans les mitochondries, les radicaux libres et la surcharge de calcium provoque la sortie du cytochrome c (cyt c) de la mitochondrie dans le cytoplasme par les pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) avec pour résultat la dissipation du potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$), l'activation des caspases et l'apoptose. D'autres mécanismes incluent des dommages à l'ADN, la perturbation du sarcomère et la modulation de l'activité des facteurs de transcription (GATA-4, p300 et p53) qui régulent l'apoptose, la différenciation cellulaire, la survie cellulaire, la synthèse des protéines du sarcomère et le métabolisme énergétique (figure 16).

5.3. Interaction avec les myofilaments

Un mécanisme envisagé pour expliquer la cardiotoxicité des anthracyclines, accorde la place prépondérante aux interactions avec les myofilaments, qu'il s'agisse d'une dénaturation intracytoplasmique ou d'une altération de leur transcription. Ainsi, l'atteinte des myofilaments, étayé par plusieurs modèles expérimentaux, a permis de montrer l'apparition de modifications au niveau de l'expression des protéines contractiles: actine, myosine, troponine, α -actinine et créatine-kinase lors de l'administration d'anthracyclines. En effet, ces protéines cardiaques sont préférentiellement réduites, ce qui pourrait rendre compte, par l'intermédiaire d'une dégénérescence des microfilaments, d'une partie de la cardiotoxicité des anthracyclines. En outre, la réduction d'expression des gènes d'actine associée à celle d'autres gènes de protéines contractiles: myosine, troponine... précède la raréfaction des myofilaments, observée après administration d'anthracyclines (Zucchi et al., 2003; Ewer, 2010; Karagiannis et al., 2010).

5.3.1. La contraction musculaire

Le muscle cardiaque est un muscle strié, l'unité contractile est représentée par la myofibrille, formée d'unités répétitives: les sarcomères. Chaque sarcomère est délimité par des bandes A sombres contenant l'actine et la myosine, et des bande I claires contenant seulement l'actine. La zone centrale (bande M) du sarcomère contient uniquement de la myosine. L'actine est attachée de part et d'autre aux disques Z, comprenant de l' α -actinine, une protéine d'ancrage des filaments d'actine. Ainsi, chaque sarcomère est composé de deux sortes de filaments: les filaments fins et les filaments épais (Faulkner, 2003; Saladin, 2012).

Les filaments épais ont un diamètre d'environ 15 nm et sont essentiellement constitués de myosine (figure 16). La myosine est une molécule allongée de 2x240 kDa, c'est un moteur moléculaire qui transforme l'énergie chimique en énergie mécanique. Elle est composée de deux chaînes lourdes (Myosin Heavy Chain, MHC) et de quatre chaînes légères (Myosin Light Chain, MLC). Chaque chaîne lourde est constituée d'une queue C-terminale allongée et fibrillaire en hélice α , d'une tête globulaire N-terminale enzymatique à activité ATPasique associée à deux chaînes légères et d'un domaine cervical déformable reliant les deux extrémités. Plusieurs centaines de molécules de myosine s'assemblent pour former un filament épais. Les parties

caudales des myosines sont rassemblées parallèlement; alors que les têtes globulaires dépassent en périphérie de ce filament et sont donc disponibles pour pouvoir se fixer aux filaments d'actine.

Les filaments fins ont un diamètre d'environ 7 nm et sont constitués de plusieurs types de molécules: l'actine, la tropomyosine et la troponine (Saladin, 2012) (figure 17).

1) L'actine est une molécule globulaire de 42 kDa pouvant polymériser pour former des filaments. Deux filaments d'actine forment une double hélice en s'enroulant l'une sur l'autre.

2) La tropomyosine est une protéine allongée homodimérique ou hétérodimérique, chaque monomère étant constitué de 284 acides aminés adoptant une structure en hélice alpha s'enroulant l'une autour de l'autre pour former une superhélice. Elle va se lier à l'actine pour la stabiliser en se logeant au creux des sillons de la double hélice formée par l'actine.

3) La troponine est composée de 3 chaînes: troponine T, I et C; ayant des fonctions différentes. À chaque extrémité d'une molécule de tropomyosine, une molécule de troponine vient se lier. La troponine T est responsable de la liaison troponine-tropomyosine ; la troponine I se lie à l'actine et inhibe l'activité ATPasique de la myosine ; et la troponine C possède 4 sites de fixation pour le calcium qui, lorsqu'ils sont occupés, lèvent l'action de la troponine I.

Dans un muscle au repos il y a peu de Ca^{2+} dans le cytoplasme de la cellule. Ainsi, la troponine I inhibe l'interaction actine-myosine en faisant occuper par la tropomyosine le site d'interaction de la myosine situé sur l'actine. Le filament de tropomyosine recouvre les sites d'accrochage des molécules d'actine les rendant inaccessibles aux têtes de myosine (Saladin, 2012).

La contraction musculaire se traduit par le raccourcissement des sarcomères. Ainsi, les stries Z successives se rapprochent par glissement des filaments fins le long des filaments épais. Le glissement se fait grâce aux têtes de myosine qui s'accrochent aux sites de liaison des filaments d'actine. Plus spécifiquement, la fixation du Ca^{2+} à la troponine C entraîne un changement de conformation de la troponine, renforce l'interaction troponine C-troponine I et détache la troponine I de ses contacts avec l'actine. Ceci permet à la tropomyosine de se déplacer et empêche l'inhibition de la liaison actine-myosine, ce qui libère les sites d'accrochage de l'actine. Ainsi, la fixation du Ca^{2+} à la troponine initie l'interaction de la myosine et de l'actine, le site de liaison de l'actine devient accessible à la myosine. Les têtes de myosine activées par l'ATP

s'accrochent aux sites de liaison situés sur les molécules d'actine et, en se repliant, font glisser la myosine entre les filaments d'actine et la contraction peut donc avoir lieu. Le cycle d'accrochage-décrochage permettant le glissement de l'actine sur la myosine se reproduit tant que les ions Ca^{2+} sont fixés sur la troponine. L'hydrolyse de l'ATP en ADP + Phosphate, fournit l'énergie et génère la force motrice pour les changements moléculaires. Enfin, le réticulum endoplasmique réabsorbe progressivement les ions Ca^{2+} qui se détachent de la troponine. Le complexe de troponine reprend alors sa position initiale, entraînant le filament de tropomyosine qui masque à nouveau les sites d'accrochage de l'actine et la contraction s'arrête (Faulkner, 2003).

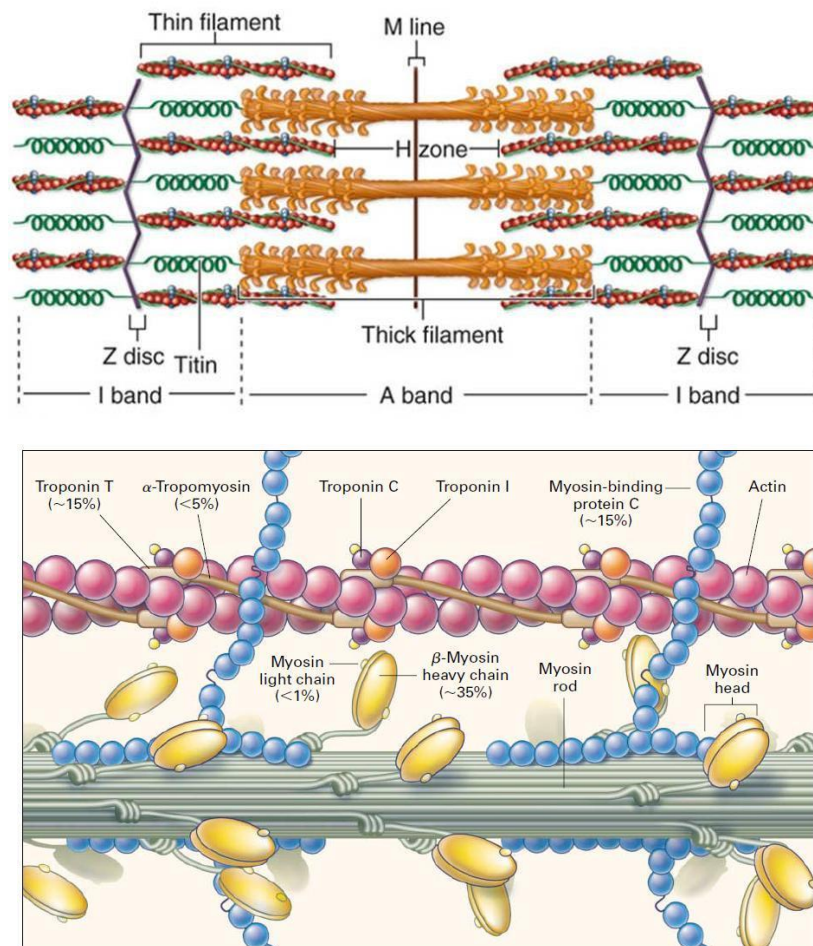


Figure 17. Représentations schématiques du sarcomère cardiaque et des protéines contractiles présentes. La bande A contient l'actine et la myosine, la bande I contient l'actine et la bande M contient la myosine. L'actine est attachée de part et d'autre aux disques Z. Sur le filament d'actine on retrouve deux protéines régulatrices: la troponine (un complexe de 3 sous-unités, T, I et C), et la tropomyosine. La contraction musculaire se produit lorsque le calcium se lie à la troponine, déplaçant la tropomyosine, permettant ainsi à la myosine de se lier à l'actine et de générer la contraction (Spinto et al., 1997).

5.3.2. Dosage des protéines cardiaques

La libération de protéines par les cellules myocardiques altérées pourrait être un reflet précoce de l'insuffisance cardiaque (Hamm, 1994). Plusieurs études ont montré que des lésions cardiaques se manifestant par une diminution drastique du niveau de plusieurs protéines contractiles comme l'actine, la troponine T, I et C, l' α -actinine et la myosine (MLC et MHC), apparaissent suite à l'ischémie-reperfusion myocardique ou suite à un traitement par la doxorubicine (DalleDonne et al., 1992; Karagiannis et al., 2010).

Des travaux ont prouvé que le niveau de troponine diminue suite à l'apoptose des cardiomyocytes en cas d'infarctus. Il semblerait exister une corrélation entre la dose cumulative d'anthracyclines et la diminution de troponine. En effet, une diminution de la concentration de la troponine T et C pendant un traitement par la doxorubicine permettrait de sélectionner les patients ayant un risque élevé de développer une toxicité cardiaque (Bian et al., 2009; Ewer, 2010). Il a aussi été montré que la doxorubicine pourrait moduler l'expression de la myosine. Ainsi, la variation des taux de MLC et MHC a été évaluée dans plusieurs études comme marqueurs de l'hypertrophie cardiaque. Leur diminution étant un indicatif de la cardiotoxicité des traitements chimiothérapiques (Takashi et al., 2009). D'autre part, au niveau de la modulation de l'expression de certains gènes, il est aussi constaté une inhibition par les anthracyclines de l'expression des gènes qui codent des protéines participant à la contraction du myocarde comme l'actine, la troponine et la myosine (Zucchi et al., 2003).

De plus, la libération de peptides natriurétiques comme l'ANP et le BNP, est aussi un signe précoce d'agression myocardique. En effet, leur taux augmente de manière importante en cas d'insuffisance cardiaque. Par contre, l'élévation de la concentration de ces protéines myocardiques n'est pas spécifique de la toxicité induite par les anthracyclines et leur dosage reste encore du domaine de la recherche clinique pour évaluer la toxicité cardiaque de la doxorubicine (Bhalla et al., 2004; Daugaardb et al., 2005).

III. Mécanismes de l'ischémie-reperfusion (IR) cardiaque

La cardiotoxicité de la doxorubicine a été amplement étudiée, cependant, en situation d'ischémie du myocarde, très peu d'études ont été menées. Ainsi, cette partie est destinée à décrire les mécanismes sous-jacents à l'ischémie et le phénomène de la reperfusion incontournable afin de sauver le myocarde ischémié et qui est en soi source de RL.

1. Débit coronaire et métabolisme énergétique du myocarde

La fonction première du myocarde est d'assurer le pompage du sang non oxygéné vers les poumons, et du sang oxygéné vers les tissus périphériques, en assurant un débit apte à satisfaire leurs besoins métaboliques. Cette fonction vitale est fournie par la contraction rythmique et incessante du myocarde qui fait de cet organe le site d'une activité métabolique intense, susceptible de varier brutalement en fonction des besoins de l'organisme tout entier.

Le muscle cardiaque est perfusé, à partir de l'aorte, par les artères coronaires droite (15%) et gauche (85%) constituant le débit sanguin coronaire. Le retour veineux vers l'oreillette droite est assuré, pour environ 2/3 par le sinus coronaire et pour le 1/3 restant par les petites veines du cœur. Le débit coronaire dépend de la différence de pression entre l'aorte et l'oreillette droite et du diamètre des coronaires; ce dernier est sous la dépendance de la pression transmurale et du tonus de la musculature lisse des coronaires. Dans les zones subendocardiques des artères coronaires en particulier, la pression sanguine est si élevée durant la systole, consécutivement à la contraction cardiaque, que la pression transmurale s'abaisse ainsi de manière appréciable. De ce fait le débit sanguin coronaire est, en pratique, uniquement diastolique.

La consommation d'oxygène du myocarde augmente, d'une part, proportionnellement à la vitesse de raccourcissement maximale des fibres myocardiques, d'autre part, en fonction du produit longueur de repos des fibres par durée de la systole. L'augmentation de la consommation d'oxygène myocardique est assurée par une augmentation du débit coronaire. Celle-ci est obtenue avant tout grâce à des facteurs chimiques locaux tels le manque en oxygène, la libération d'adénosine, de K^+ , bien qu'il semble que des facteurs endothéliaux et la stimulation des nerfs du système végétatif contribuent à la vasodilatation.

Le cœur est un organe fonctionnant exclusivement en aérobie. Il tire l'énergie nécessaire à l'accomplissement de ce travail mécanique de l'oxydation de divers substrats énergétiques au premier rang desquels figurent les acides gras, le glucose et le lactate. En conditions physiologiques, l'apport en énergie du myocarde est assuré essentiellement par l'oxydation des acides gras libres, apportés au myocarde par la circulation, plutôt que par celle du glucose (70 % contre 30 %). C'est à cette fin que la circulation coronaire apporte, au niveau des myofibrilles, l'oxygène et des proportions variables de substrats énergétiques. L'hydrolyse de l'ATP est la source ultime de l'énergie utilisée lors d'un grand nombre de réactions biochimiques se produisant dans différents compartiments de la cellule. En ce qui concerne le cardiomyocyte, les principaux processus consommateurs d'ATP sont : la contraction, les processus de transport ioniques et la synthèse protéique.

Une caractéristique essentielle du myocarde est sa capacité à modifier de manière brutale son activité mécanique. Le contrôle de l'utilisation des substrats énergétiques dans les myocytes cardiaques sont donc des processus essentiels à la vie. Ils permettent une balance précise et instantanée entre vitesse de production et d'utilisation de l'ATP. La voie de synthèse de l'ATP la plus importante dans le myocarde est la phosphorylation oxydative. La survenue d'une ischémie myocardique, diminuant la capacité de synthèse de l'ATP par le myocarde, va compromettre la fonction contractile du myocarde, la survie des cardiomyocytes et, in fine, celle de l'individu.

2. Ischémie cardiaque

L'ischémie définit l'arrêt de l'apport de sang artériel au niveau de tout ou partie d'un tissu ou d'un organe. Au niveau du cœur, l'ischémie est généralement due à l'obstruction accidentelle partielle ou totale d'une artère coronaire, à l'obstruction par un thrombus ou à la présence d'une plaque d'athérome mais peut également s'imposer lors de la chirurgie cardiaque ou dans le cas de la transplantation cardiaque. Le maintien de conditions d'ischémie sévère et la réduction du débit coronaire sur un tissu comme le myocarde dont le métabolisme requiert un apport important et permanent en substrats à catabolisme oxydatif aura des conséquences considérables sur les différentes fonctions cellulaires. Le déséquilibre entre les besoins métaboliques et l'apport en oxygène et nutriments du myocarde aboutit à des perturbations électriques, mécaniques, biochimiques et structurales pouvant entraîner une altération de la contractilité myocardique, une

modification de l'hémodynamique physiologique et par conséquent une mort cellulaire. Les atteintes tissulaires peuvent être réversibles ou irréversibles en fonction de la durée et de l'intensité de l'ischémie (Giordano, 2005) (figure 18).

Si le tissu est reperfusé rapidement, les cellules resteront viables. Si par contre, l'ischémie est prolongée, les altérations vont aboutir à une mort cellulaire, par apoptose puis par nécrose. Cette nécrose se propage dans le myocarde, de l'endocarde vers l'épicarde, et la zone nécrosée sera ensuite remplacée par du tissu cicatriciel incapable de se contracter. Dans l'infarctus du myocarde, un nombre significatif de cellules cardiaques ischémiques meurent. Cette mort cellulaire évolue de l'endocarde vers l'épicarde et du centre de la nécrose vers la périphérie. Chez l'homme, 50 % de la zone ischémique est détruite en 2 h, 100 % en 4 à 6 h. Cette vitesse est variable d'une espèce à l'autre et au sein d'une même espèce (Logue et al., 2005).

2.1. Perturbations métaboliques

Les premières perturbations cellulaires au cours de l'ischémie sont d'ordre métabolique et affectent principalement le turnover de l'ATP. Lors d'une ischémie, le cœur réduit son activité mécanique en réponse à une diminution d'apport énergétique due à une perfusion insuffisante. La diminution de l'apport en oxygène provoquée par l'ischémie conduit dans un premier temps à un ralentissement ou à un arrêt total du métabolisme oxydatif et à une stimulation de la glycolyse anaérobie. Dans ce cas, le myocarde augmente sa consommation anaérobie de glucose, le métabolisme énergétique devenant alors plus glycolytique qu'oxydatif (Rumsey et al., 1999). La glycolyse anaérobie permet de compenser en partie le déficit énergétique, mais la production d'ATP reste insuffisante pour couvrir l'ensemble des besoins énergétiques du myocarde. La conséquence principale de ces lésions précoces est la diminution de l'activité contractile. Quel que soit le degré de l'ischémie, le métabolisme oxydatif des acides gras est interrompu, ce qui conduit à une accumulation de métabolites intermédiaires qui ont des effets délétères sur les membranes cellulaires. Le pyruvate, produit lors de la glycolyse, ne peut rentrer dans le cycle de Krebs et s'accumule, ce qui favorise sa transformation en lactate. De plus, du fait de la réduction du débit coronaire, les produits du catabolisme de l'ATP (Adénosine, phosphate inorganique) s'accumulent et entraînent non seulement l'inhibition du cycle de contraction des sarcomères mais aussi une acidose intracellulaire qui va progressivement bloquer la glycolyse et accroître le déficit énergétique. Si l'ischémie se prolonge, la glycolyse anaérobie est donc diminuée puis

arrêtée complètement, ce qui conduit à un arrêt de la production d'ATP. On observe une accumulation d'équivalents réduits, de lactate et de protons dans les myocytes à l'origine d'une acidose intracellulaire provoquant une inhibition des enzymes de la glycolyse et une augmentation du déficit énergétique (Argaud & Ovize, 2000). Au-delà de 30 min d'anoxie, le cœur ne peut plus récupérer (s'il est à 37 °C). Si l'on maintient le cœur à 10 °C, ce temps double, car la consommation énergétique chute (refroidissement des organes lors des transplantations).

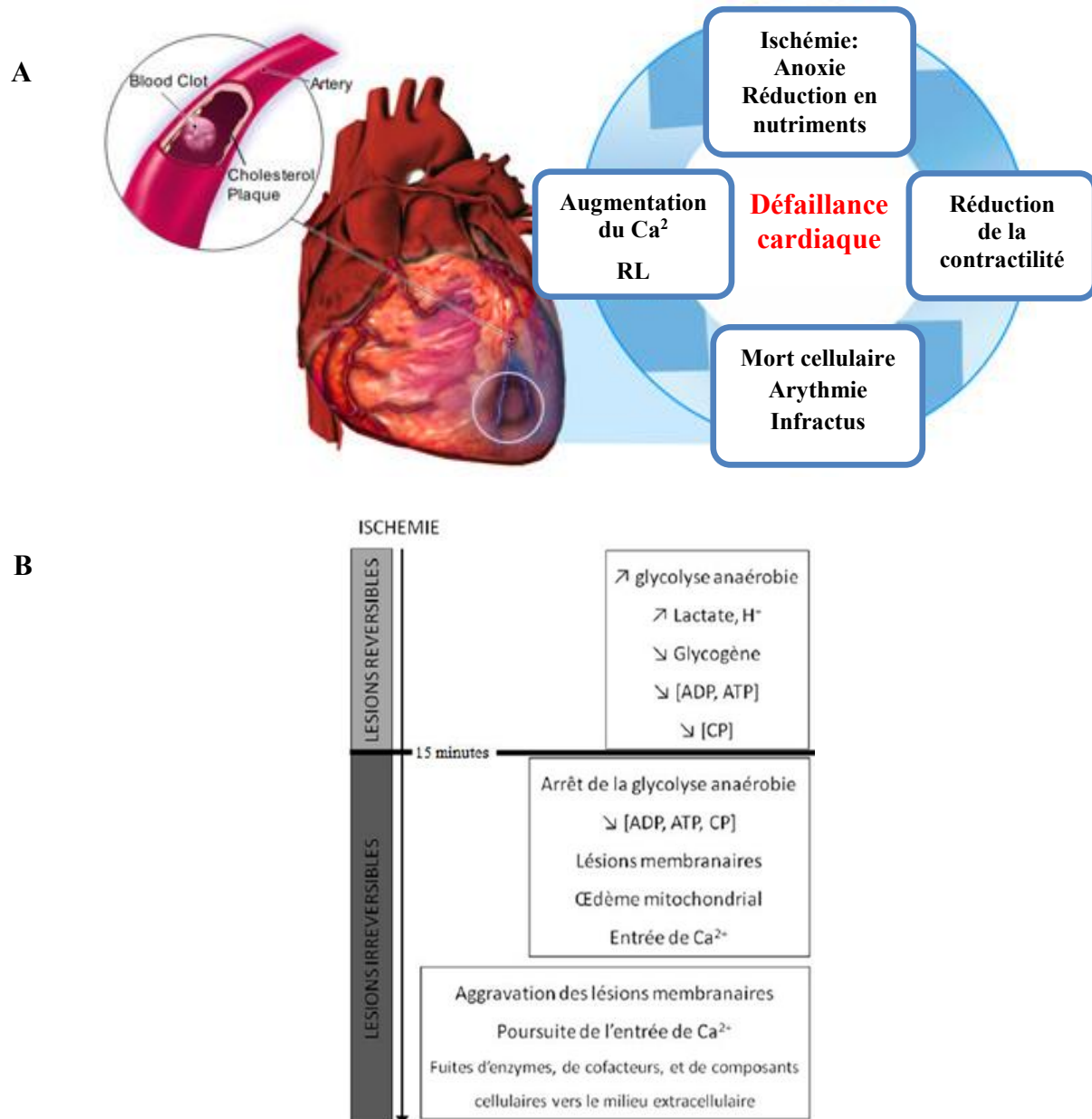


Figure 18. A. Défaillance cardiaque suite à l'ischémie. **B.** Les lésions dues à l'ischémie cardiaque en fonction de la période ischémique.

2.2. Perturbations ioniques

L'activation de la glycolyse anaérobie se traduit par la production de lactate et de protons entraînant une acidification intracellulaire, évaluée à 1 unité pH en 10 min environ. Cette acidification va entraîner l'activation de l'échangeur Na^+/H^+ membranaire afin d'expulser des protons vers l'extérieur de la cellule, de même que l'activation du système alcalinisant, le symport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (Argaud & Ovize, 2000) (figure 19).

L'augmentation de l'activité de ces systèmes aboutit à une augmentation de la concentration sodique intracellulaire. Du fait du manque d'ATP cellulaire, la pompe Na^+/K^+ -ATPase va expulser moins de Na^+ , ce qui va diminuer voire même inverser l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCE ou NCX) qui en situation normale expulse le Ca^{2+} hors de la cellule. Ce mode de fonctionnement inversé de l'échangeur NCE se traduit par une augmentation de la concentration cytosolique en calcium (Argaud & Ovize, 2000). La surcharge sodique est associée à une entrée d'eau responsable de l'œdème intracellulaire et entraîne des lésions au niveau des protéines contractiles, favorisant ainsi la contracture ischémique. Ainsi, la mise en route de systèmes neutralisant l'acidification cellulaire due au changement de substrat énergétique du cœur va aboutir à une surcharge sodique et calcique du cytosol. L'ensemble de ces mécanismes concourent à l'entretien d'un état de contracture permanente ainsi qu'à l'apparition d'une dysfonction diastolique au cours de l'ischémie (figure 19).

L'ischémie entraîne donc de nombreuses modifications des gradients ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique. La diminution de la concentration d'ATP provoque également une accumulation de K^+ à l'extérieur de la cellule. Celle-ci est à l'origine des perturbations électrophysiologiques observées au cours de l'ischémie.

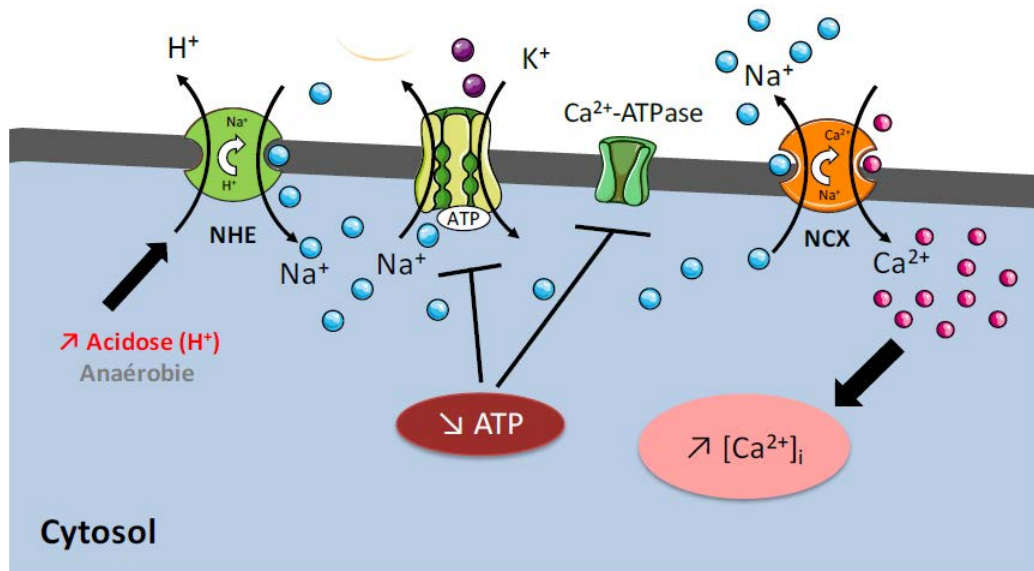


Figure 19. Altération de l'homéostasie calcique cardiomyocytaire au cours de l'ischémie. NHE : échangeur Na^+/H^+ ; Ca^{2+} -ATPase : pompe calcique dépendante de l'ATP ; NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Meyer et al., 2010).

2.3. Types d'ischémie myocardique

Ischémie régionale : Elle fait suite à un rétrécissement de la lumière d'une artère coronaire, ou sténose, provoquant une chute du débit coronaire. La sténose est due à une obstruction par un caillot sanguin, une plaque d'athérome ou une calcification. La sténose peut s'observer aussi lors de succession de spasmes coronaires altérant le débit sanguin coronaire ou lors d'une réponse inadaptée à un besoin accru en oxygène. Ces spasmes peuvent être dus à une hyperactivité des cellules musculaires lisses ou à une dysfonction endothéliale (Lanza et al., 2011).

Ischémie globale : Lorsque l'arrêt de la perfusion tissulaire concerne tout le cœur, on parle d'ischémie globale qui peut avoir comme étiologie cardiovasculaire un infarctus du myocarde induit par une ischémie régionale, un choc hypovolémique, un trouble de la conduction mais également un trouble du rythme. En effet, une tachycardie ou une fibrillation ventriculaire altère la fonction hémodynamique principale du cœur et peut conduire à un arrêt cardiaque (Török et al., 1983). Le cœur n'étant plus irrigué, entre dans une phase ischémique. Dans certains processus thérapeutiques comme les interventions chirurgicales nécessitant l'arrêt temporaire de l'activité cardiaque et la mise en place d'une circulation extracorporelle, l'ischémie est imposée à la totalité du myocarde. Quand la perfusion cardiaque est interrompue, les cellules myocardiques

n'étant plus irriguées ont la capacité à se mettre en état de consommation énergétique minimale avant l'arrêt de toute activité métabolique si la reperfusion n'est pas rétablie.

2.4. Stress oxydant en conditions d'ischémie

La production de RLO a été mise en évidence sur divers modèles expérimentaux allant des cardiomyocytes isolés au cœur isolé-perfusé pendant l'ischémie et pendant la reperfusion (Pasdois et al., 2008). Le mécanisme de cette production de RLO lors de l'ischémie paraît, de toute évidence, multifactoriel et d'origine principalement mitochondriale et plus précisément au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Solaini & Harris, 2005). Cette production de RLO par la mitochondrie peut secondairement induire des effets délétères sur cette dernière. Ainsi, il a été proposé que les RLO produits pendant l'ischémie altèrent la composition des membranes mitochondriales et contribuent à l'ouverture du mPTP et la sortie de cytochrome c. En effet, les mitochondries isolées à partir de cœur de lapin ayant subi une ischémie globale, présentent une diminution progressive de la respiration (Lesnefsky et al., 2001).

3. Reperfusion myocardique

3.1. Généralités

Sans reperfusion, les lésions ischémiques vont évoluer progressivement vers la mort cellulaire. Ensuite, un phénomène naturel de cicatrisation s'installe. Des modifications adaptatives de la taille et de la forme du ventricule gauche, sont alors observées afin de palier la défaillance contractile du myocarde. A long terme, l'altération de la fonction globale du cœur peut mener à la défaillance cardiaque. Afin de préserver au mieux le myocarde de la nécrose, il est impératif que la revascularisation tissulaire ait lieu, et ce, de manière précoce durant la phase où les altérations cellulaires sont encore réversibles. La reperfusion est donc indispensable à la survie du tissu, dans la mesure où elle limite les lésions tissulaires qui suivent une ischémie plus ou moins prolongée. C'est d'ailleurs la seule méthode connue permettant de sauvegarder le myocarde ischémique des lésions tissulaires.

Bien que la reperfusion soit nécessaire à la survie cardiomyocytaire, il est important de noter qu'elle n'est pas sans conséquences. En effet, la reperfusion est une "épée à double tranchant" : la restauration d'un flux sanguin analogue au flux pré-ischémique provoque des lésions propres à la reperfusion au cours desquelles l'aggravation de la surcharge calcique et la formation de RLO jouent un rôle important aboutissant au concept de "syndrome de reperfusion".

La réoxygénation ou reperfusion myocardique est donc nécessaire mais induit des perturbations:

- électriques (arythmies, propagation)
- mécaniques (contractilité, myofilaments)
- biochimiques (métabolisme énergétique)
- structurales (membrane, mitochondrie)
- signalisation (MAPK, PI3K)
- apoptose (Bax/Bcl-2)

Elle est aussi associée à des altérations fonctionnelles réversibles comme les arythmies de reperfusion, la sidération myocardique (ou stunning myocardique), des dommages vasculaires (altérations de perfusion ou phénomène de no-reflow) et des altérations irréversibles comme la mort cellulaire (apoptose et nécrose). Ce phénomène où la réoxygénation est indispensable pour la survie myocardique, mais a des effets délétères est appelé le "paradoxe de l'oxygène" (Eltzschig & Eckle, 2011).

C'est en 1960 qu'a été émise l'hypothèse de l'existence de lésions de reperfusion. La preuve de cette nécrose de reperfusion, qui pourrait dans certaines conditions expérimentales compter pour 50% de la taille finale de l'infarctus, a été apportée par la démonstration que des interventions appliquées au moment de la reperfusion sont capables de réduire considérablement son étendue. En effet, si la nécessité de la reperfusion pour limiter la mort cellulaire causée par une ischémie sévère est bien démontrée, cette dernière engendre néanmoins des phénomènes néfastes qui peuvent limiter ses effets bénéfiques. Après reperfusion, les cellules ischémiques développent souvent et brutalement des changements ultra-structuraux indiquant la mort cellulaire: un "bombement explosif" et une désorganisation architecturale (Garcia-Dorado & Piper, 2006).

Lors de la reperfusion, si la chaîne respiratoire a subi peu d'altérations durant l'ischémie et reste fonctionnelle, le taux d'ATP cellulaire augmente rapidement, et alimente ainsi les différentes pompes, Na^+/K^+ -ATPase, et la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (RS). L'activité du réticulum sarcoplasmique permet de pomper le Ca^{2+} à l'intérieur du réticulum. De plus, le métabolisme anaérobie durant l'ischémie conduit à une augmentation de pression osmotique intracellulaire et interstitielle. Le rétablissement du flux coronaire entraîne une chute brutale de pression osmotique interstitielle, créant ainsi un fort gradient osmotique entre les milieux intracellulaire et interstitiel, faisant entrer de l'eau dans les cellules. Le gonflement cellulaire, ajouté à la fragilisation du cytosquelette peut entraîner la rupture de la membrane cellulaire (Piper et al., 2003) (figures 20).

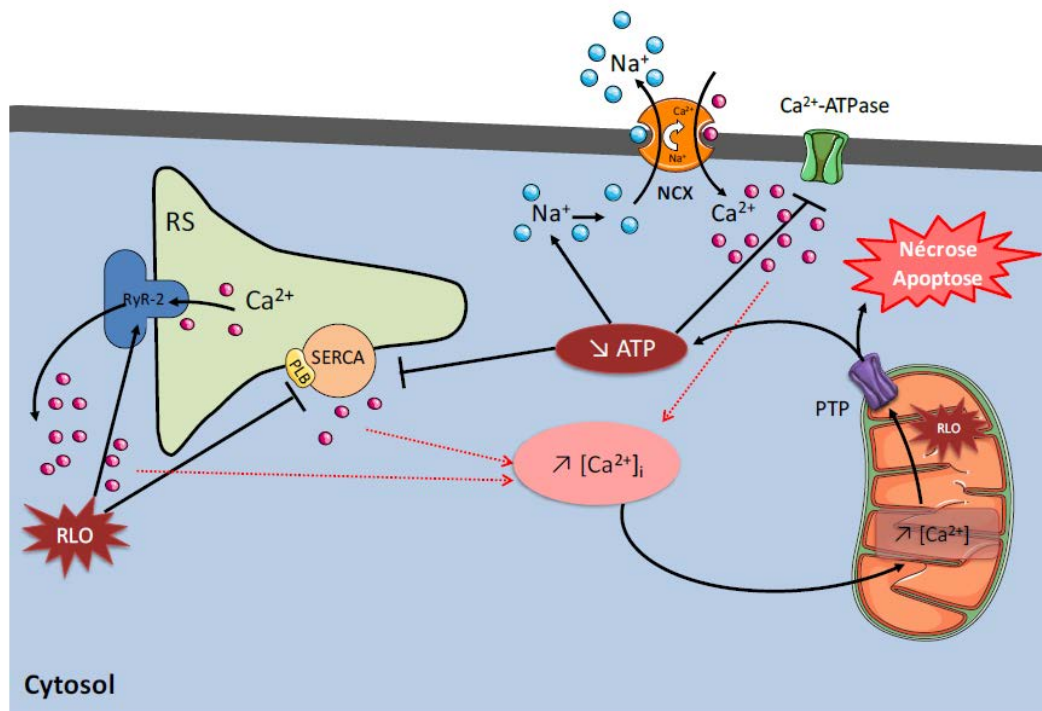
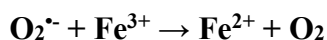


Figure 20. Effets de la surcharge calcique et du stress oxydant dans les troubles de la reperfusion myocardique. RLO : radicaux libres dérivés de l'oxygène ; RS : réticulum sarcoplasmique ; RyR-2 : récepteur à la ryanodine ; PLB : phospholamban ; SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase; NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; PTP : pore de transition de perméabilité mitochondriale (Meyer et al., 2010).

3.2. Majoration brutale du stress oxydant

La reperfusion est associée à une augmentation très forte de la production de RLO, qui doit son origine aux complexes I et III de la chaîne respiratoire (Zweier & Talukder, 2006). Lorsque la chaîne respiratoire est inhibée par le manque d'oxygène, l'ubiquinone est partiellement réduite en semi-ubiquinone, qui peut ainsi réagir avec l'oxygène présent lors de la reperfusion et ainsi produire des ions superoxydes. Ces ions superoxydes vont ensuite être réduits en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase. Cependant, le superoxyde peut subir la réaction catalytique de Fenton et Haber-Weiss pour générer les radicaux hydroxyles (Zweier, 1988) :



Les radicaux hydroxyles entrent à leur tour en réaction avec plusieurs molécules biologiques pour former les radicaux $\text{R}^{\cdot}$, $\text{RO}^{\cdot}$ et $\text{ROO}^{\cdot}$.

Les RLO peuvent aussi entraîner la peroxydation des acides gras insaturés des phospholipides aggravant ainsi l'inhibition de la chaîne respiratoire (Petrosillo et al., 2003). Au final, les effets combinés des RLO et de la forte concentration calcique jouent un rôle critique dans le degré d'importance des dommages liés à la reperfusion. L'implication des radicaux libres dans les lésions de reperfusion a été mise en évidence par plusieurs études expérimentales qui ont montré l'effet cardioprotecteur d'enzymes capables de capter les radicaux superoxydes (Seshadri et al., 2010).

Lors de l'ischémie-reperfusion la production de RLO est accrue par plusieurs voies (figure 21):

3.2.1. Les leucocytes activés

Les polynucléaires neutrophiles, essentiellement, possèdent une forte concentration en NADPH oxydase au niveau des phagosomes et des membranes. L'activité de cette enzyme est faible à l'état basal, mais lorsque ces cellules sont activées par des stimuli inflammatoires, la NADPH oxydase peut produire de grande quantité d'anion superoxyde à partir de l'oxygène. Dans le cas de l'ischémie cardiaque, une telle réaction inflammatoire participe à la nécrose du tissu ischémique (Souchard et al., 2012).

3.2.2. Les NADPH oxydases

Les NADPH oxydases existent, en plus de la forme présente dans les leucocytes, au niveau endothélial et musculaire (muscle lisse et cardiaque). Les formes endothéliales participent pour une part importante à la production radicalaire (anion superoxyde) lors de la reperfusion. En effet, l'ablation de l'endothélium d'aorte isolée diminue de manière importante la production de superoxyde à la reperfusion (Krause, 2004).

3.2.3. Le NO et les NO synthases

Les vaisseaux, et plus particulièrement l'endothélium vasculaire, constituent la première cible des attaques radicalaires dans diverses situations physiopathologiques impliquant le stress oxydant. Lors de la reperfusion, les lésions cellulaires induisent la libération de fer qui favorise à son tour la formation des RLO en catalysant la réaction de Fenton. Le stress oxydant ainsi induit, affecte aussi bien la réactivité vasculaire que la fonction de régulation endothéliale. La production accrue de RLO va entraîner la diminution de l'activité biologique de l'oxyde nitrique (NO), la perturbation de la transduction du signal, la modification directe de la propriété de contraction et les lésions et mort cellulaires. Les oxydes nitriques synthases (NOS) existent sous plusieurs isoformes. Lors de la reperfusion, le manque de substrat ou de cofacteur, crée un dysfonctionnement des NOS endothéliales qui peuvent alors produire à la fois le NO et l'anion superoxyde. Ces deux produits peuvent alors réagir ensemble et former du peroxynitrite ONOO^- (Krause, 2004).

3.2.4. La xanthine-déshydrogénase

C'est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Au décours des phénomènes d'ischémie-reperfusion, cette enzyme est modifiée en xanthine-oxydase qui génère du $\text{O}_2^{\bullet-}$ en présence d' O_2 et de xanthine ou d'hypoxanthine. Ainsi, cette voie de production de RLO de l' O_2 participe probablement au stress oxydatif chez les patients qui présentent une pathologie ischémique (Lee et al., 2009).

3.2.5. Les autres systèmes

La dégradation des catécholamines, le métabolisme de l'acide arachidonique et l'action de l'angiotensine II aboutissent à la production de RLO lors de l'ischémie et de la reperfusion.

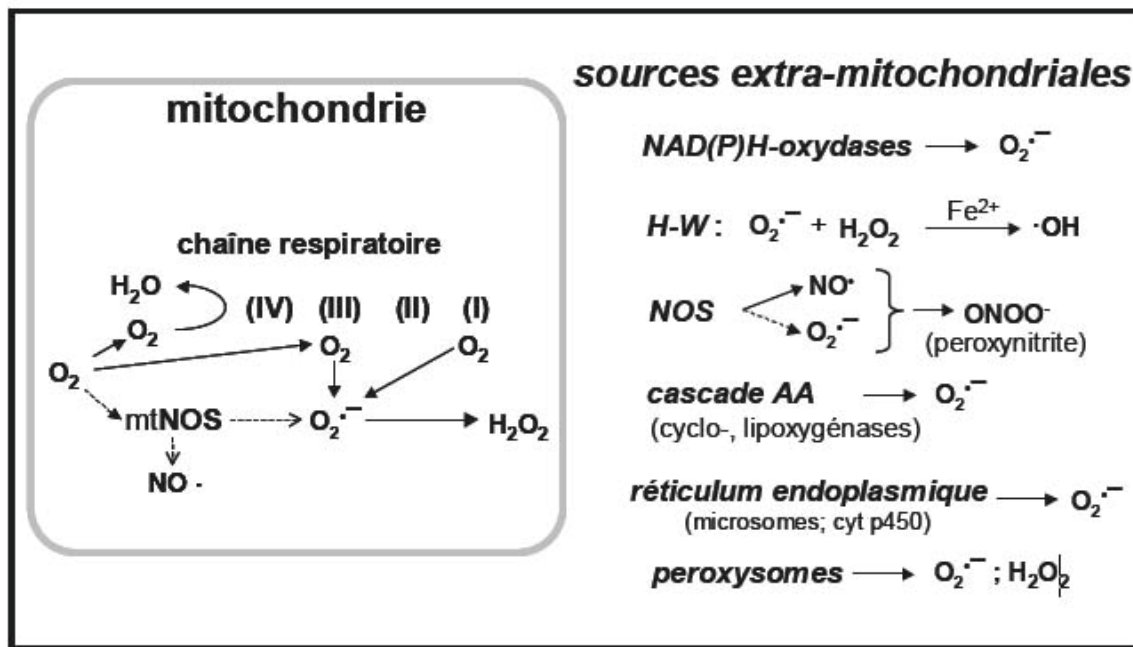


Figure 21. La mitochondrie est la source principale de radicaux dans la cellule. I-IV : complexes de la chaîne respiratoire, NOS : synthase du monoxyde d'azote, mtNOS : NOS mitochondriale, H-W : réaction d'Haber-Weiss, AA : acide arachidonique.

3.3. Paradoxe du calcium

La reperfusion d'un myocarde ischémié entraîne l'augmentation du taux calcique intracellulaire (figure 22). Dans les cellules qui peuvent rétablir un contrôle cationique normal, le processus de rétablissement du taux calcique se divise en 2 phases :

- dans la première phase, le Ca^{2+} passe dans le RS et donc le taux du Ca^{2+} cytosolique diminue;
- dans la deuxième phase, il s'établit une oscillation du Ca^{2+} entre le RS et le cytosol.

L'oscillation du Ca^{2+} observée dans la deuxième phase est responsable de l'hypercontracture. En effet, le pic calcique cytosolique peut être à l'origine de ces hypercontractures. L'augmentation

de la sensibilité cellulaire au calcium semble être liée à une augmentation de la fragilité des différentes composantes du cytosquelette et contribuer à la génération des hypercontractures.

Il est possible expérimentalement de réduire l'hypercontracture provoquée par cette oscillation calcique en amortissant le cycle du Ca^{2+} entre le cytosol et le RS et donc en diminuant le pic du Ca^{2+} cytosolique (Ladilov et al., 1997). Il s'agit d'utiliser des agents qui inhibent la libération du Ca^{2+} dans le cytosol pour augmenter sa concentration dans le RS et donc diminuer le pic de calcium cytosolique (Gao et al., 1996). Plus récemment, l'influence de l'oscillation calcique sur la perméabilité de la membrane mitochondriale a également été rapportée (Ruiz-Meana et al., 2009). Dans cette étude réalisée sur des cardiomyocytes de rats, les auteurs ont démontré la présence d'une hypercontracture et d'une altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale suite à une ischémie-reperfusion.

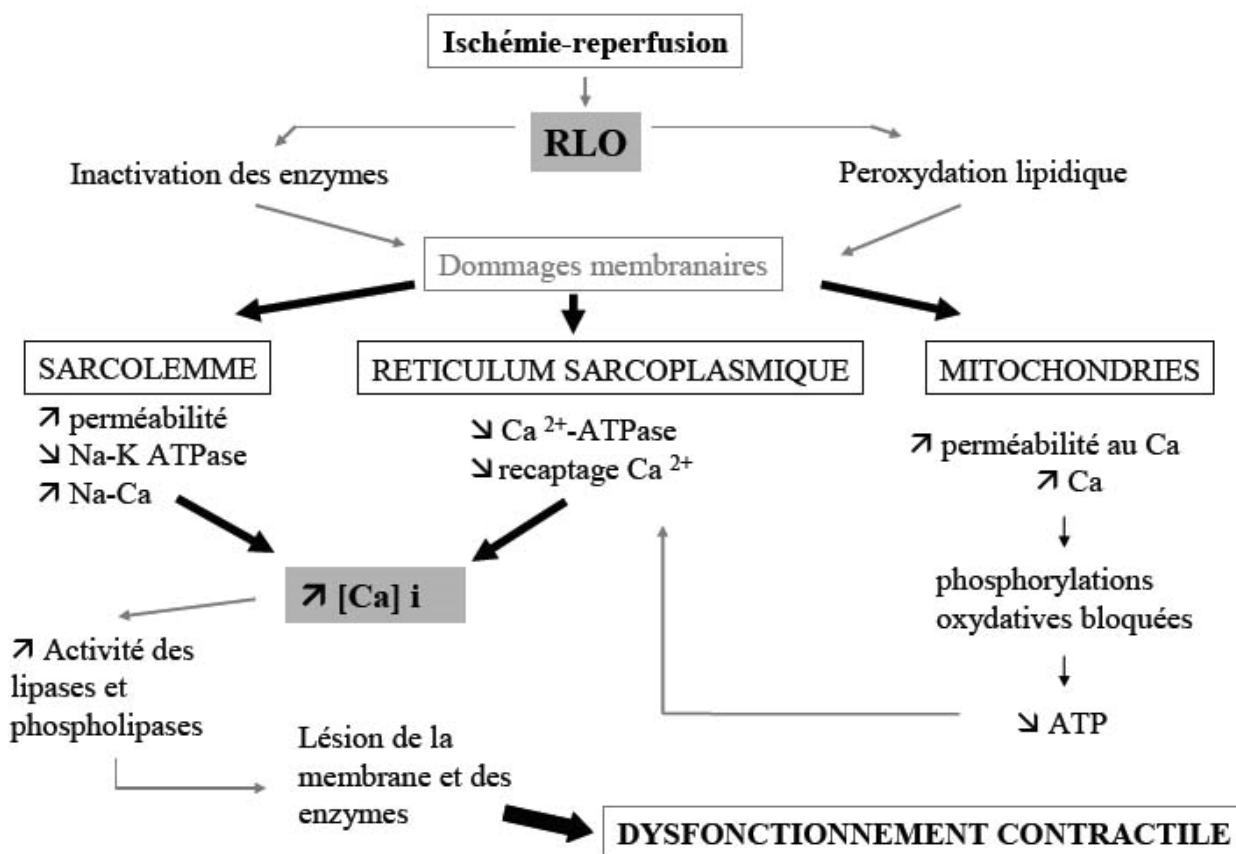


Figure 22. Mécanismes possibles de la dysfonction myocardique post-ischémique.

3.4. Dommages de la reperfusion

3.4.1. La sidération myocardique

Lorsque la reperfusion d'une partie du myocarde est effectuée après l'occlusion coronaire et juste avant la mort cellulaire, il peut se produire un non-regain de la fonction contractile initiale malgré une revascularisation complète. Cette hypofonction transitoire réversible est appelée : sidération myocardique. Initialement décrite par Heyndrickx en 1975, la sidération myocardique (ou stunning myocardique) survient lorsque la récupération complète du myocarde ischémique nécessite un délai de quelques heures à plusieurs jours malgré l'absence de lésions irréversibles et en présence d'une perfusion sanguine normale (Heyndrickx et al., 1975).

La sidération myocardique ou stunning correspond ainsi à la phase de récupération lente de la fonction myocardique au cours de la reperfusion. Ce phénomène est principalement rencontré suite à une ischémie de courte durée suivie d'une reperfusion. Il semblerait que la production de radicaux libres, l'altération de l'homéostasie calcique et l'altération structurelle des protéines contractiles (altération du couplage excitation-contraction des cardiomyocytes) soient impliquées dans ce phénomène (Kloner & Jennings, 2001). La surcharge calcique intracellulaire peut entraîner des lésions au niveau des protéines contractiles, provoquant des modifications de la réponse physiologique normale au calcium. La contractilité du myocarde en est ainsi affectée aboutissant à la sidération du myocarde. Les radicaux libres et la surcharge calcique sont intrinsèquement liés. En effet, les RLO participent à la surcharge calcique par le biais des dommages membranaires qu'ils créent au niveau du sarcolemme, du réticulum sarcoplasmique et des mitochondries (Niccoli et al., 2010).

3.4.2. Le concept de no-reflow

Le phénomène de no-reflow se définit par l'absence de reperfusion myocardique post-ischémique survenant malgré la désobstruction de l'artère coronaire responsable de l'ischémie. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Kloner en 1974 sur un modèle expérimental (Kloner et al., 1974). Dans le cadre de l'IR, la restauration du flux sanguin ne s'accompagne pas systématiquement d'une reperfusion au niveau de la microcirculation du territoire ischémié. Cette obstruction peut s'expliquer par la présence d'un œdème cellulaire comprimant les micro-

vaisseaux. De plus, l'afflux brutal de débris plaquettaires ou thrombotiques provenant de l'ischémie peut être à l'origine d'une obstruction de la microcirculation distale (Mauri et al., 2006). Le phénomène de no-reflow résulte principalement d'une altération de la fonction endothéliale des microvaisseaux liée à la production de RLO par les neutrophiles circulants ainsi que par les cellules endothéliales elles-mêmes (Schwartz & Kloner, 2012). Ceci est responsable d'une réduction de libération de NO par les vaisseaux coronaires qui est le principal agent vasodilatateur et un puissant anti-agrégant plaquettaire; ce qui favorise l'aggravation du phénomène de no-reflow.

3.4.3. Les arythmies de la reperfusion

Les arythmies de reperfusion ont fait l'objet de nombreuses études, ce sont essentiellement des fibrillations ventriculaires précédées d'épisodes de tachycardie ventriculaire et d'extrasystoles; et correspondent à des troubles électrophysiologiques. Il semble que la formation de RLO ainsi que l'excès de calcium soient les principaux acteurs des arythmies de reperfusion. La peroxydation des lipides membranaires sous l'effet des RLO conduit à des perturbations de l'équilibre ionique, ce qui aboutirait à des modifications électrophysiologiques responsables des arythmies de reperfusion. De plus, suite à l'ischémie, le déficit énergétique conduit à la surcharge calcique. Ainsi, l'existence d'un excès de calcium libre dans la cellule lors de la reperfusion, est aussi à l'origine des arythmies de reperfusion (Hagar & Kloner 1990).

3.5. Mort cellulaire

3.5.1. La nécrose cellulaire

Lors de la reperfusion, un certain nombre de cardiomyocytes peuvent entrer dans un processus de nécrose. La nécrose cellulaire au cours de l'ischémie-reperfusion résulte principalement de la déplétion en ATP survenant lors de l'ischémie, responsable d'une incapacité de la cellule à maintenir son activité vitale. Trois hypothèses ont été soulevées pour expliquer l'origine de cette nécrose : le gonflement osmotique des myocytes, la surcharge calcique et les dommages radicalaires. Toutefois, le rôle de la reperfusion dans la mort de certains cardiomyocytes reste encore largement controversé (McCully et al., 2004).

3.5.2. L'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée résulte en une élimination des cellules apoptotiques sans induction de phénomène inflammatoire. Elle est régulée par la balance entre signaux de survie (facteurs anti-apoptotiques) et de mort cellulaire (facteurs pro-apoptotiques). Elle consiste en une séquence d'altérations morphologiques comprenant une condensation du cytoplasme et du noyau, une fragmentation de l'ADN et un bourgeonnement de la membrane plasmique. Au cours de l'ischémie myocardique, l'activation du programme apoptotique dans les cardiomyocytes contribue au processus de remodelage cardiaque et peut être considérée comme un processus adaptatif des zones hypoperfusées. Le processus apoptotique semble être initié par les conditions ischémiques et il est ensuite amplifié au cours de la reperfusion, principalement suite à la surcharge calcique et la production de RLO (Gottlieb, 2011).

L'apoptose met en jeu la voie intrinsèque, impliquant la mitochondrie et la voie extrinsèque, un processus non mitochondrial mais lié aux récepteurs membranaires, impliquant principalement le récepteur Fas, a également été rapporté comme impliqué dans l'activation de l'apoptose par les caspases au cours de l'IR (Lee et al., 2003). Ainsi, la mort par apoptose des cellules cardiaques impliquerait la production de facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) qui est un puissant inducteur d'apoptose, la production de RLO via l'ouverture du pore de perméabilité membranaire (mPTP) et le relargage du cytochrome c mitochondrial (cyt c); lesquels vont activer la cascade de signalisation des caspases, responsables du clivage de l'ADN. De plus, les RLO sont connus pour activer des protéines pro-apoptotiques, comme la P38 MAPK, qui sont des éléments clés de la voie de signalisation intracellulaire des macrophages conduisant à la libération de TNF- α . Dans certaines conditions de stress comme c'est le cas du stress oxydant, les macrophages mais également d'autres types cellulaires (cellules endothéliales, fibroblastes, myocytes...) libèrent le TNF- α en quantité importante au niveau de la circulation systémique (Keith et al., 1998).

En résumé, il est difficile de préciser si les altérations propres à la reperfusion du myocarde ischémique représentent une accélération des dommages ischémiques ou si elles sont la conséquence de la reperfusion elle-même.

Les principaux mécanismes avancés pour expliquer le développement de ces manifestations sont: (i) l'aggravation brutale de l'œdème cellulaire, (ii) l'aggravation de la surcharge calcique, (iii) la libération de catécholamines endogènes, et (iv) les altérations cellulaires liées à la surproduction de radicaux libres au moment de la reperfusion (Bolli & Marban 1999).

3.6. Dysfonctionnement mitochondrial

De par leur importance dans la production énergétique, les mitochondries occupent une place prépondérante dans la viabilité de la cellule. Il a été observé une altération de la perméabilité membranaire mitochondriale lors de l'IR (Ruiz-Meana et al., 2009). En effet, des études aussi bien cliniques qu'expérimentales ont montré que durant la réoxygénation tissulaire, il se produit une explosion de la production de RLO notamment dès les premières minutes de la reperfusion, avec une prépondérance pour le peroxy-nitrite, reconnu comme étant une molécule impliquée dans les lésions de reperfusion (Pacher et al., 2007). Cette augmentation radicalaire peut initier la peroxydation des acides gras non saturés de la membrane mitochondriale conduisant à une ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). L'ouverture de ce pore est depuis longtemps connu comme étant induit par la combinaison d'une surcharge calcique et du stress oxydant. D'autres travaux ont par la suite démontré que ce mPTP est à l'origine de la mort cellulaire durant la séquence d'ischémie-reperfusion. Le maintien de l'ouverture provoque un gonflement qui a pour conséquence une perte de tous les gradients ioniques indispensables à la phosphorylation oxydative responsable de la synthèse d'ATP et donc de la survie cellulaire (Hausenloy et al., 2003). Il a été montré que l'inhibition du mPTP permet de lutter contre les lésions induites par la reperfusion (Hausenloy et al., 2003).

Associées à ces altérations aussi bien mitochondriales que cytosoliques, il a été démontré une importance du processus inflammatoire dans les dommages cellulaires liées à la reperfusion, caractérisé par une activation du complément et des polynucléaires neutrophiles. L'ischémie crée aussi des dommages au niveau de la chaîne respiratoire et aboutit à la libération d'ions ferreux qui vont catalyser la formation de nouveaux radicaux lors de la reperfusion. De plus, les défenses antioxydantes de la mitochondrie sont diminuées lors d'un déficit de perfusion, en particulier le taux de glutathion et l'activité SOD suite à une ischémie prolongée (Marina-Garcia & Goldenthal, 2004).

3.6.1. Implication du mPTP dans les lésions de reperfusion

Dans les conditions physiologiques normales, la membrane mitochondriale interne est pratiquement totalement imperméable. En revanche, dans des conditions de stress extrême, comme lors d'une ischémie sévère suivie de reperfusion, un pore non spécifique peut s'ouvrir au sein de cette membrane, sous l'influence de la surcharge calcique brutale et du stress oxydant. Il s'agit du pore de transition de perméabilité mitochondrial ou mPTP, c'est un canal situé sur la membrane mitochondriale qui permet la diffusion passive de molécules de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa. Le mPTP est un acteur important de plusieurs processus physiologiques, c'est un pore mitochondrial transitoire ayant une perméabilité très importante. Le mPTP semble être associé aux sites de contact entre la membrane interne et externe (Ventura-Clapier & Lombès, 2007).

Durant l'ischémie myocardique le mPTP reste fermé et s'ouvre pendant les premières minutes de la reperfusion, suite à l'augmentation du flux calcique, la majoration du stress oxydatif et la déplétion en ATP (Griffiths & Halestrap, 1995). Le mPTP est un acteur critique des lésions de reperfusion et représente une cible thérapeutique importante pour optimiser la cardioprotection.

En effet, lors de la reperfusion plusieurs phénomènes favorisent l'ouverture du mPTP; notamment la surcharge calcique mitochondriale liée à l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, la diminution du potentiel membranaire $\Delta\Psi$ et la production de RLO. L'ouverture du mPTP est à l'origine de la perte de perméabilité de la membrane interne, qui va avoir plusieurs conséquences délétères pour le cardiomyocyte. Tout d'abord, les protons vont pouvoir diffuser librement à travers la membrane interne et ainsi causer le découplage de la phosphorylation oxydative. Les concentrations en ATP intracellulaires vont alors rapidement diminuer, engendrant une perte de l'homéostasie ionique et métabolique, et l'activation d'enzymes de dégradation, telles que les phospholipases, les nucléases et les protéases. Si le pore n'est pas refermé, ces changements vont causer des dommages cellulaires irréversibles, résultant, in fine, en une nécrose.

Ainsi, l'ouverture prolongée de ce pore entraîne un flux d'eau dans la mitochondrie et son gonflement, un effondrement du potentiel de membrane mitochondrial, une libération du calcium et un découplage de la phosphorylation oxydative, ce qui engendre une déplétion en ATP et la

mort cellulaire (Hausenloy & Yellon, 2003). L'ouverture du mPTP est donc à l'origine d'un gonflement matriciel qui pourrait entraîner la rupture des membranes mitochondriales. Ce gonflement est dû à la perte du contrôle de l'homéostasie de part et d'autre de la membrane de la mitochondrie avec entrée d'eau dans la matrice (Solaini & Harris, 2005). Une fois rompue, des facteurs pro-apoptotiques, normalement situés dans l'espace intermembranaire, peuvent être libérés dans le cytosol. C'est le cas du cytochrome c, qui en conditions normales a un rôle de distribution des électrons dans la chaîne respiratoire, mais qui une fois dans le cytosol peut participer à une cascade d'événements conduisant à la mort de la cellule (Halestrap et al., 2007).

On comprend ainsi toute l'importance de la mitochondrie, organite indispensable à la vie des cellules eucaryotes, mais ayant aussi un rôle décisif dans l'induction de la mort cellulaire lors de la reperfusion (figure 23).

4. La cicatrisation

Suite à un épisode d'ischémie-reperfusion, le myocarde entre dans un processus de réparation. Cette réparation fait intervenir plusieurs cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion et des protéines de la matrice extracellulaire. Cette phase inflammatoire va permettre un recrutement cellulaire, principalement les monocytes et neutrophiles.

Le processus de cicatrisation passe par une phase proliférative donnant lieu à un tissu de granulation constitué principalement de macrophages et de fibroblastes qui sécrètent les constituants de la MEC (matrice extracellulaire) et en particulier du collagène. Les fibroblastes sont responsables de la synthèse de collagène et de protéines de la MEC qui vont aboutir à la formation d'une fibrose cicatricielle. Ce processus de cicatrisation est accompagné d'une réinnervation des fibres sympathiques. Après la phase de cicatrisation, le tissu granulaire va laisser place à la cicatrice composée de fibres de collagène. Cependant, une cicatrisation inappropriée peut conduire à une dilatation ventriculaire et à un remodelage cardiaque, responsable à long terme d'une insuffisance cardiaque (Thakker et al., 2006).

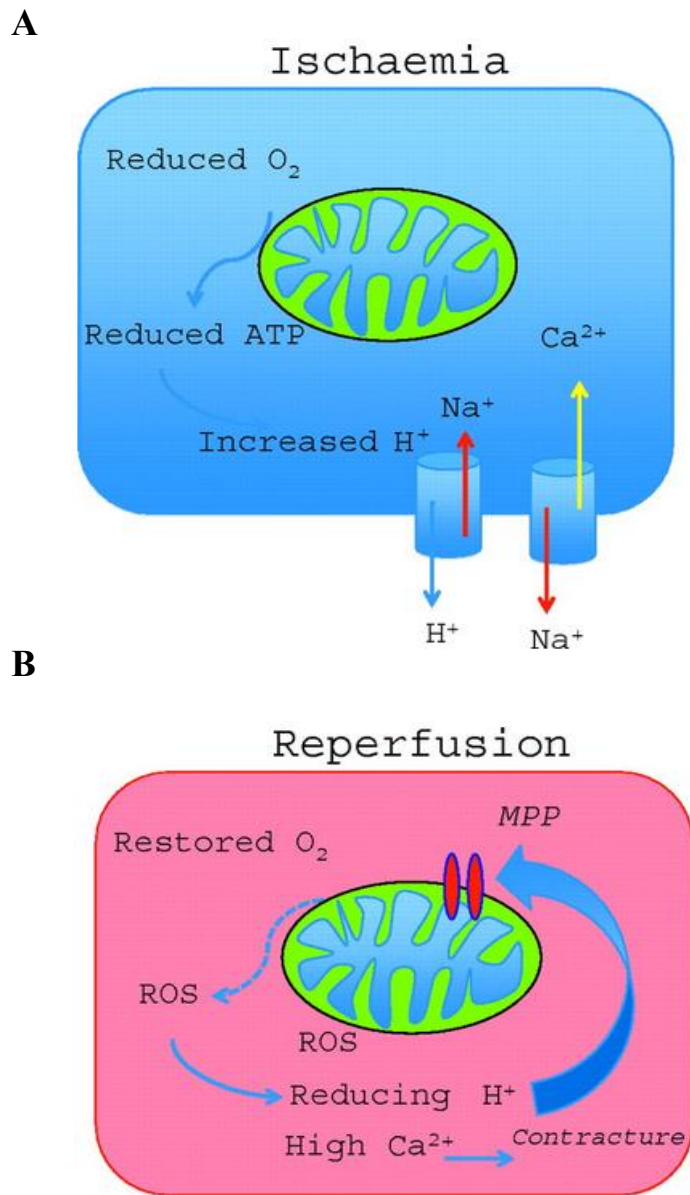


Figure 23. Phénomènes apparaissant dans les deux phases de l'ischémie-reperfusion.

A. Lors de l'ischémie : suppression du transport d'électrons le long de la chaîne respiratoire (modification du potentiel membranaire $\Delta\Psi_m$), entraînant la suppression de la synthèse d'ATP qui aura comme conséquence la mise hors service des pompes refoulant le Ca^{2+} hors de la cellule, la montée de la concentration cytosolique en Ca^{2+} provoquant l'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie.

B. Lors de la reperfusion : l'entrée du Ca^{2+} continue, mais l'arrivée d' O_2 au niveau des complexes I, III et IV provoque la synthèse de ROS en excès. Cet excès, combiné à une forte concentration en Ca^{2+} , détermine l'ouverture du mPTP, d'où une kyrielle d'évènements létaux commençant par la sortie du cytochrome c et aboutissant à l'apoptose.

5. La cardioprotection

Les différents protocoles de protection du myocarde contre les dérèglements fonctionnels et les changements structuraux provoqués par l'ischémie et la reperfusion sont (Minamino, 2012):

- Reperfusion contrôlée (ions, substrats, osmolarité, O₂, postconditionnement). Elle permet de diminuer les lésions de reperfusion qui provoquent des lésions locaux et systémiques.
- Antioxydants (piégeurs de RLO).
- Inhibition d'échanges de cations (NHE) ou d'anion (HCO₃⁻) qui tendent à maintenir le pH dans des limites physiologiques
- Antagonistes des canaux calciques (réduction de la surcharge en Ca²⁺).
- Ouverture des canaux KATP mitochondriaux. Leur ouverture permet la circulation des ions K⁺, ils sont ouverts par des agents comme la bradykinine ou le NO qui inhibent l'ouverture des pores mPTP déclencheurs de l'apoptose.
- Préconditionnement ischémique par des courtes périodes d'ischémie qui assurent une protection précoce ou tardive. Cette opération empêche l'ouverture du mPTP qui débouche sur l'apoptose impliquant les canaux potassique ATP dépendant et calcium dépendant.
- Préconditionnement non-ischémique par l'utilisation d'agents pharmacologique (adénine, opiacés, bradykinine, NO, anesthésiques volatils).

IV. Le safran

Pour s'opposer aux effets délétères des RL, les chercheurs essayent d'utiliser depuis quelques temps, des extraits de plantes qui ont un pouvoir AO. Dans ce cadre, le safran, a attiré notre attention compte tenu de ses propriétés AO puissantes. Le safran est une épice de qualité ayant une grande valeur commerciale. Ce sont les stigmates rouges de la sativus qui donnent, après déshydratation, le safran. C'est l'épice la plus chère au monde, aussi nommé "or rouge" ou "or jaune" à cause de sa couleur qui varie du rouge au jaune. Ce précieux produit a été utilisé durant plusieurs siècles comme médicament pour ses nombreuses vertus médicinales, comme condiment dans la préparation des mets traditionnels, aussi comme teinture et parfum. Aujourd'hui on le retrouve surtout en cuisine et comme plante médicinale.

1. Historique

Le nom "safran" est dérivé du latin safranum, lui-même inspiré de l'arabe "zaafarân" dont la racine exprime une notion essentielle, la couleur jaune. Le nom de genre "Crocus" vient du grec Krokos, qui veut dire "filament", par allusion aux stigmates de la plante. Le terme "sativus", quant à lui, signifie "cultivé", car le *Crocus sativus*, par sa reproduction végétative, ne peut se multiplier sans la main de l'homme (Dupont, 2001).

L'histoire du safran, épice tirée de la fleur de *Crocus sativus*, remonte à la plus haute antiquité. On peut dater l'apparition du safran à plus de 5000 ans, dans les hautes vallées du Cachemire et les plateaux de Perse (Algrech, 2001). Utilisé par les Égyptiens et les Hébreux pour aromatiser et colorer les aliments dans les fêtes religieuses; les médecins des Pharaons le prescrivait aussi pour tous les maux d'estomac. Le safran a ensuite été transmis aux Grecs et aux Romains, qui en ont fait différents usages : dans l'art culinaire, en parfumerie, en teinture. Il en a été de même en Inde et au Maroc. En Sicile et en Italie, la culture du safran date des Romains. Les Arabes, au IX^e siècle, l'introduisirent en Afrique du Nord, puis en Espagne (Pierlot, 1925). L'acclimatation du safran en France date du XII^e siècle, liée essentiellement aux retours des croisades auxquelles s'ajoutèrent les échanges commerciaux avec l'Orient. Cet engouement touche même le sud de l'Angleterre au XV^e siècle. La France considère alors le safran comme un héritage de l'Antiquité et reçoit une forme de légitimité culturelle. Au XIX^e siècle, les mutations économiques amorcent clairement la disparition progressive de la culture française du safran. La découverte des couleurs

artificielles, les transformations des usages alimentaires et l'industrialisation provoquent une diminution du safran en Europe et en France (Dupont, 2001).

Actuellement, le principal pays producteur de safran est l'Iran (150 à 170 t/an), puis l'Inde et le Cachemire (30 à 40 t/an), suivi par la Grèce (5 à 7 t/an), le Maroc (2 à 3 t/an) puis l'Espagne (1 t/an) et l'Italie (100 kg/an). Enfin les petites productions françaises et suisses, avec le safran du Gâtinais et du Quercy (6 kg/an) ou du Mund (1,5 à 3 kg/an). La qualité du safran est évaluée par des normes nationales. Les variétés espagnoles présentent généralement une couleur, un arôme et un parfum plus doux. Les variétés italiennes sont plus puissantes, alors que les variétés les plus intenses sont originaires d'Iran ou d'Inde (Negbi, 1999).

2. Caractère botanique

Le *Crocus sativus* fait partie de la grande famille des Iridacées et du vaste genre *Crocus* qui comprend plus de 80 espèces de plantes bulbeuses de petites tailles. *Crocus sativus* est la seule espèce de *Crocus* produisant le safran; sa classification taxonomique est la suivante:

- Division: Spermatophyte
- Sous-division: Angiosperme
- Classe: Monocotylédone
- Sous-classe: Liliidae
- Ordre: Liliales
- Famille: Iridaceae
- Genre: *Crocus*

Le *Crocus sativus* est une plante monocotylédone, herbacée, pérenne et vivace qui a une floraison automnale et qui est inexistante à l'état sauvage. C'est une plante rustique, à cause de sa morphologie et de sa physiologie. Elle peut atteindre de 10 à 25 cm de hauteur. Sa fleur de couleur mauve est composée de 6 pétales, de 3 étamines jaunes et d'un pistil se divisant en 3 longs stigmates de couleur rouge vif brillant et velouté de 3 à 4 cm. Les stigmates ont un aspect brillant à l'ouverture de la fleur, fins à la base et plus larges à l'extrémité, très odorants et constituent le safran du commerce une fois desséchés. Les feuilles varient de 5 à 11 par bourgeon et se développeront avec ou après la fleur. Le safran se développe à partir de ses bulbes. Le bulbe, aussi appelé corne, de 3 à 5 cm de diamètre, est un organe souterrain qui accumule les substances de réserve nécessaires à la floraison et au bourgeonnement. Le safran a un pollen stérile, et la fleur du *Crocus sativus* ne produit pas de graines viables; sa multiplication

végétative est propagée par les cormes, la plante étant dépendante de l'homme pour sa reproduction. On compte de une à trois fleurs par bulbe et de deux à trois bulbes par plante (Winterhalter & Straubinger, 2000).

3. Culture du safran

Le *Crocus sativus* possède une végétation inversée, c'est-à-dire que les feuilles de safran sortent de terre en septembre et la plante fleurit en octobre, puis se dessèche en mai de l'année suivante. C'est donc en automne, quand tous les autres végétaux s'endorment pour l'hiver, que le safran fleurit. Il entre en dormance au printemps et son feuillage disparaît complètement quand éclatent les bourgeons de la plupart des plantes (Douglas & Perry, 2003).

Le safran est une plante de jours courts, pouvant supporter des conditions climatiques très sévères, adaptée aux régions à hiver froid et été chaud et sec; il peut résister à des températures inférieures à -10 °C ou supérieures à +40 °C durant plusieurs jours (Molina et al., 2005). C'est une culture d'altitude variant entre 650 et 1200 m. *Crocus sativus* aime la chaleur et le plein soleil, il exige un climat méditerranéen continental, avec des hivers frais, des étés chauds et secs. Le safran a été cultivé dans toutes les régions du bassin méditerranéen essentiellement orientales. La conduite de sa culture diffère d'une région à l'autre en fonction des conditions climatiques et édaphiques. Pour une bonne production de la safranière, le suivi de techniques culturales adéquates est primordial (Negbi, 1999; Betti & Schmidt, 2007).

La culture du safran s'adapte à une large gamme de sols, pourvu qu'ils soient profonds, bien drainants et riches en matière organique. Les sols à teneur élevée en argile ainsi que les sols très légers ne conviennent pas à sa culture. Le safran peut néanmoins tolérer des sols à teneur relativement élevée en calcaire (parfois supérieures à 20%); une terre argilo-calcaire qui ne retient pas l'eau est idéale. Le safran est indifférent au pH du sol. Il se porte aussi bien dans des sols acides que dans des sols basiques. Divers modes, dispositifs et densités de plantation peuvent être adoptés. Les opérations culturales incluent la préparation du sol, la fertilisation, l'irrigation et la lutte contre les adventices et les ennemis (maladies et ravageurs) de la culture. Les besoins en eau de la plante, sont relativement moyens (600 à 700 mm/an) et les apports en eau doivent être bien répartis le long du cycle de la plante (Winterhalter & Straubinger, 2000).

La plantation a lieu en fin d'été et au début de l'automne : les bulbes de safran sont déposés dans des trous de 10 à 15 cm de profondeur, en ménageant un espace d'au moins 10 cm entre les plantes qui s'étaleront au fil de l'année. Les cormes du *Crocus sativus* ne survivent qu'une saison. Leur période d'activité se situe de septembre à mai pour ensuite entrer en dormance durant tout l'été. Chaque bulbe mère ne fleurit qu'une fois et engendre, avant de se dessécher, plusieurs petits bulbes ou bulbilles qui produiront de nouvelles plantes. Ils vont puiser leurs ressources dans le bulbe mère qui finira par mourir. Les nouveaux bulbes seront au nombre de 2 à 10; ils doivent être divisés manuellement, puis replantés. Ils grossissent tout au long de l'automne et ensuite vient la période de dormance (Le Nard & De Hertogh, 1993).

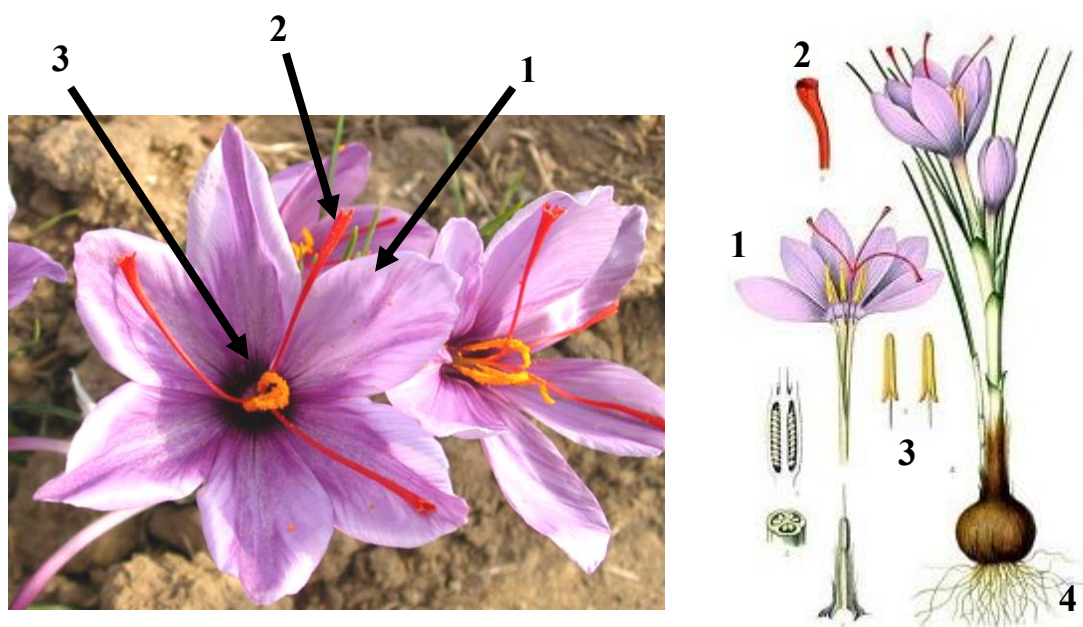


Figure 24. La fleur du *Crocus sativus*: 1: pétales 2: stigmates 3: étamines 4: bulbe.

(www.shahrisaffron.com)

4. Récolte et rendement du safran

Le problème majeur pour la production de safran demeure le coût de la main-d'œuvre. En effet, la récolte exige une main-d'œuvre qualifiée et les stigmates nécessitent d'être immédiatement et délicatement prélevés, séchés, puis conservés à l'abri de l'humidité et de la lumière.

Les fleurs apparaissent 4 à 6 semaines après la plantation et la floraison s'étale sur plusieurs semaines. La fleur de crocus à safran est fragile et elle est d'une durée de vie très limitée (entre 24 et 48 heures). Elle se fane très vite sous l'action du soleil, et ses pistils perdent de leur arôme ainsi que de leur pouvoir de coloration. L'opération de ramassage des fleurs de safran est très délicate. L'ensemble de la fleur est récolté manuellement en coupant la fleur à la base de sa corolle avant son ouverture, tôt le matin avant l'arrivée des chaleurs du jour, afin d'éviter la fanaison des stigmates qui survient quelques heures après l'ouverture de la fleur, une fois celle-ci exposée aux rayons solaires. La récolte est ramassée dans des paniers rigides pour éviter l'entassement et la cassure des stigmates. Le safran récolté quand les fleurs sont entièrement ouvertes est considéré de second choix à cause de la perte de sa qualité organoleptique, une fois exposé au soleil (Kafi et al., 2002).

Après la récolte, vient l'émondage, cette opération consistant à séparer le pistil de la fleur en vue du séchage, seule la partie rouge du pistil étant prélevée. Les fleurs sont donc acheminées pour la séparation des stigmates (le vrai safran) des autres parties de la fleur. Ceci est réalisé le jour même, juste après la récolte. Selon les safraniers, cette action se fait avec les doigts, une paire de ciseaux ou bien une pince à épiler. Les précautions prises lors de la récupération des stigmates conditionnent la qualité du produit. Une fois les stigmates isolés, ils sont séchés dans l'ombre à l'air libre ou à proximité d'un feu ou encore dans un four électrique. Après le séchage, le safran perd 4/5 de son eau. Le poids frais moyen des stigmates de 100 fleurs est près de 3g et le poids sec est près de 600 mg. En effet, il faut cueillir environ 150 000 fleurs de *Crocus sativus* pour récolter un kilo de stigmates frais; et près de cinq kilos de stigmates frais pour faire un kilo de safran sec utilisable en tant qu'épice (Negbi, 1999).

Le rendement moyen d'un hectare de safran dépend des conditions du milieu et de l'âge de la safranière et peut atteindre plus de 10 kg/ha. La durée de stockage du safran est longue si les conditions de conservation sont optimales. La qualité du safran peut être maintenue durant plus de 3 ans. Comme c'est une épice hygroscopique, elle doit être conservée dans un endroit sec, à l'abri de la lumière et de l'air. L'utilisation des conteneurs en verre colorés ou opaques, fermés hermétiquement et placés dans un endroit sec constitue une bonne méthode de préservation de la qualité du safran (Koocheki, 2004).

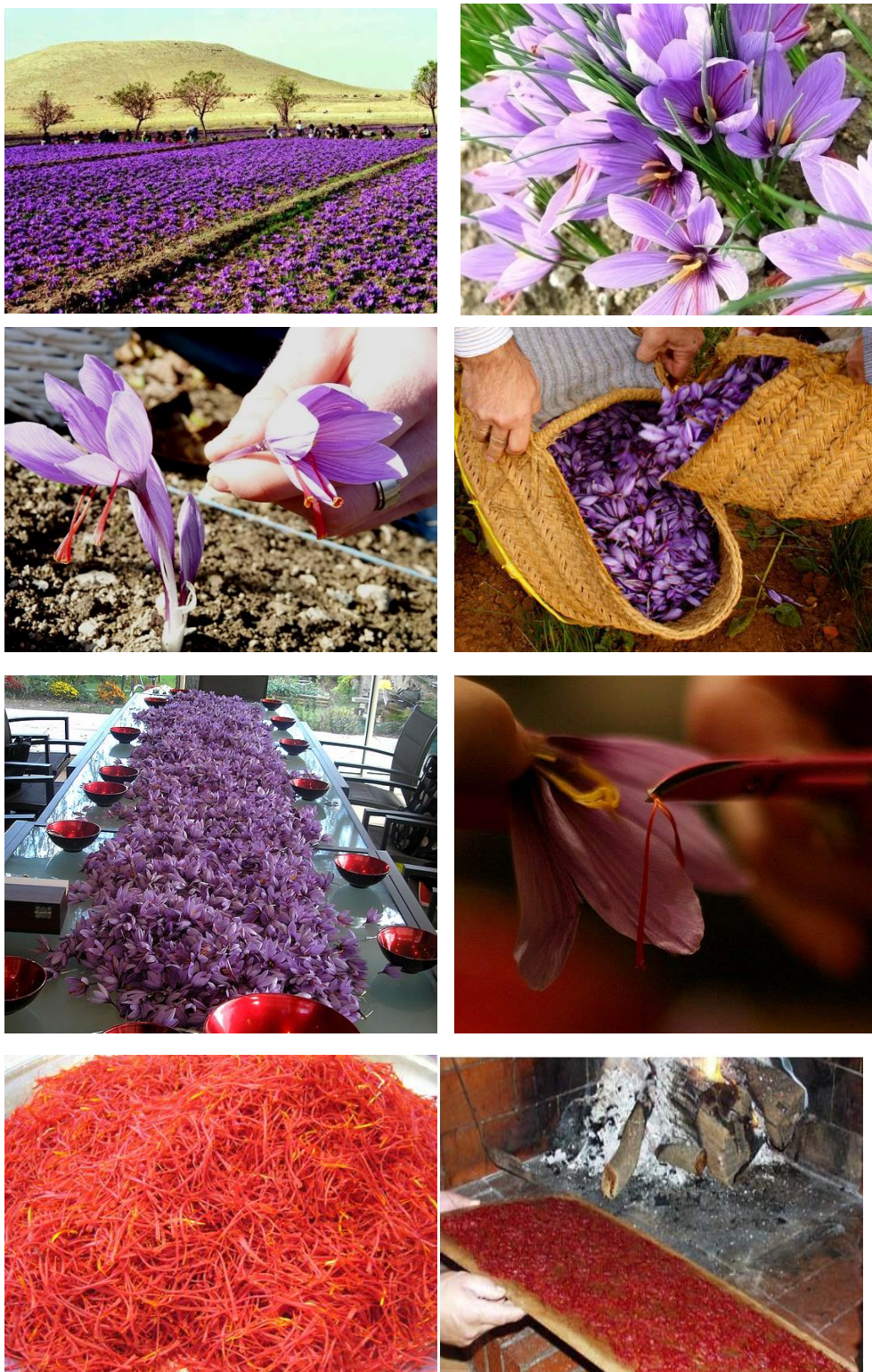


Figure 25. Les étapes de la culture du safran: plantation et floraison, récolte manuelle de la fleur dans des paniers, émondage (récupération des stigmates), et séchage des stigmates à proximité d'un feu.
(www.kashmirkesarkindom.com)

5. Composition chimique du safran

La composition du safran est très complexe: il contient plus de 150 composés volatils et aromatiques. Le safran possède également plusieurs composés non-volatils, les principaux étant les caroténoïdes. Ces composés ont été identifiés par HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (Lech et al., 2009). La lyophilisation peut être appliquée au safran, car aucune perte en composés volatils majeurs n'a été constatée. La détermination de la composition chimique du safran est délicate, car elle suppose une identification botanique correcte, des stigmates non adultérés et sans déchets floraux (Basker, 1999; Moghaddasi, 2010). Des données moyennes de l'analyse chimique du safran sont indiquées ci dessous:

- Glucide (12 à 15%): glucose, fructose, gentibose, xylose et ramnose.
- Eau (9 à 14%)
- Cellulose (4 à 7%)
- Polypeptides (11 à 13 %)
- Lipides (3 à 8 %): campesterol, stigmastérol et β -sitostérol.
- Matières minérales (1 à 1.5 %)
- Vitamines: B2 ou riboflavine (56,4 à 138 $\mu\text{g/g}$) et B1 ou thiamine (4,0 à 0,9 $\mu\text{g/g}$).
- Divers, non azotés (40%)
- Acides gras: acides palmitique, stéarique, oléique, et linoléique.
- Caroténoïdes: α , β , et γ -crocétine, crocine (10%), picrocrocine (4%), α et β -carotène, lycopène, phytoène et zéaxanthine.
- Huiles essentielles (0,3 à 2,0%): où domine le safranal (60%).

Compte tenu de sa large gamme d'utilisations médicales, le safran a été l'objet de vastes études phytochimiques et biochimiques et une variété d'ingrédients biologiquement actifs ont été isolés. Les métabolites secondaires majoritaires du safran sont: la crocine, responsable de la couleur rouge-jaune, la picrocrocine responsable de la saveur et le safranal, composé volatil majoritaire, responsable de l'odeur et de l'arôme.

1) La crocine (C₄₄ H₆₄ O₂₄), est un diester formé par la crocétine liée à chaque extrémité par un diholoside, le gentiobiose. Elle appartient à la famille des C₂₀-caroténoïdes, rouge et soluble dans l'eau. C'est le métabolite biologiquement actif du safran et responsable de sa couleur. En effet, l'application principale du safran concernant ses propriétés antioxydantes et antitumorales, proviennent essentiellement de la crocine (Gutheil et al., 2012) (figure 26).

2) La picrocrocine (C₁₆ H₂₆ O₇), est un glycoside inodore et incolore, responsable de la saveur amère du safran (figure 26). Le clivage des doubles liaisons adjacentes aux cycles de la zéaxanthine entraîne la formation d'une molécule de crocétine et de deux molécules de picrocrocine (Schmidt et al., 2007) (figure 27). Elle constitue également le précurseur du safranal (Tarantilis et al., 1995) (figure 28).

3) Le safranal (2,6,6-triméthylcyclohexa-1,3- diène), est le composé majoritaire de la fraction volatile du safran (figure 26). C'est une molécule organique se présentant sous forme d'huile essentielle volatile. Il est peu ou pas présent dans les stigmates frais, sa concentration dépend des conditions de séchage et de conservation du safran. Le safranal est un produit d'hydrolyse de la picrocrocine (figure 28). L'humidité dégrade la crocine et la picrocrocine, mais permet le développement de l'arôme du safran, le safranal. Les mécanismes de développement de l'arôme lors du séchage et les cinétiques de dégradation des métabolites secondaires lors du stockage du safran sont complexes et peu connus (Rodel & Petrzika, 1991).

Le safran sec est sensible aux fluctuations du pH et sa composition chimique se dégrade rapidement en présence de lumière et à l'air libre. À l'humidité, le safran perd son arôme et noircit. Une auto-oxydation dans le temps de la crocine et de la picrocrocine est observée pour des températures supérieures à 25 °C et à des taux d'humidité relative supérieurs à 23 %. Cette dégradation est expliquée par la fonction antioxydante protectrice des caroténoïdes. En effet, ils génèrent de l'oxygène sous forme singulet, initiant ainsi le processus d'auto-oxydation. C'est pourquoi, il doit être conditionné dans un récipient hermétique, et gardé dans un endroit sec et frais (Tsimidou & Biliaderis, 1997).

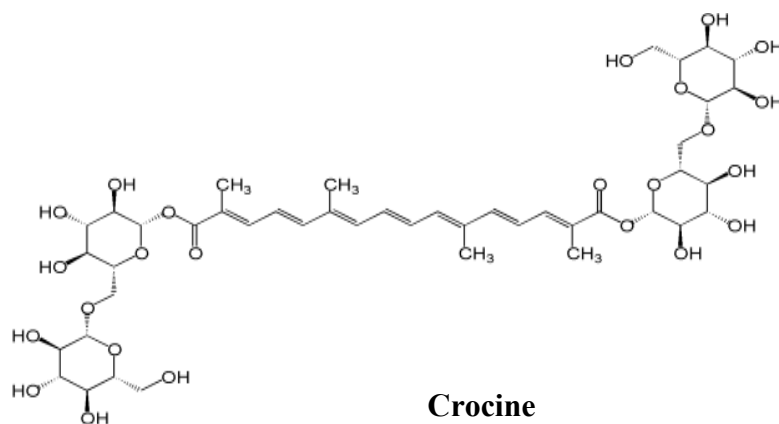
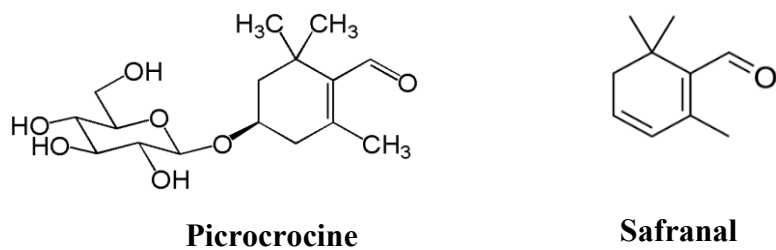


Figure 26. Structure chimique de la picrocrocine, du safranal et de la crocine.

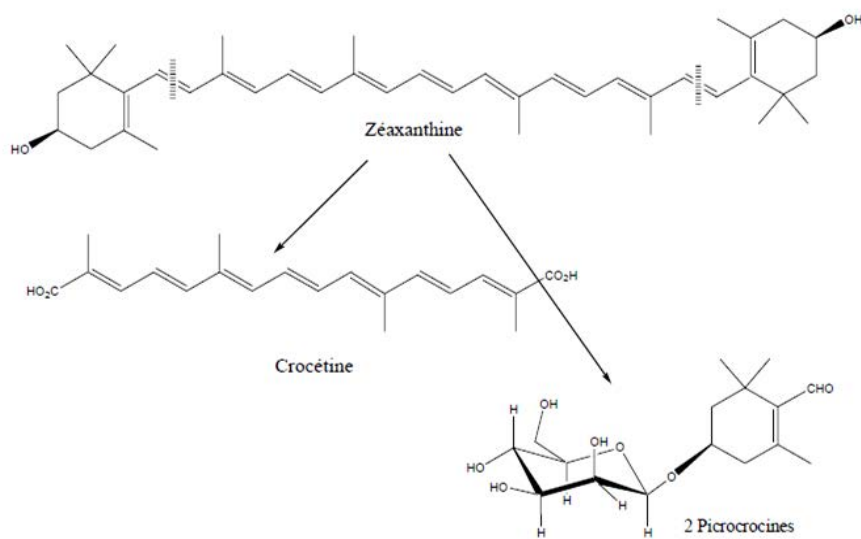


Figure 27. Formation de la crocétine et de la picrocrocine à partir de la zéaxanthine

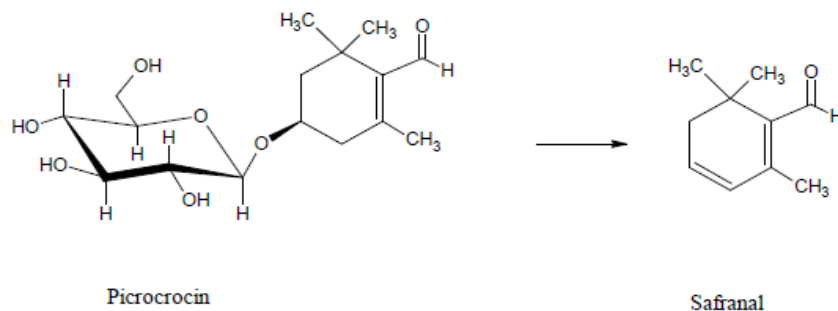


Figure 28. Formation du safranal à partir de la picrocrocine.

6. Effets pharmacologiques

Le *Crocus sativus* est une plante médicinale très ancienne, l'utilisation du safran contre divers problèmes physiologiques et diverses maladies ayant été largement documenté dans les ouvrages anciens méditerranéens, perses et arabes depuis plusieurs millénaires. L'intérêt qu'on lui a porté a toujours été soutenu, et même aujourd'hui, de nombreuses recherches concernent le safran, utilisant des moyens analytiques modernes et des méthodes de recherches cliniques et pharmacologiques confirmant ainsi l'utilisation traditionnelle du safran (Abdullaev et al., 1999; Abrishami et al., 2004).

Depuis l'Antiquité, des vertus thérapeutiques ont été attribuées au safran: antispasmodique, eupeptique, sédatif nerveux et gingival, carminatif, diaphorétique, stomachique, emménagogue, anti-inflammatoire et fortifiant. Il a été utilisé pour soigner les troubles circulatoires, dysménorrhées ou règles douloureuses, digestions difficiles, manque d'appétit, bronchites, asthme, spasmes abdominaux, douleurs oculaires et certains troubles de l'humeur (Sampathu et al., 1984). Toutes ces propriétés traditionnelles ont été confirmées par les recherches cliniques et pharmacologiques récentes. Le safran est essentiellement employé pour ses propriétés thérapeutiques, dues aux caroténoïdes et notamment à la crocine. Le safran étant très onéreux, d'autres produits de synthèse ont été recherchés. Les chercheurs se basent actuellement sur les vertus attribuées au safran dans l'Antiquité afin de découvrir les molécules actives de cette épice. Aujourd'hui, le *Crocus sativus* est prescrit en homéopathie. Les études récentes ont montré que le safran aurait un intérêt pharmacologique dans plusieurs domaines (Schmidt et al., 2007):

1) Cancer: les extraits de safran ont un effet antitumoral in vivo et in vitro, (Abdullaev & Frenkel, 1992; Escribano et al., 1996, Tavakkol-Afshari et al., 2008; Amin et al., 2011) contre plusieurs types de cancer dont: le cancer colorectal (Aung et al., 2007), le cancer hépatocellulaire (Amin et al., 2011) et le cancer de la prostate (D'Alessandro et al., 2013). Dans les extraits de safran, les caroténoïdes sont les principes actifs. Les mécanismes anticancéreux du safran ne sont pas encore bien élucidés mais plusieurs activités ont été proposés dont: la promotion de l'apoptose, la réduction de la prolifération et de la synthèse d'ADN des cellules tumorales, la diminution de l'inflammation, la réduction du stress oxydatif et l'augmentation des enzymes antioxydantes. Les extraits de safran s'avèrent non toxiques sur les cellules saines, mais sélectivement cytotoxiques pour les cellules cancéreuses (Abdullaev, 2001). De plus, le safran possède une activité anti-mutagénique. La crocine, dérivée du safran dispose d'un effet inhibiteur puissant sur la formation des colonies cellulaires tumorales (Abdullaev et al., 2003). Il a été démontré que le traitement par l'extrait de *Crocus sativus* prolonge significativement, jusqu'à presque trois fois, la durée de vie des souris traitées par la cisplatine (Nair et al., 1991).

2) Stress oxydatif: les propriétés anti-oxydantes du safran se manifestent par son effet inhibiteur sur les réactions en chaîne des radicaux libres. Le safran étant riche en vitamine B2 et pro-vitamine A, il représente un des meilleurs antioxydants naturels pour lutter contre le vieillissement des cellules. En effet, les caroténoïdes agissent comme une protection active contre les espèces radicalaires (Serrano-Díaz et al., 2012; Esmaeili et al., 2011; Karimi et al., 2010). Ainsi, il a été montré que le safran protège les cellules cardiaques en augmentant la défense anti-oxydante dans le cas d'endommagements dus à l'ischémie-reperfusion (Hosseinzadeh et al., 2009; Joukar et al., 2013; Qi et al., 2013) et dans le cas des maladies cardiovasculaires (Kamalipour & Akhondzadeh, 2011; Sachdeva et al., 2012).

3) Mémoire: les extraits de safran et ses constituants essentiels (crocine et crocétine), ont amélioré la mémoire et les compétences d'apprentissage chez les souris et les rats chez lesquels il a été induit une déficience du comportement d'apprentissage par l'éthanol. Ainsi, une administration orale de safran pourrait être utile pour le traitement des désordres neuro-dégénératifs et des déficiences liées à la mémoire (Abe & Saito, 2000; Ghadrdoost et al., 2011).

4) Rétine: il a été prouvé que le safran a une activité sur les fonctions rétinienne. Les résultats de plusieurs études montrent qu'il pourrait être utilisé afin de soigner les troubles oculaires tels que la rétinopathie et la dégénérescence de la macula (Abdullaev, 2001).

5) Pression sanguine: les extraits aqueux et éthanolique des pétales de *Crocus sativus* réduisent la pression sanguine d'une manière dose-dépendante (Fatehi et al., 2003).

6) Convulsions: le safran a une activité anti-convulsivante qui provient plus particulièrement du safranal. En effet, les stigmates du *Crocus sativus* pourraient réduire la durée de la crise et retarder le début des convulsions (Hosseinzadeh et al., 2005).

7) Récepteurs adrénergiques: les extraits de safran possèdent un effet stimulateur puissant des récepteurs β_2 adrénergiques qui est dû partiellement au safranal (Nemati et al., 2008).

8) Inflammation: les extraits de pétales et de stigmates du safran montrent des effets antinociceptifs lors du test de douleur induit chimiquement; ainsi que des activités anti-inflammatoires aiguës et chroniques. Ces effets sont dus à la présence des flavonoïdes, tannins, anthocyanins, alcaloïdes et saponins (Hosseinzadeh et al., 2002; Poma et al., 2012).

9) Équilibre émotionnel: le safran est un antidépresseur puissant, il peut aider à lutter contre le stress et les troubles émotionnels. Des études cliniques ont comparé l'efficacité du safran à celle de molécules de synthèse antidépressives (imipramine et fluoxétine connues sous le nom prozac), contre placebo pour le traitement des dépressions: les effets antidépresseurs sont comparables sans en avoir les effets secondaires. La dose habituellement préconisée pour l'amélioration de l'état dépressif est approximativement de 30mg par jour. Aucun effet secondaire n'est connu avec cette posologie (Akhondzadeh et al., 2007; Pitsikas et al., 2008).

10) Toxicité: le safran n'est pas toxique dans les études animales (LD50: 20g/Kg), non cytotoxique dans les études in vitro (LD50: 20mg/mL). Par contre, les cornes sont toxiques pour les petits animaux. Chez l'homme, des études de toxicité montrent que les paramètres hématologiques et biochimiques sont dans les limites normales, avec l'extrait de safran. Par conséquent, le safran est considéré comme non toxique, même à des doses élevées, supérieures à 1,5g par jour (Mohamadpour et al., 2013).

7. Qualité du safran

Le safran ou "or rouge", est le produit alimentaire le plus cher au monde. Les stigmates peuvent être vendus tels quels (sous la forme de filaments), mais ils sont le plus souvent réduits en poudre. Son prix varie de 2 € à 25 €/g (jusqu'à 25 000 €/kg). Sa variabilité est due à l'origine de l'épice et à sa qualité. La qualité du safran dépend de sa pureté et de sa composition chimique. La pureté peut être évaluée par l'aspect visuel et olfactif de l'épice: le goût, la couleur rouge vif, l'odeur intense et piquante, les stigmates longs et souples, et l'absence d'étamines ou de débris de pétales (Mehta et al., 2002). Sa réelle détermination s'effectue par l'analyse par HPLC de la composition chimique du safran et notamment sa teneur en métabolites secondaires, ce qui permet de classer le safran en trois catégories, selon la teneur en crocine, picrocrocine et safranal. De nombreux facteurs influencent la formation et la rétention de ces métabolites dans le safran : le territoire, le climat, le mode de culture, de récolte, de préparation, le séchage et de stockage. La période de récolte la plus propice se situe lorsque la fleur est entièrement sortie, sa teneur en crocine et picrocrocine étant alors maximale. La qualité du safran est assurée essentiellement par son séchage et sa conservation (Algrech, 2001).

8. Utilisation du safran en cuisine

Le safran est de plus en plus présent dans les cuisines. Il parfume avec subtilité viandes et poissons, légumes, riz et pâtes, rehausse la saveur des desserts et apporte une couleur exceptionnelle, jaune or, aux plats. Le safran ne révèle jamais ses saveurs instantanément: il a besoin d'infuser une demi-heure minimum pour développer ses arômes. L'infusion de safran dans un liquide acide (citron), du lait, de la crème fraîche, ou une sauce chaude, permet d'introduire l'épice dans un plat en fin de cuisson et de lui éviter ainsi la dégradation due à un long mijotage. Le safran ne supporte ni la friture, ni l'ébullition prolongée. L'acidité optimise son goût, les corps gras le fixent. Le safran peut être mélangé avec d'autres arômes et épices (thym, ail, anis, cannelle, gingembre), il va alors agir comme exhausteur de goût (Hill, 2004).

TRAVAUX PERSONNELS

*« On ne peut pas croire à tout ce qu'on entend,
on ne peut pas croire à la plupart de ce qu'on lit,
mais on peut croire à tout ce que l'on fait... »*

I- Matériels et méthodes

1. Préparation de l'extrait de safran

Le safran libanais utilisé a été cultivé dans la vallée de la Bekaa sous le contrôle du Dr. Hassane Makhoulf (Université Libanaise). Pour chaque protocole, 2 g de stigmates séchés de safran ont été suspendus dans 400 ml d'un mélange méthanol-eau (50:50, v/v) incubés 24 h dans l'obscurité sur un agitateur magnétique à 4°C. Le mélange a été ensuite filtré et le filtrat placé dans un rotavapeur à 40 °C (figure 29 A) pour assurer l'évaporation du méthanol. La solution obtenue a été réfrigérée pendant 3 jours puis soumise à une lyophilisation pendant 48 h (figure 29 B). Le rendement de l'extraction de safran à partir de stigmates séchés est ensuite calculé.



Figure 29. Evaporation du méthanol par rotavapeur (A) puis lyophilisation (B).

Par ailleurs, des extractions à l'eau ont été effectuées :

- Macération : 3 g de stigmates séchés de safran ont été macérés pendant 24 heures à 40 °C dans 300 ml d'eau distillée.
- Safran bouilli dans l'eau : 0.5 g de stigmates séchés de safran ont été ajoutés à 20 ml d'eau distillée et bouillis pendant 5 min.

2. Analyse par HPLC

Nous avons eu recours pour l'analyse quantitative des extraits de safran à un appareil HPLC Agilent 1100 (McKinley Scientific, New Jersey, USA) à système multi-solvants équipé d'une pompe quaternaire, un dégazeur, un injecteur, un détecteur UV de longueur d'onde variable à barrette de diodes (DAD), une colonne Spherisorb RP C18 de 20 cm de longueur, 4.6 mm de diamètre intérieur, taille des particules 10 μm avec un diamètre de pores de 80 Å. La phase mobile consistait en un gradient linéaire de méthanol (10-100 %) dans l'eau (15 % d'acétonitrile) avec un débit de 1.0 mL/min et un volume d'injection de 20 μL . Les échantillons ont été analysés en duplicata. Sept concentrations différentes (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.03 et 0.015) de l'étalon interne (2-nitroaniline) ont été préparées et utilisées pour établir la courbe d'étalonnage. Le safranale a été détecté à 310 nm et les crocines à 440 nm (figure 30).



Figure 30. Appareil HPLC utilisé.

3. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols ont une activité antioxydante importante, leur teneur peut être déterminée en mesurant l'indice de Folin-Ciocalteu (IFC). Ainsi, le dosage des composés phénoliques repose sur la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit ce réactif en

un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur produite possède une absorption maximale à 725 nm. Elle est proportionnelle au taux de composés phénoliques oxydés, donc à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (Ortiz et al., 2013).

D'abord 500 mg de l'extrait méthanol-eau de safran ont été dilués dans 500 mL d'eau distillé. La méthode de Folin-Ciocalteu consiste à introduire successivement dans une fiole jaugée de 100 ml: 0.5 ml de la solution diluée de safran, 2.5 mL du réactif de Follin-Ciocalteu, 5 ml de carbonate de sodium (35 % m/v) et on complète au trait de jauge par de l'eau distillée. On laisse incuber 1 heure à l'obscurité, à température ambiante, puis on mesure l'absorbance à 725 nm par un spectrophotomètre Milton Roy UV-Visible contre le blanc où le safran sera remplacé par de l'eau distillée. Les valeurs ont été exprimées en mg/L équivalents d'acide gallique (GAE). La droite d'étalonnage est préparée à partir d'une solution pure d'acide gallique utilisant différentes concentrations (10, 20, 30, 40 et 50 mg/L). La préparation de ces solutions étalons est similaire à celle des solutions de safran mais l'acide gallique est utilisé à la place du safran.

4. Détermination in vitro du pouvoir antioxydant du safran

4.1. Génération de radicaux libres par électrolyse

4.1.1. Mode opératoire

20 mL de tyrode (tel que représenté à la figure 31) sont introduits dans une cuvette munie de 2 électrodes en platine fixés dans du gel à 2 cm l'une de l'autre et reliés par des fils électriques à un stimulateur Harvard qui délivre un courant de 10 mA appliqué pendant 4 min et contrôlé par un multimètre digital. Une cascade de radicaux libres est générée par suite de l'électrolyse dans la solution de tyrode, un agitateur magnétique assure la répartition homogène de ces radicaux. À chaque minute d'électrolyse un volume de 1 ml de tyrode électrolysée est ajouté à 2 ml d'une solution de tyrode non électrolysée dans laquelle on a ajouté 2 ml de DPD (N, N di-éthyl-P-Phénylènedialanine) (25 mg/L). Les espèces oxydantes induites par électrolyse réagissent instantanément avec le réactif DPD pour produire une couleur rouge, mesurable au spectrophotomètre à 515 nm et dont l'intensité varie selon la quantité de RLO libérés en fonction du temps (Dumoulin et al., 1996).

La capacité antioxydante du safran a été évaluée en procédant à une électrolyse en présence de différentes concentrations d'extraits de safran et de ses constituants majeurs (safranal et crocine) ainsi que deux substances de référence, SOD et déféroxamine.

4.1.2. Dispositif expérimental

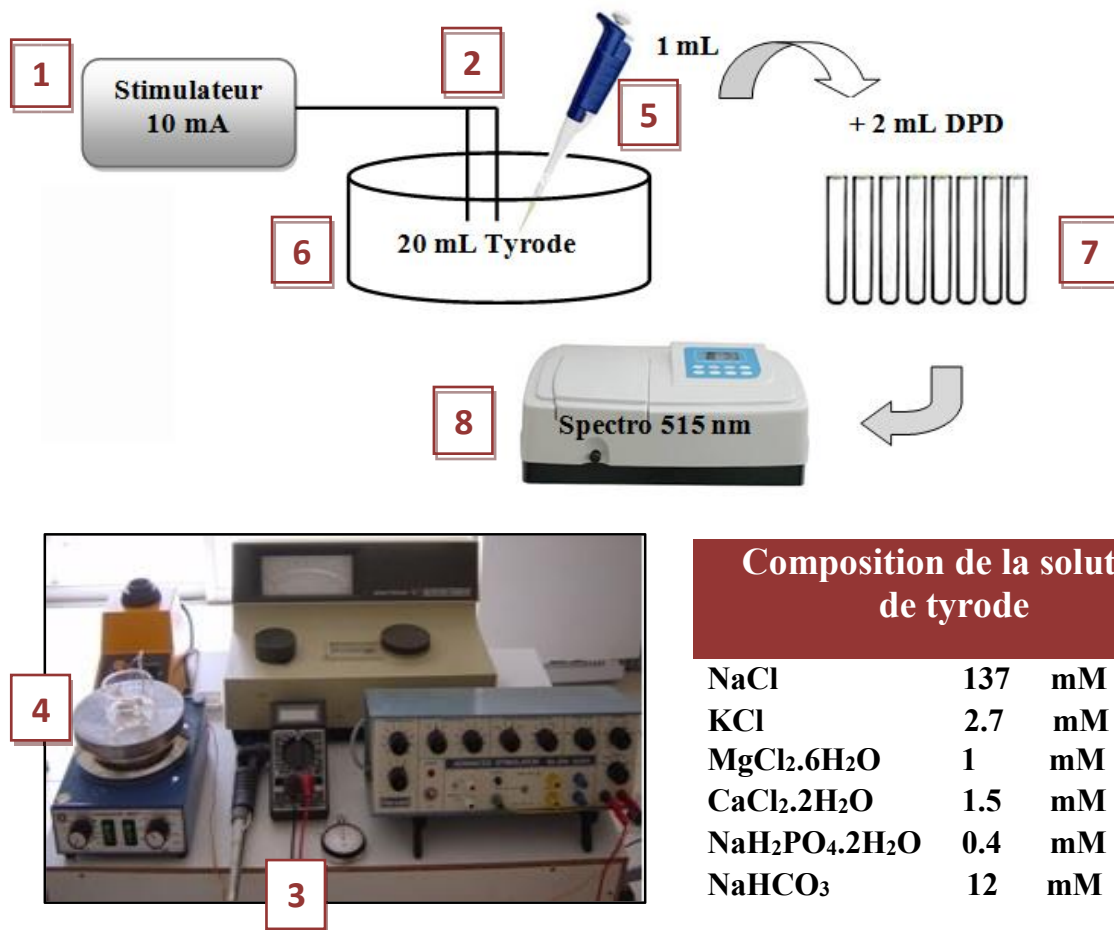


Figure 31. Montage de l'électrolyse. 1: Stimulateur; 2: Deux électrodes en platine; 3: Multimètre sensible; 4: Agitateur magnétique; 5: Propipette réglable (10-1000 μ L); 6: Cuvette pour l'électrolyse de la solution; 7: Tubes de mesures d'absorbance; 8: Spectrophotomètre.

4.2. Xanthine-xanthine oxydase (XXO)

La capacité antioxydante du safran a été évaluée aussi dans ce système en présence de différentes concentrations d'extraits de safran et de ses constituants majeurs (safranal et crocine) ainsi que deux substances de référence, SOD et déféroxamine.

On utilise le même dispositif décrit précédemment pour l'électrolyse mais on substitue les électrodes reliées au stimulateur (source d'une grande variété d'espèces radicalaires) par le système XXO qui produit spécifiquement dans la solution de tyrode le radical superoxyde. Le système XXO est constitué d'une enzyme: la xanthine oxydase (0,005 U/mL) qui agit sur son substrat la xanthine (50 μ M) en présence de 0.1 mM EDTA, libérant ainsi le radical superoxyde.

À cause du fonctionnement lent du système XXO par rapport à celui de l'électrolyse, on attend une demi-heure avant d'effectuer des prélèvements de 1 mL de tyrode, chaque 2 minutes durant 10 minutes, auquel on ajoute 2 mL de cytochrome c (0.05 mM) qui va être réduit et se colorer. On peut ainsi mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 550 nm, qui est fonction de la quantité de RLO produits (Hanna et al., 2004).

5. Modèle ex-vivo : cœur isolé de lapin

5.1. Méthode chirurgicale et perfusion du cœur isolé

Des lapins mâles, *Oryctolagus cuniculus*, variété locale, pesant entre 1.5 et 2 kg, sont achetés chez un éleveur conventionnel. Ces animaux sont gardés pendant une semaine dans notre laboratoire dans des cages métalliques individuelles dans des conditions optimales de température (22 ± 1 °C) et d'éclairage (cycle 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité) avec accès à la nourriture et à l'eau ad libitum. Ils sont surveillés, avec prise de poids quotidienne. Subséquemment, tout animal présentant un comportement maladif est écarté.

Le jour de l'expérimentation les animaux sont choisis au hasard pour être alloués aux différents protocoles. Chaque lapin reçoit via la veine marginale de l'oreille de l'héparine (250 UI/Kg) puis anesthésié par injection intrapéritonéale de 25 mg/Kg d'un mélange kétamine et xylazine. Le thorax est ouvert par thoracotomie bilatérale et le cœur est rapidement extrait après section de l'aorte, des artères pulmonaires et des veines caves. L'aorte est canulée et le cœur adéquatement placé sur l'appareil de perfusion et perfusé de manière rétrograde via l'aorte selon la technique de Langerdorff à pression constante (60 cm d'eau) par une solution de tyrode (figure 32), oxygénée par un mélange contenant 95 % O₂, 5 % CO₂ permettant de garder un pH constant de 7.4. La température est maintenue à 37 °C. Le cœur n'est pas stimulé et se contracte spontanément.

La solution de tyrode formée de produits chimique de grade analytique (figure 32) est fraîchement préparée chaque jour puis filtrée (0.45 μm filtre Whatmann) avant d'être administrée dans la circulation coronaire du cœur. Toute solution qui présente une allure trouble n'est pas utilisée.

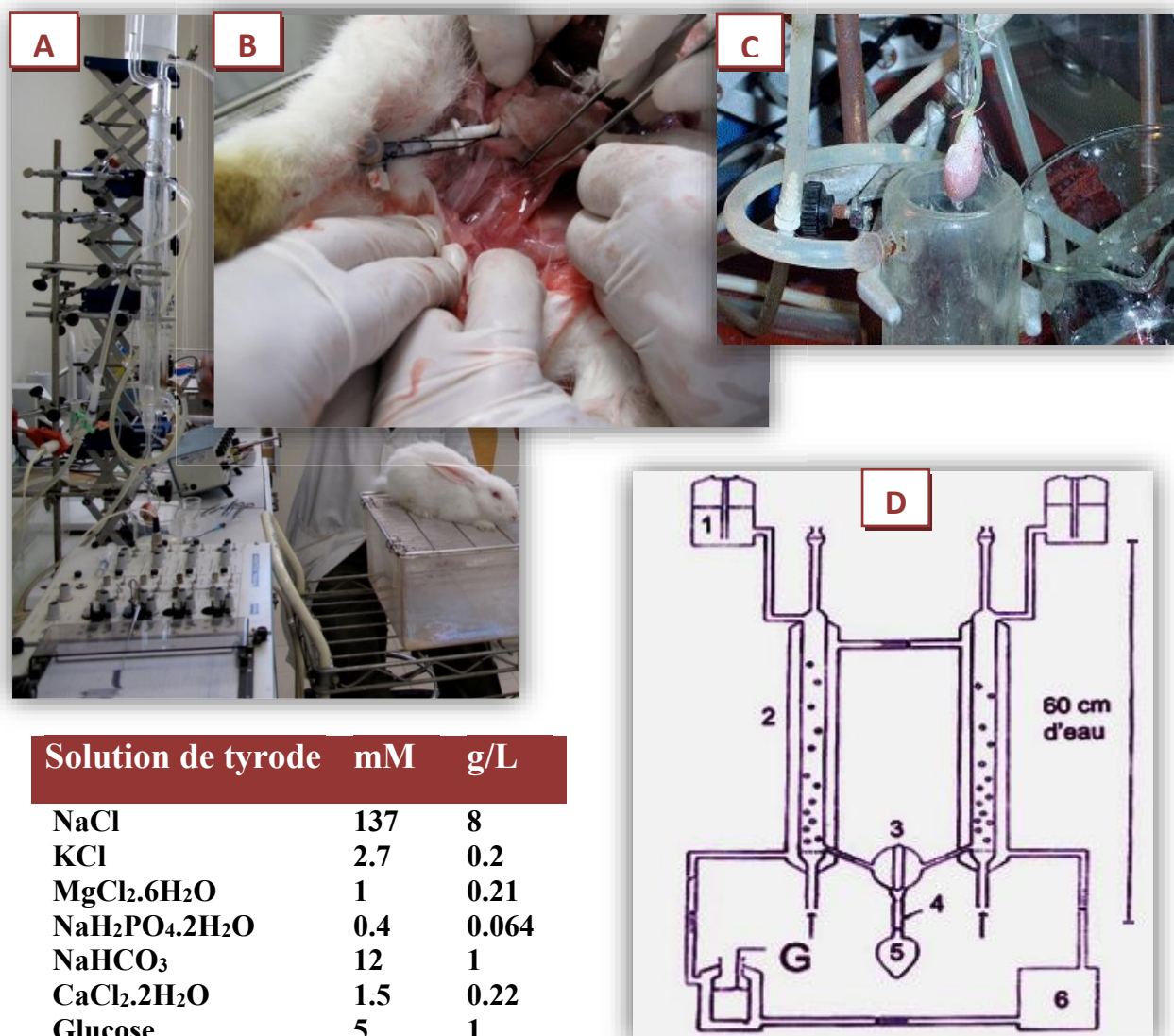


Figure 32. A. Lapin *Oryctolagus cuniculus* + montage B. Chirurgie d'isolement du cœur C. Cœur perfusé selon la technique de Langendorff D. Schéma de l'appareil de perfusion du cœur isolé: 1: Réservoir de tyrode 2: Réfrigérant 3: Robinet à deux voies 4: Canule de perfusion 5 : Cœur 6 : Bain marie 37 °C. G: Gaz carbogène.

5.2. Détermination des paramètres cardiodynamiques et électro-physiologiques

L'activité mécanique du cœur est suivie par la mesure de la pression intra-ventriculaire gauche systolique et diastolique via un cathéter portant à son bout un ballonnet en latex (rempli d'eau), introduit dans le ventricule gauche à travers la valve mitrale par une incision du toit de l'oreillette gauche. Le volume du ballonnet est contrôlé et ajusté à l'aide d'une voie latérale reliée à une seringue. La standardisation de la pression est réalisée à l'aide d'un manomètre pour fixer la valeur 0 et 100 mmHg. En conditions de référence, le volume du ballonnet est ajusté de manière à obtenir une pression intra-ventriculaire en fin de diastole aux alentours de 10 mmHg, et laissée constante durant le protocole de perfusion.

Le ballonnet, connecté à un capteur de pression, est lui-même relié à un système d'enregistrement (Harvard Aparatus), permet de visualiser et d'analyser en continu la pression développée par le ventricule gauche. Le ballonnet induit un étirement et subit la contraction du ventricule. L'enregistrement continu de la pression exercée par le myocarde sur le ballonnet inséré dans le ventricule gauche permet d'obtenir la pression développée.

Deux électrodes, l'une placée autour de l'aorte et la deuxième au niveau de l'apex permettent d'enregistrer l'ECG. Par ailleurs, le débit coronaire est mesuré à intervalles réguliers à l'aide d'une éprouvette graduée. Tout cœur ayant manifesté une anomalie au niveau de la contractilité ou du rythme est retiré.

Les tracés sont ensuite analysés et les valeurs rapportées dans des tableaux afin de calculer la moyenne et les écarts types ou les pourcentages de variation s'il y a lieu et soumis aux tests statistiques appropriés.

5. 3. Protocoles expérimentaux

Nous avons adoptés trois protocoles mettant en jeu le cœur isolé de lapin :

5.3.1. Effet comparatif de l'électrolyse et de la doxorubicine

Chaque cœur est laissé perfuser pendant 15 min pour se stabiliser. Le groupe témoin est perfusé avec la tyrode seule et un autre groupe avec la tyrode contenant le safran (10 µg/mL) (figure 33 ;

1, 2). Ensuite, la solution de tyrode arrivant au cœur est électrolysée pendant 30 min à 3 mA par le biais de 2 électrodes en platine placées dans la canule qui perfuse le cœur et ceci en présence ou absence de safran (10 $\mu\text{g/mL}$) et catalase (150 UI) comme contrôle positif (figure 33; 3, 4, 5) administrés 1 min avant et pendant l'électrolyse. D'autre part, les cœurs sont traités par la DOX 30 μM pendant 30 min seule ou avec le safran (10 $\mu\text{g/mL}$) (administré 1 min avant et en parallèle avec la DOX); la catalase étant un contrôle positif (150 UI) (figure 33; 6, 7, 8). Les paramètres cardiodynamiques (pression ventriculaire gauche, pression télédiastolique, fréquence cardiaque et débit coronaire) ont été déterminés, ainsi que les paramètres électrophysiologiques, biochimiques (LP et SOD) et histopathologiques.

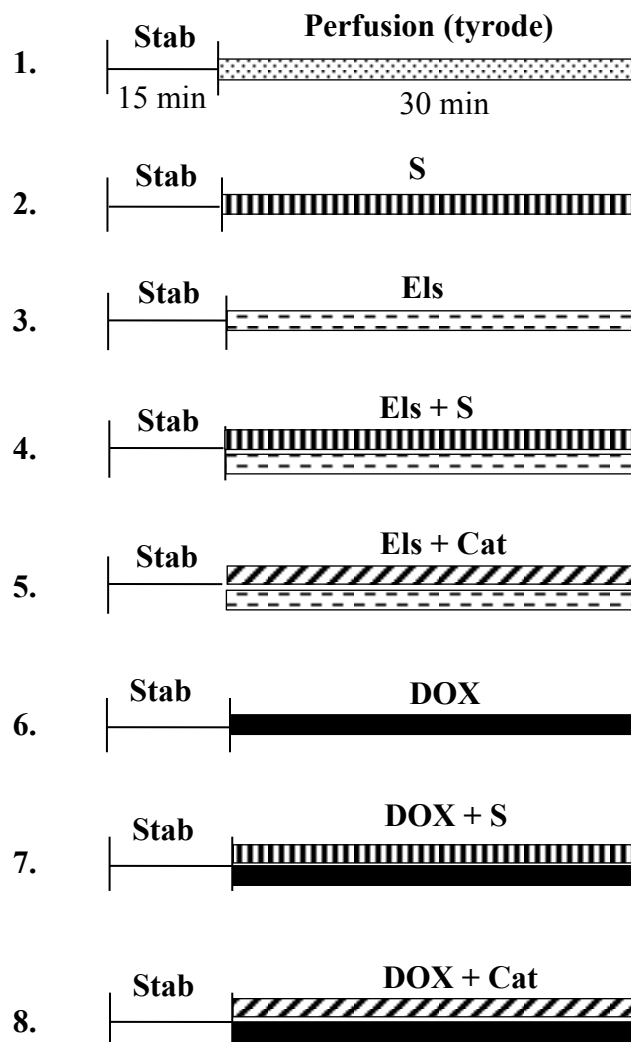


Figure 33. Protocole expérimental pour rechercher les dommages provoqués au cœur isolé de lapin par les radicaux libres générés par électrolyse de la solution de perfusion du myocarde versus un traitement par la doxorubicine en présence ou absence de safran et de catalase. (n=5-10). Cat: catalase; DOX: doxorubicine; Els: électrolyse; Stab: période de stabilisation; S: safran.

5.3.2. Effet en aigüe de la doxorubicine et du safran sur le cœur en ischémie/reperfusion

La cardiotoxicité aiguë de la DOX a été étudiée sur le cœur isolé de lapin soumis à une ischémie globale suivi de reperfusion, qui est une autre source de RLO. Le groupe témoin a été perfusé avec de la tyrode seule durant 70 min (figure 34 ; 1). Une ischémie totale de 30 min suivi de 40 min de reperfusion a été réalisée (figure 34 ; 2). Le safran (10 µg/mL) a été administré pendant 5 min, avant l'ischémie ou à la reperfusion dans la solution de perfusion (figure 34 ; 3, 4). La DOX (5 µg/mL) a été injectée à la reperfusion (figure 34 ; 5), avec ou sans safran (10 µg/mL) administré pendant 5 min, avant l'ischémie ou à la reperfusion dans la solution de perfusion (figure 34 ; 6, 7). La LVP (pression ventriculaire gauche), LVEDP (pression télédiastolique), HR (fréquence cardiaque), CF (débit coronaire), l'incidence des arythmies, la peroxydation lipidique (LP), l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), et les paramètres histopathologiques ont été déterminés. Par ailleurs, une extraction de protéines du tissu cardiaque a été réalisée pour l'étude par western blot.

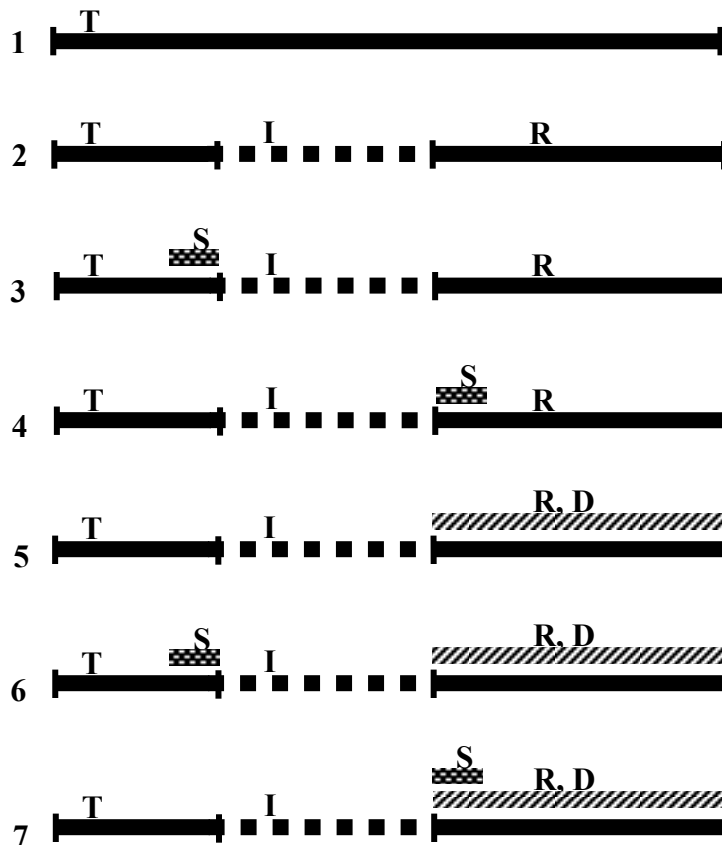


Figure 34. Protocole expérimental pour rechercher les dommages provoqués au cœur isolé de lapin par les radicaux libres générés lors de la reperfusion post ischémique accompagnée ou non d'un traitement par la doxorubicine en présence ou absence de safran perfusé pendant 5 min en pré ou post ischémie. (n=5-10). T: Tyrode; S : Safran; I: Ischémie; R: Reperfusion; D: Doxorubicine.

5.3.3. Effet par administration chronique de la doxorubicine et du safran sur le cœur en ischémie/reperfusion

40 lapins mâles ont été utilisés dans cette étude. Ils ont été répartis au hasard en 4 groupes (n = 10-12 /groupe). Groupe I (contrôle) sans aucun traitement. Groupe II : traité par voie orale avec une dose optimale d'extraits de safran SAF (5 mg/kg de poids/j) pendant 6 semaines. Groupe III : traité avec une dose ip unique de doxorubicine DOX (2,5 mg/kg de poids) par semaine pendant 4 semaines et ceci à partir de la 3ème semaine. Groupe IV : traité avec du SAF comme pour le groupe II puis DOX comme pour le groupe III. Une semaine après la fin du traitement, les lapins survivants ont été sacrifiés et leurs cœurs isolés et perfusés selon le modèle de Langendorff et soumis à une période de 30 min d'ischémie globale (I) suivie par 30 min de reperfusion (R) suite à une période de 15 min de stabilisation (figure 35). Par ailleurs, un groupe de 5 lapins a été utilisé comme témoin sans subir de traitements au préalable et sans que le cœur soit soumis à une IR. Nous avons aussi administré la DOX pendant 30 min à 5 cœurs provenant de lapins ayant reçu le safran par voie orale pendant 6 semaines.

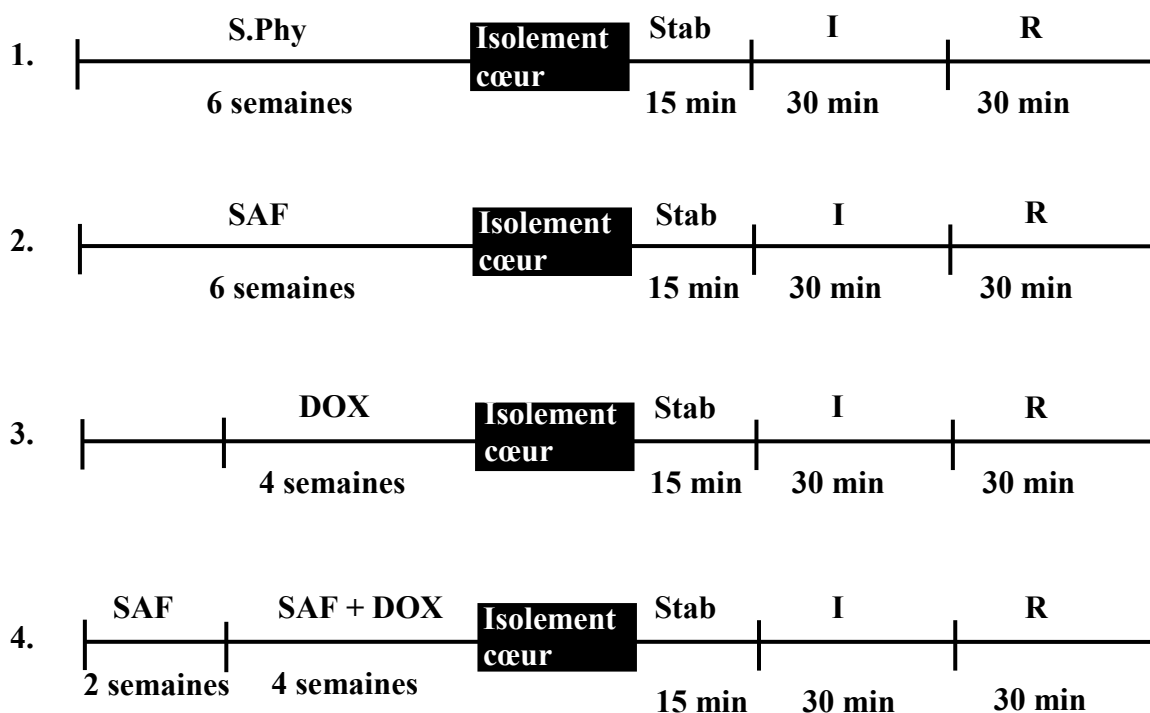


Figure 35. Protocole expérimental pour rechercher les dommages provoqués au cœur isolé de lapin par les radicaux libres générés lors de la reperfusion post ischémique suite à un traitement chronique ip de 4 semaines de doxorubicine en présence ou absence de l'administration de safran en po. (n=10-12). SAF: Safran; I: Ischémie; R: Reperfusion; DOX: Doxorubicine; S.Phy : solution physiologique.

Comme pour le protocole précédent; LVP, LVEDP, HR, CF, l'incidence des arythmies, la peroxydation lipidique (LP), l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et les paramètres histopathologiques ont été déterminés. Par ailleurs, l'étendue de la zone ischémique a été évaluée ainsi que le test au nitroblue tetrazolium.

5.4. Étude anatomopathologique

Certains cœurs de chaque protocole ont été introduits à la fin dans le formol 10 % pour l'étude anatomopathologique. Ces cœurs ont été fixés à la paraffine, colorés à l'hématoxyline-éosine, puis coupés au niveau des ventricules horizontalement ou verticalement en fines tranches par un microtome pour être visualisées au microscope optique.

5.5. Test au nitroblue tetrazolium

Certains cœurs du troisième protocole ont été traités par une solution de nitroblue tetrazolium (NBT) 25 μ M pendant une minute avant de les introduire dans le formol. En effet, le NBT s'oxyde en se combinant aux RLO produisant des cristaux violacés de formazan pouvant être quantifiés au microscope optique (Chahine et al., 1997).

5.6. Détermination de la zone ischémique

Certains cœurs du troisième protocole (paragraphe 5.3.3) ont été coupés en fines tranches de 2 mm d'épaisseur puis incubés 20 min à 37 °C dans 1 % chlorure de triphényl tétrazolium (TTC) à pH 7.4 dans un tampon phosphate. Ceci permet de différencier les cellules viables colorées en rouge alors que les zones myocardiques infarctées restent blanches. Les tranches horizontales au niveau des ventricules de cœurs sont ensuite fixées dans du formaldéhyde 10 % pendant 24 h, puis photographiées.

6. Méthodes biochimiques

A la fin de chaque protocole, les cœurs destinés aux test biochimiques sont stockés dans un congélateur à -80 °C jusqu'au moment du dosage. Les cœurs sont ainsi pesés puis broyés dans du tampon phosphate à une température entre 0 et 4 °C et soumis à des analyses chimiques et enzymatiques.

6.1. Peroxydation lipidique (LP)

Le malondialdéhyde (MDA) est un marqueur de la peroxydation lipidique, il a été mesuré à partir d'homogénats de cœurs par le TBARS assay. Le dosage des TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) est basé sur la réaction du MDA avec le TBA (acide thiobarbiturique), sous conditions de haute température et d'acidité. Le complexe de couleur rouge MDA-TBA formé a été mesuré par colorimétrie.

Les échantillons des cœurs ou du standard ont été ajoutés à la solution contenant le TBA (0.6%) et l'acide phosphorique (1%). Le mélange réactionnel a été incubé pendant 45 min à 100 °C. Après l'incubation, les échantillons et les standards ont été refroidis sur la glace pendant 10 min afin d'arrêter la réaction et 4 ml of n-butanol ont été ajoutés. Puis, une centrifugation a été effectuée à 3000 rpm pendant 20 min. Ensuite, les échantillons et les standards ont été reposés durant 30 min à la température de la pièce avant que l'absorbance du surnageant soit mesurée à 532 nm et le niveau de MDA exprimé en nmol/g tissue. Nous avons aussi utilisé à cette fin le TBARS assay kit catalog No.10009052 (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, USA).

6.2. Activité superoxyde dismutase (SOD)

Le kit Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, USA) a été utilisé pour mesurer l'activité de la SOD. Ce test utilise un sel de tétrazolium pour la détection du radical superoxyde généré par la xantine et la xantine oxydase (figure 36). Une unité d'activité de la superoxyde dismutase a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber 50 % du radical superoxyde. Ce kit mesure les 3 types de SOD: Cu/Zn, Mn et Fe-SOD.

L'activité de la superoxyde dismutase a été mesurée à partir d'homogénats de cœurs de chaque échantillon préparé sur la glace dans 50 mM de tampon phosphate de potassium (pH 7.8) contenant 1.34 mM d'acide diéthylène triamine penta-acétique. D'après les instructions du manufacturier, suite à une incubation 20 min à température ambiante l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 460 nm. La réalisation d'une droite de référence de la variation de l'absorbance à partir de solutions gammes de SOD commerciale permet d'évaluer la concentration de superoxyde dismutase des échantillons.

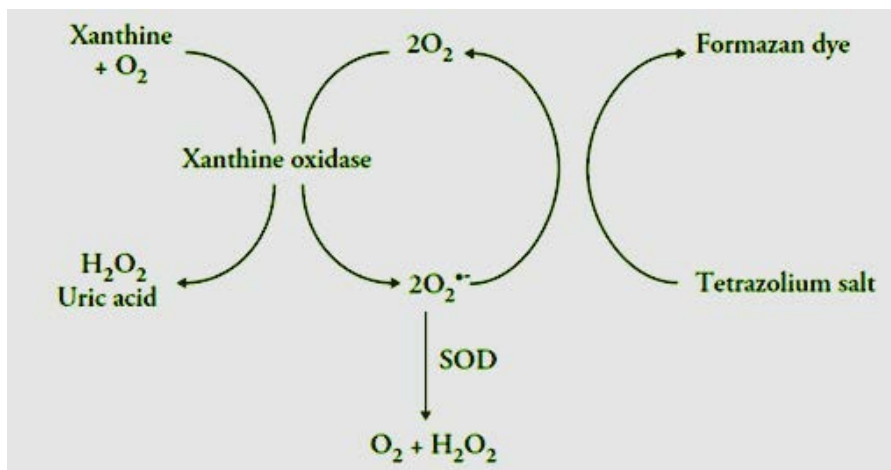
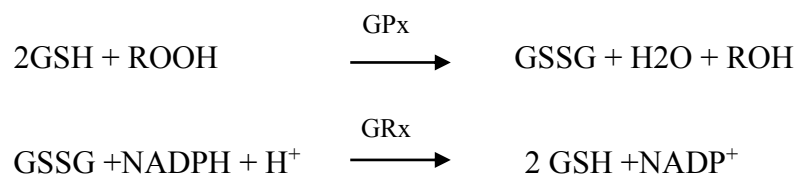


Figure 36. L'activité du kit pour la détection de la superoxyde dismutase.

6.3. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la GPx a été mesurée à l'aide d'un kit de dosage de la glutathion peroxydase (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, USA). Le principe de ce test est fondé sur la réduction des hydroperoxydes organiques en alcools par la GPx parallèlement à l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). L'activité GPx est mesurée indirectement par une réaction couplée avec le glutathion réductase (GRx). Le GSSG, dont la formation est dépendante de l'activité de la GPx, est ensuite réduit par la glutathion réductase (GRx) en présence de NADPH. L'oxydation du NADPH en NADP⁺ est accompagnée d'une diminution de l'absorbance à 340 nm. L'activité de la GPx est ainsi déterminée par spectrophotométrie suivant la décroissance de l'absorption du NADPH à 340 nm.

Le tissu a été homogénéisé dans 5 mL/g de tampon composé de 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA et 1 mM dithiothréitol. L'homogénat a été centrifugé à 10000 g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant a été retiré pour le dosage de la glutathion peroxydase.



6.4. Dosage de la créatine kinase (CK)

Pour effectuer le dosage de la créatine kinase (CK), le perfusat élué du cœur isolé de lapin pendant les périodes de reperfusion, a été recueilli dans un bûcher maintenu refroidi dans la glace. L'activité enzymatique de la CK a été mesurée par spectrophotométrie à 37 °C en utilisant un kit de dosage Creatine Kinase Activity Assay kit Abcam, France (ab 155901).

6.5. Extraction des protéines du tissu cardiaque

Des fragments de 0.5 g au niveau de l'apex des cœurs congelés à -80 °C ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur à froid dans le tampon RIPA (Radioimmuno Precipitation Assay buffer) constitué de 50 mM Tris HCl pH 8; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% SDS; 100 mM EDTA, auquel on a ajouté des inhibiteurs de protéases. Le mélange est passé au vortex vigoureusement pendant 5 min afin que le culot soit entièrement remis en suspension puis déposé dans la glace pour 15 à 20 min. Le surnageant est récupéré par centrifugation à 10000 g pendant 15 min à 4°C, le culot est ensuite éliminé.

Ensuite, pour le dosage et le western blot, voir la partie in vitro.



7. Modèle in vitro : cardiomyocytes H9c2 en culture

7.1. Modèle cellulaire : caractérisation de la lignée cellulaire cardiaque H9c2

Les cellules utilisées sont des cardiomyocytes embryonnaires de rats de la lignée immortalisée H9c2 (2-1) (ATCC, n° CRL-1446, Molsheim, France). C'est une lignée cellulaire myoblastique originellement isolée de cœurs embryonnaires de rats issus de la souche BD1X (Kimes et Brandt., 1976). Les cellules H9c2 ont été choisies comme modèle de cardiomyocyte car ils présentent les caractéristiques du muscle cardiaque et ont été utilisé comme modèle pour les études d'ischémie-reperfusion (Chou et al., 2010).

Les H9c2 sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) modifié contenant 4,5 g/L de glucose + 10 % de sérum de veau foetal (SVF ; PAA Laboratories ; Les Mureaux, France) + 1 % d'un mélange d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine (concentrations finales 100 UI/mL Pénicilline et 100 µg/mL Streptomycine) (Lonza ; Verviers, Belgique); c'est le milieu de culture complet. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ et 95 % d'O₂. Le changement du milieu de culture se fait tous les 2-3 jours, les cellules sont cultivées à 70-80 % de confluence puis détachées à l'aide de trypsine/EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) (0.025%/ 1mM) (Lonza ; Verviers, Belgique) et remises en culture à raison d'un ratio 1:2 ou 1:4 dans des flacons 75 cm². Des aliquots cellulaires de 1.10⁶ cellules sont conservés dans de l'azote liquide dans un milieu complet additionné de 10% de DMSO (Diméthylsulfoxyde, Bio Basic Inc, Mundolsheim, France). Une congélation lente est réalisée à l'aide d'une boîte de congélation spécifique contenant de l'isopropanol à -80 °C pendant 24 h (descente en température de 1 °C par minute). La décongélation est quant à elle rapide et a lieu à 37 °C.

Les cellules sont ensemencées en plaques 96 puits incubées dans 200 µl de milieu de culture (pour les tests MTT, LDH et caspase) ou en plaques 6 puits incubées dans 2 mL de milieu de culture (pour les westerns blots, Hoechts et TMRM) en triplicata à raison de 35000 cellules/mL la veille ou 17500 cellules/mL deux jours avant, en fonction de la durée des traitements à effectuer ultérieurement, pour maintenir une confluence inférieure à 80 %.

7.2. Protocole expérimental

Les cellules H9c2 ont été cultivées en plaques 96 puits ou 6 puits et soumis à deux protocoles (figures 37 et 38) :

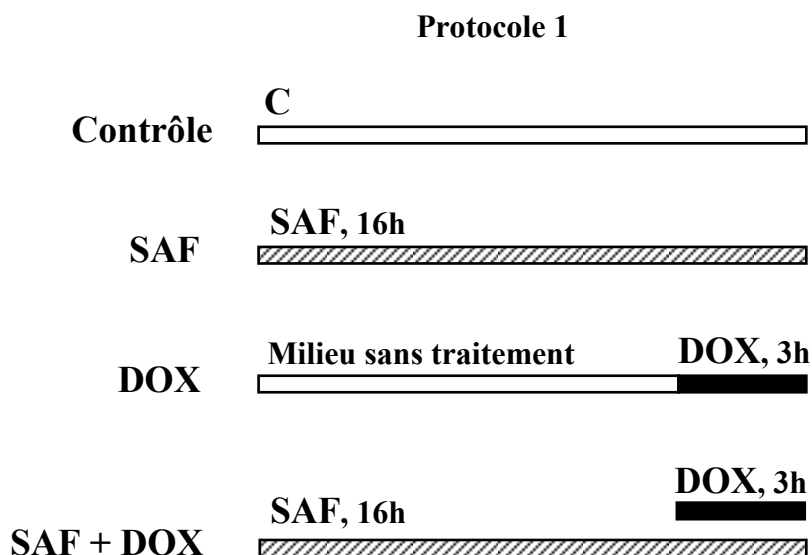


Figure 37. Effet du safran et de la doxorubicine sur les cardiomyocytes H9c2 (n=3). C: Control; SAF: Safran; DOX: Doxorubicine.

- 1- Groupe contrôle: les cellules ont été cultivées dans un milieu complet et n'ont été soumises à aucun traitement.
- 2- SAF: les cellules ont été incubées dans 0 à 100 $\mu\text{g/mL}$ de safran durant 16 h et 10 $\mu\text{g/mL}$ de safran pour 0 à 24 h. Le safran (Békaa, Liban) a été dilué dans du milieu complet, préparé fraîchement lors de son utilisation à l'abri de la lumière.
- 3- DOX: les cellules ont été incubées dans 0 à 10 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine durant 3 h et 4 $\mu\text{mol/L}$ pour 0 à 24 h. La doxorubicine (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) a été diluée dans du milieu complet.
- 4- SAF + DOX: les cellules ont été incubées dans le safran, puis la doxorubicine a été ajoutée sans changement du milieu.

Protocole 2

		Ischémie 8h	Reperfusion 16h
Normoxie	-	-	-
DOX	-	-	+ DOX, 3h
SAF + DOX	-	-	+ SAF + DOX
IR	-		
IR + DOX	-		+ DOX, 3h 
SAF + IR	+ SAF, 16h		
IR + SAF	-		+ SAF, 16h 
SAF + IR + DOX	+ SAF, 16h		+ DOX, 3h 
IR + SAF + DOX	-		+ SAF + DOX 

Figure 38. Effet de la doxorubicine sur les cardiomyocytes H9c2 soumis à l'ischémie/reperfusion en absence ou présence de safran avant l'ischémie ou à la reperfusion (n=3). SAF: Safran; I: Ischémie; R: Reperfusion; DOX: Doxorubicine.

1- Normoxie, groupe contrôle: les cellules ont été cultivées dans un milieu complet en normoxie et n'ont été soumises à aucun traitement.

2- DOX: les cellules ont été incubées dans 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine durant 3h.

3- SAF + DOX: les cellules ont été incubées dans 1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de safran durant 16 h et 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine durant 3h.

4-IR: les cellules ont été soumises à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h.

5- IR + DOX: les cellules ont été soumises à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h en présence de 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine durant 3h à la reperfusion.

6- SAF + IR: les cellules ont été incubées dans 1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de safran durant 16 h puis soumises à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h.

7- IR + SAF: les cellules ont été soumises à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h en présence de 1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de safran durant 16h à la reperfusion.

8- SAF + IR + DOX: les cellules ont été incubées dans 1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de safran durant 16h puis soumis à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h en présence de 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine durant 3 h à la reperfusion.

9- IR + SAF + DOX: les cellules ont été soumises à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h en présence concomitante de 1, 10 ou 100 $\mu\text{g/mL}$ de safran durant 16 h et 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine durant 3h à la reperfusion.

7.3. Hypoxie/réoxygénation in vitro

Afin de simuler une ischémie/reperfusion sur des cellules en culture, un modèle d'hypoxie/réoxygénation dans un système de chambre de culture anaérobie a été utilisé, qui permet de reproduire les conditions ischémiques in vitro. Le milieu de culture des cardiomyocytes a été remplacé par du milieu DMEM sans glucose et sans sérum avec 1 % Pénicilline/Streptomycine préalablement équilibré en atmosphère anaérobie. Les plaques ont été ensuite introduites dans une chambre de culture anaérobie (Bactron I Anaerobic Chamber, Shel Lab Sheldon Manufacturing, Cornelius, Oregon, Etats Unis) dont l'atmosphère est composée de 95 % de N_2 et 5 % de CO_2 (Air Liquide Santé, Heillecourt France). Le taux d' O_2 résiduel est mesuré grâce à un oxymètre Gox 100 (Greisinger Electronic, Regenstauf, Allemagne) et n'excède pas 0,5 %, soit une pO_2 inférieure à 4 mmHg. Les cardiomyocytes sont incubés pendant 8 heures dans la chambre anaérobie à 37°C. A noter que les plaques ont été préalablement déposées dans un sas intermédiaire étanche qui subit 3 cycles de dépressurisation / repressurisation avec 95 % de N_2 et 5 % de CO_2 pour ne pas contaminer l'atmosphère anaérobie de la chambre par l'oxygène présent dans l'air ambiant. Les cellules contrôle en normoxie subissent aussi le passage dans le sas pour éliminer les conséquences que peut avoir ce passage sur la mortalité des cellules H9c2. Lors de la réoxygénation, les plaques sont sortis de la chambre anaérobie, leur milieu est remplacé par du milieu complet DMEM avec 4,5 g/L glucose, 10 % sérum et 1 % Pénicilline/Streptomycine suivant le protocole expérimental en question. Les cardiomyocytes sont ensuite incubés pendant 16 heures à 37 °C sous atmosphère normoxique, contenant 95 % d' O_2 et 5 % de CO_2 .

7.4. L'étude de la viabilité cellulaire

7.4.1. Le test du MTT

La prolifération cellulaire est évaluée par un test colorimétrique: le MTT, c'est un sel de tétrazolium 3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA), de couleur jaune. En présence de cellules vivantes métaboliquement actives, le MTT est clivé par des succinate déshydrogénases de la chaîne respiratoire mitochondriale pour former des cristaux de formazan violets. Après solubilisation des cristaux avec du DMSO, le milieu passe du jaune au violet, et l'absorbance de la solution colorée obtenue est mesurée à 570 nm par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes et donne une indication sur l'activité métabolique de ces cellules (Mosmann, 1983).

Suite aux différents traitements, le milieu des cardiomyocytes a été éliminé et remplacé par 100 µl de MTT dans du milieu de culture à une concentration finale de 0.5 mg/ml. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 4 heures. Le milieu a été ensuite éliminé et les cristaux de formazan formés ont été solubilisés dans 100 µl de DMSO par agitation 5 min à température ambiante (Cao & Li, 2004). Cette coloration est mesurée par spectrométrie à 570 nm par un lecteur de plaque (Infinite Pro F200, Tecan).

7.4.2. Le dosage de la LDH

Le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH) permet d'évaluer la toxicité des composés testés sur les cardiomyocytes. La LDH est une enzyme cytosolique, l'augmentation de son activité dans le surnageant des cellules permet de détecter une altération de la perméabilité membranaire. L'activité de la LDH dans le milieu de culture est donc un marqueur de la mortalité cellulaire.

La libération du LDH dans le surnageant peut être quantifiée par deux réactions enzymatiques: D'abord, la LDH catalyse la transformation du lactate en pyruvate par la réduction de NAD^+ en NADH selon la réaction suivante : $\text{Lactate} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{Pyruvate} + \text{NADH}$

Ensuite, la diaphorase utilise le NADH pour réduire le sel de tétrazolium (INT) en formazan de couleur rouge qui peut être mesurée à 490 nm (figure 39). Par conséquent, le niveau de formation de formazan est directement proportionnel à la quantité de LDH libérée dans le milieu. De ce fait, l'absorbance du formazan reflète une augmentation de l'activité de la LDH dans le milieu de culture qui est associée à une augmentation de la mortalité cellulaire.

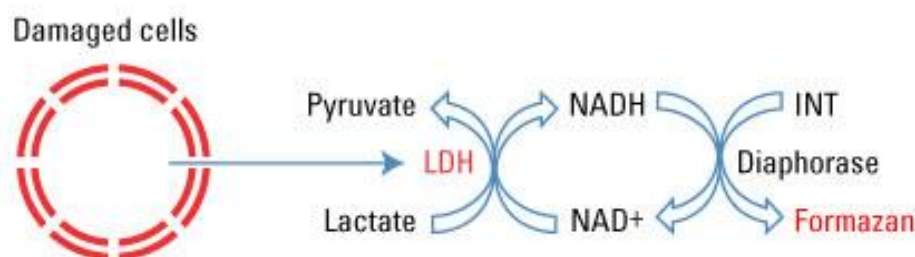


Figure 39. Mécanisme du dosage de la LDH.

Le dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase est réalisé selon la méthode décrite par le kit Pierce LDH Cytotoxicity Assay #88953 (Thermo Fischer scientifique, Rockford, IL USA). Suite aux différents traitements, 50 µl des surnageants de chaque échantillon sont prélevés et transférés à une nouvelle plaque. 50 µl de Reaction Mixture sont ajoutés et le mélange est laissé à incuber pendant 30 min à température ambiante. La réaction est arrêtée en ajoutant 50 µl de Stop Solution. L'absorbance est mesurée à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Infinite Pro F200, Tecan) pour déterminer l'activité de la LDH.

7.5. L'étude de l'expression des protéines

7.5.1. Extraction des protéines

L'extraction des protéines se déroule par l'utilisation d'un tampon d'extraction qui va rompre les membranes cellulaires. Les protéines étant fragiles et facilement dégradables, il est important d'utiliser un tampon d'extraction contenant des inhibiteurs de protéases et des inhibiteurs de phosphatases pour pouvoir détecter les protéines phosphorylées.

Suite aux différents traitements, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et de l'orthovanadate Na_3VO_4 50µM. Le tampon d'extraction dont la composition est détaillée dans le tableau (1) a

ensuite été ajouté. Les cellules sont par la suite grattées et récoltées dans des tubes Eppendorfs maintenus sur glace. Les lysats cellulaires sont soumis à des ultra-sons (fréquence = 62,5 MHz ; 3 cycles de 10 secondes de sonication puis 10 secondes de repos) puis centrifugés à 20 000 g pendant 45 minutes à 4°C pour éliminer les débris membranaires. Les surnageants obtenus ont été récupérés et la concentration en protéines de chaque échantillon a été dosée puis conservés à -20°C pour être ensuite analysés par western blot.

Tableau 1. Tampon d'extraction. Dissolution dans l'eau et ajustement du pH à 7.4. EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid, chélateur des ions métallique), MgCl₂ (tampon), β-glycerophosphate (anti-phosphatases), Na₃VO₄ (anti-phosphatases), Cocktail anti-protéases Sigma-Aldrich #P3840 (aprotinine, leupeptine, pepstatine A, bestatin, AEBSF, E-64), Triton (détergent pour perméabiliser les membranes).

Produit	Concentration
EGTA	20 mM (PM=380.4)
MgCl₂	15 mM (PM=95.21)
β-glycerophosphate	80 mM (PM=216)
Na₃VO₄	200 mM (PM=183.9)
Cocktail anti-protéases	0.01%
Triton 100 X	0.10%

7.5.2. Dosage des protéines

La quantité de protéines par échantillon a été dosée par la méthode BCA (bicinchoninic acid) colorimétrique. En effet, les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu²⁺ en Cu⁺ en milieu alcalin. Le BCA est un réactif colorigène qui forme un complexe hautement spécifique avec les ions Cu⁺ et prend une couleur violette typique ayant une absorption maximale à 560 nm (Smith et al., 1985). L'absorbance est ainsi proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon.

Un dépôt de 15 µL de chaque échantillon est effectué en triplicat sur une plaque 96 puits. La concentration protéique dans chaque échantillon est calculée à l'aide d'une gamme étalon de BSA (Bovin Serum Albumin, A8022 Sigma) réalisée par dilution en cascade de 0 à 2 mg/mL également déposée sur la plaque. Dans tous les puits sont ajoutés 200 µL de réactif (50v de réactif A pour 1v de réactif B) selon les recommandations du fournisseur (UP-40840A Uptima, Interchim). Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 30 min puis l'absorbance des échantillons

est mesurée à 560 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (Infinite Pro F200, Tecan). C'est une méthode sensible et rapide qui résiste aux détergents comme le Triton ou le SDS.

7.5.3. Western blot

Le western blot est une technique semi-quantitative permettant la détection et l'étude de l'expression d'une protéine spécifique sur une membrane. Elle se déroule en 3 étapes: électrophorèse, transfert et révélation. Les protéines sont séparées en fonction de leur taille par électrophorèse, puis elles sont transférées sur une membrane où elles sont détectées par des anticorps. La révélation est enfin réalisée par chimioluminescence. Cette technique a été utilisée pour étudier l'expression de plusieurs protéines (tableau 2).

7.5.3.1. Électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse consiste à faire migrer des protéines dans un gel, sous l'influence d'un champ électrique, permettant ainsi leur séparation. Pour séparer les protéines uniquement selon leur poids moléculaire, elles doivent être dénaturées et l'électrophorèse est donc réalisée en conditions dénaturantes en présence de SDS dans le gel d'électrophorèse appelé SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis). Le SDS est un puissant détergent possédant une extrémité chargée négativement et une longue queue hydrocarbonée hydrophobe qui se lie aux protéines et empêche leur repliement. Il se forme alors un complexe SDS-protéines chargé négativement. La quantité de SDS qui se lie est proportionnelle à la masse moléculaire des protéines mais est indépendante de leur séquence. La structure native des protéines est donc dénaturée, une charge apparente négative leur a été conférée et elles migreront donc toutes vers l'anode (+). Ainsi, seul le poids moléculaire des protéines sera le facteur de leur séparation. Les protéines ayant un petit poids moléculaire, seront moins retenues dans les pores du gel de polyacrylamide et migreront plus loin que les grosses.

Le gel de polyacrylamide est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bisacrylamide, en présence de SDS et d'agents catalyseurs rapides à la réaction de polymérisation (TEMED Tetramethylethylenediamine et APS ammonium persulfate). L'acrylamide confère au gel sa rigidité et permet la formation d'un réseau au travers duquel les complexes SDS-protéines

migrent. Ainsi, le pourcentage d'acrylamide détermine le degré de réticulation du gel. En effet, plus la concentration en acrylamide est élevée, plus les pores seront petits et plus les molécules seront freinées dans le gel à faveur d'une migration des petites protéines. A l'inverse, plus le pourcentage est faible, plus le maillage est lâche en faveur d'une séparation des grosses protéines. Un gel de séparation à 10 % permet une séparation des protéines entre 25 et 250 kDa. Les protéines passent d'abord dans un gel de concentration constituant la phase supérieure, utilisé à 5%, qui permet de concentrer les protéines à l'interface entre les 2 gels. Puis la séparation selon leur masse moléculaire se fait au travers d'un gel de séparation constituant la phase inférieure, dont le maillage dépend de la taille de la protéine à révéler (tableau 2). Pour réaliser le western blot, le système Mini-PROTEAN Tetra cell de BioRad a été utilisé.

Des quantités égales de protéines de chaque échantillon sont préparés pour être déposés dans le gel de concentration (entre 25 et 50 µg de protéines). Aux échantillons a été ajouté du tampon échantillon composé notamment de SDS et saccharose pour alourdir les échantillons et faciliter leur dépôt sur gel, de bleu de bromophénol pour suivre visuellement la migration et du β -mercaptoéthanol, agent dénaturant qui réduit les pont disulfures des protéines (tableau 3). Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes pour la dénaturation des protéines. Le système contenant le gel de polyacrylamide est introduit dans la cuve à électrophorèse. Les puits délimités par le peigne sont lavés et les échantillons ainsi qu'un standard coloré de masses moléculaires connues sont déposés dans les puits. La cuve est alors remplie de tampon de migration (tableau 3). Après dépôt des échantillons, la migration est effectuée à 100 Volts (V) pendant 2h, jusqu'à la sortie du front de migration à l'extrémité inférieure du gel.

7.5.3.2. Transfert

Afin de détecter les protéines par les anticorps, elles sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose. La membrane est placée face au gel, entre deux couches de papier absorbant Whatman et deux éponges. Un courant électrique est appliqué aux plaques de façon à ce que les protéines du gel chargées négativement migrent vers la borne positive sur la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Il résulte de ce transfert que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures (Burnette WN., 1981). La fixation des protéines à la membrane se fait grâce à des interactions

hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines. Le transfert se fait pendant 1h30 à 70V et à 4°C dans un tampon de transfert (tableau 3).

7.5.3.3. Révélation

Après transfert, les sites non spécifiques de la membrane sont saturés par de la BSA 2% soit par du lait 5% -TBS/Tween 0.1% pour limiter une fixation non spécifique des anticorps. La saturation est réalisée pendant 1h, sous agitation à température ambiante, ensuite effectuer 2 lavages de 5 min dans du TBS/Tween 0.1%.

Après saturation de la membrane, les protéines ont été hybridées avec l'anticorps primaire approprié dirigée contre la protéine d'intérêt. L'anticorps primaire utilisé reconnaît la protéine spécifique à détecter et doit être dirigé contre l'espèce d'où est extraite la protéine en question, et préparée dans une espèce différente. L'anticorps primaire est dilué dans la BSA 2% soit dans le lait 5% -TBS/Tween 0.1% et incubé avec la membrane sur la nuit entière, sous agitation à 4°C (tableau 3). La solution d'anticorps et la membrane peuvent être scellées dans un sachet en plastique et incubées ensemble. Ensuite, effectuer 5 lavages de 5 minutes dans du TBS/Tween 0.1% pour éliminer l'excès d'anticorps non fixé (favorisé par le tween qui est un détergent doux).

Les membranes sont par suite incubées avec l'anticorps secondaire dirigé contre une portion espèce-spécifique de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est dilué dans la BSA 2% soit dans le lait 5% -TBS/Tween 0.1% et incubé avec la membrane pendant 1 h, à l'obscurité, sous agitation à température ambiante. Puis effectuer 5 rinçages de 5 minutes sous agitation par du TBS/Tween 0.1%.

L'anticorps secondaire est couplé à une peroxydase, la HRP (HorseRadish Peroxidase). La présence de la protéine d'intérêt peut être détectée par chimioluminescence par l'ajout d'un réactif de révélation ECL (Enhanced Chemiluminescence kit, ECL plus reagents system, GE Healthcare, Amersham Biosciences, Saclay, France) qui permet la formation enzymatique d'un ester d'acridinium. Ce dernier est dégradé en un composé excité libérant son énergie sous forme lumineuse lors de sa désexcitation à une longueur d'onde maximale de 430 nm et pouvant être visualisé sur un film photosensible ou détecté par une caméra CCD. La quantité de lumière émise

est donc directement proportionnelle à la quantité d'anticorps fixé et donc de protéines reconnues. La membrane est incubée pendant 5 min avec le réactif ECL à raison de 0,1 mL/cm² de membrane puis elle est rapidement séchée afin d'éliminer l'excès de réactif de détection.

L'acquisition des résultats est ensuite réalisée grâce au système Odyssey FC Imaging System 2800 (Li-cor Science Tec, USA) qui détecte la chimioluminescence. L'image ainsi enregistrée peut ensuite être analysée à l'aide du logiciel Image J (NIH, USA) qui permet de quantifier la densité des bandes d'expressions protéiques et ainsi permettre une comparaison semi-quantitative entre les échantillons. Une analyse statistique est réalisée en utilisant le test t de Student. Les différences sont considérées comme significatives pour $p < 0.05$.

Une approximation sur la taille des protéines étudiées est réalisée en comparant les bandes marquées à celles des marqueurs de masse moléculaire de la gamme étalon Benchmark Prestain Protein Ladder (Invitrogen) chargé durant l'électrophorèse. Pour chaque protéine analysée, il est indispensable de vérifier la quantité des dépôts, par la révélation de protéines de structure comme la β -actine ou la tubuline, dont la concentration ne devrait pas varier entre les échantillons. De ce fait, la quantification de ce contrôle interne permet de normaliser la quantification de la protéine d'intérêt. Les résultats obtenus correspondent à l'expression de la protéine d'intérêt en unités arbitraires.

Afin d'être comparatif, la révélation de la forme phosphorylée et de la forme non phosphorylée d'une protéine doit se faire sur une même membrane. Les anticorps sont déshybridés de la membrane afin d'effectuer un nouveau cycle d'hybridation avec d'autres anticorps. La membrane est immergée dans du NaOH 0.2M pendant 5 min, ensuite faire 2 lavages de 10 min à l'eau distillée, puis 1 lavage de 10 min au TBS. La membrane subit alors une nouvelle saturation au BSA ou lait, puis est hybridée par les anticorps voulus par la même méthode décrite précédemment.

Tableau 2. Anticorps utilisés en western blot. Les anticorps sont générés par inoculation à l'animal, ils sont utilisés comme outils de détection possédant à la fois une bonne sensibilité et une bonne spécificité, se liant directement à la protéine d'intérêt. La spécificité et le facteur de dilution pour lesquels la détection sera la plus fiable doivent être vérifiés pour chaque anticorps.

Anticorps primaire	Fournisseur	Dilution	Anticorps secondaire
Anti-AKT polyclonal (60 kDa)	Cell Signaling Technology #9272	1:1000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti-AKT /phospho Ser473 polyclonal (60 kDa)	Cell Signaling Technology #9271	1:1000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti-MAP kinase p44/42 (ERK1/2) polyclonal (44/42 kDa)	Cell Signaling Technology #9102	1:1000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti-MAP kinase p44/42/(ERK1/2) /phospho Thr202/Tyr204 monoclonal (44/42 kDa)	Cell Signaling Technology #9106	1:2000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight.	Anti-souris, 1:5000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti-P70S6K monoclonal (70 kDa)	Cell Signaling Technology #2708	1:1000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti-P70S6K /phospho Thr389 monoclonal (70 kDa)	Cell Signaling Technology #9205	1:1000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti-α Actinine monoclonal (103 kDa)	Abcam #18061	1:1000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-souris, 1:5000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti-Troponin C polyclonal (18 kDa) (cTnC)	Abcam #30807	1:1000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-chèvre, 1:5000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti- MLC (Myosin light chain) monoclonal (20 kDa)	Cell Signaling Technology #12975	1:1000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti- Troponin T (cTnT) monoclonal (36 kDa)	Abcam #10240	1:1000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-souris, 1:5000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti- mTOR polyclonal (289 kDa)	Cell Signaling Technology #2972	1:1000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-souris, 1:5000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti- mTOR /phospho Ser2448 polyclonal (289 kDa)	Cell Signaling Technology #2971	1:1000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-souris, 1:5000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure

Anti- 4EBP1 polyclonal (20 kDa)	Santa Cruz Biotechnology #6936	1:1000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti- 4EBP1 /phospho Ser 65/Thr 70 polyclonal (20 kDa)	Santa Cruz Biotechnology #12884	1:1000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-chèvre, 1:5000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti- P38 MAPK monoclonal (43 kDa)	Cell Signaling Technology #9212	1:1000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti- P38 MAPK /phospho Thr180/Tyr182 monoclonal (43 kDa)	Cell Signaling Technology #9215	1:1000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% overnight	Anti-lapin, 1:10000 BSA 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure
Anti-β Actine monoclonal (42 kDa)	Sigma-Aldrich # A3853	1:3000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% overnight.	Anti-souris, 1:5000 lait 5% -TBS/Tween 0,1% 1 heure

Tableau 3. Composition des gels et tampons pour le western blot.

Gel de séparation 10%	1 gel	Gel de concentration 5%	1 gel
H ₂ O	4.02 ml	H ₂ O	2.84 ml
Acrylamide/BisAcrylamide 30%	3.33 ml	Acrylamide/BisAcrylamide 30%	0.83 ml
Tris 1.5M pH 8.8	2.5 ml	Tris 1M pH 6.8	1.25 ml
SDS 10%	100 µl	SDS 10%	50 µl
APS 25%	50 µl	APS 25%	25 µl
TEMED	5 µl	TEMED	2.5 µl

Tampon Echantillon 5X		Tampon TBS (Tris buffered saline)	
Tris/HCl 0.5M pH 6.8	0.909 g	Tris/HCl 50mM pH 7.4	
Bleu de Bromophenol 0.5%	0.075 g	NaCl 150mM	
SDS 10%	1.5 g		
Saccharose 20%	3 g		
β-mercaptoéthanol 25%	3.75 ml		
H ₂ O	15 ml		

Tampon de migration		Tampon de transfert	
Tris-HCL 25 mM		Tris-HCL 25 mM	
Glycine 192 mM		Glycine 192 mM	
SDS 0.1%		Méthanol 20%	

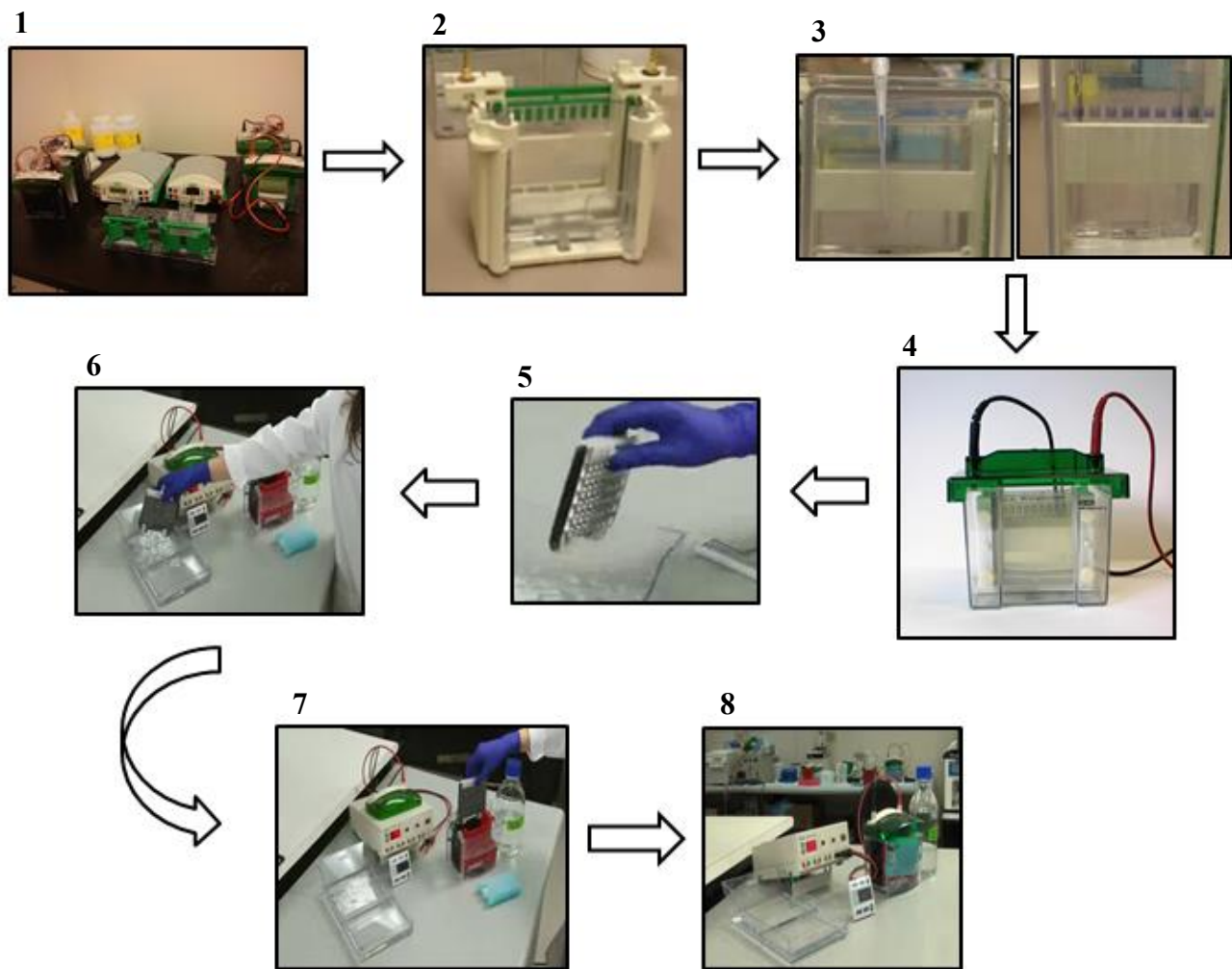


Figure 40. La technique de Western Blot. 1. Dispositif expérimental. 2. Préparation des gels de polyacrylamide (gel de concentration et gel de séparation). 3. Dépôt des échantillons ainsi qu'un standard coloré de masses moléculaires connues dans les puits délimités par le peigne. 4. Cuve remplie de tampon de migration, la migration des échantillons est effectuée à 100 Volts pendant 2h. 5, 6. Membrane placée face au gel, entre deux couches de papier absorbant Whatman et deux éponges. 7, 8. Transfert sur membrane : un courant électrique est appliqué aux plaques pendant 1h30 à 70Volts et à 4°C dans un tampon de transfert.

7.6. Techniques de détection de la mort cellulaire

7.6.1. Marquage au Hoechst 33342

L'étude morphologique de l'apoptose et la condensation de la chromatine sont mis en évidence à l'aide du marqueur Hoechst 33342. Il s'agit d'un colorant fluorescent, perméable aux cellules, qui marque les noyaux en se liant aux bases adénine-thymine de l'ADN bicaténaire et émet une fluorescence bleue (excitation par UV 350 nm - émission bleue 460 nm). Il est facilement capté par toutes les cellules lors de l'apoptose. Les noyaux des cellules saines sont colorés en bleu ; les noyaux condensés des cellules en apoptose sont colorés d'un blanc intense lumineux du fait de l'augmentation de l'intensité de fluorescence émise induite par la condensation de la chromatine (Reynolds et al., 1996).

Suite aux différents traitements des cardiomyocytes en culture, le Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) est ajouté à la concentration finale de 10 μ M dilué dans du PBS et incubé pendant 30 min à 37 °C, à l'abri de la lumière. Ensuite, le milieu a été retiré, les cellules lavés puis resuspendus dans du PBS. Les cellules marquées sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence après excitation dans l'UV (350 nm) (ZeissAxioskop 2 plus). Les cellules sont considérées comme apoptotiques si elles présentent les caractéristiques morphologiques suivantes: un contour irrégulier, une condensation nucléaire, une condensation du cytoplasme, et la présence de corps apoptotiques (Kerr et al., 1994).

7.6.2. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

La membrane interne de la mitochondrie est imperméable aux ions, notamment les protons. Ceci permet l'établissement par la chaîne respiratoire d'un gradient de protons qui sera utilisé par la chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP. Ce déséquilibre de charge est à l'origine du potentiel membranaire mitochondrial $\Delta\Psi_m$ dont le maintien est vital pour la cellule. Ainsi, les échanges entre la matrice et l'extérieur sont contrôlés par des pores très sélectifs appelés mPTP (Mitochondrial Permeability Transition Pore).

Le potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\Psi_m$ est un paramètre important de la fonction mitochondriale et il est impliqué dans la mort cellulaire. La perte du $\Delta\Psi_m$ est associée à

l'ouverture des pores mPTP qui provoquent la sortie du cytochrome c dans le cytosol et déclenche la cascade apoptotique (Baines, 2010).

Il s'agit de mesurer l'ouverture du mPTP en analysant le potentiel de membrane grâce à l'utilisation du TMRM par microscopie à fluorescence (Ehrenberg et al., 1988). Le TMRM (Tétra Méthyl Rhodamine Méthyl Ester) est une sonde fluorescente, cationique, non toxique et lipophile diffusant librement au travers des membranes (excitation 565 nm - émissions 645 nm, fluorescence rouge-orangée). Compte tenu de sa charge positive, le TMRM s'accumule fortement au sein des mitochondries et permet ainsi le marquage des mitochondries polarisées dans les cellules saines. En cas de dépolarisation mitochondriale, dans les cellules apoptotiques, il y a ouverture des mPTP et perte du potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$, le TMRM diffuse alors hors des mitochondries et se distribue dans le cytosol ; on assiste donc à une diminution de l'intensité de fluorescence des mitochondries. C'est une sonde dont l'accumulation mitochondriale est proportionnelle au potentiel de membrane. L'intensité de fluorescence du TMRM est directement proportionnelle à sa concentration (Baines, 2010).

Suite aux différents traitements, la mesure du potentiel de membrane mitochondrial a été effectuée par incubation des cardiomyocytes, en présence de 100 nM de TMRM (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) dans du milieu complet, pendant 30 min à l'obscurité. Ensuite, le milieu a été retiré, les cellules lavées puis resuspendues dans du PBS. L'acquisition des images en temps réel est réalisée au microscope à fluorescence (ZeissAxioskop 2 plus). L'excitation du laser est de 565 nm pour le TMRM. Ces conditions sont constantes pendant toute l'expérience.

7.6.3. Double marquage Hoechst et TMRM

Les changements morphologiques cellulaires et mitochondriaux des H9c2 ont été visualisés par un double marquage des cardiomyocytes au Hoechst 33342 et TMRM (Sardão et al., 2007). Suite aux différents traitements, les cellules ont été incubées avec 10 μ M Hoechst et 100 nM TMRM pendant 30 min à 37 °C à l'obscurité. Ensuite, le milieu a été retiré et les cellules lavées puis resuspendues dans du PBS. La visualisation des images se fait au microscope à fluorescence

(ZeissAxioskop 2 plus). Puis la superposition des images (merge) se fait à l'aide du logiciel Image J (NIH, USA).

7.6.4. Détermination de l'activité des caspases

Les caspases (cysteinyll-dependent aspartate specific proteases) sont les principales protéines exécutrices du processus apoptotique. Elles appartiennent à un groupe particulier d'enzymes présentes à l'intérieur de la cellule sous forme inactive: ce sont les cystéines protéases. Elles clivent leurs substrats après un résidu aspartate et possèdent une cystéine au sein de leur site catalytique. En effet, à la suite de l'induction de l'apoptose, ces enzymes subissent un clivage après un résidu d'acide aspartique, ce qui a pour conséquence de les activer. Sous sa forme active, la caspase est composée de deux grandes sous unités et de deux petites sous-unités. À la suite d'un stimulus apoptotique, il se produit une cascade d'activation où, les caspases initiatrices clivent des procaspases, qui deviennent des caspases effectrices. Les caspases 2, 8, 9 et 10 sont initiatrices et les caspases 3, 6 et 7 sont effectrices (Whelan et al., 2010).

L'activité des caspases 3 a été mesurée grâce à la fluorescence émise par un fluorochrome qui est libéré suite au clivage de leur substrat: FAM-DEVD-fmk. L'intensité de cette fluorescence est proportionnelle à l'activité des caspases 3. La fluorescence mesurée traduit la libération du fluorochrome suite au clivage du substrat par la caspase correspondante. Le DEVD est un inhibiteur sélectif des caspases 3 non toxique pour les études in vitro. Il s'agit d'un tétrapeptide qui possède le motif correspondant à la séquence de coupure par les caspases. Ces inhibiteurs peuvent alors se fixer sur le site catalytique des caspases et les inactiver. Ils forment des ponts disulfures avec la cystéine du site actif des caspases et les inhibent d'une façon irréversible. Ces inhibiteurs permettent de confirmer l'implication des caspases dans le processus apoptotique (Nicholson, 1996).

La détection des caspases 3 activées a été réalisée selon la méthode décrite par le kit FAM FLICA, Caspase 3 & 7 Assay Kit, Immunochemistry technologies, USA. Suite aux différents traitements, les cellules apoptotiques en suspension sont combinées avec les cellules adhérentes qui doivent être lavées et trypsinisées délicatement pour éviter leur perte. Après centrifugation à 200 g pendant 5 minutes, les cellules ont été resuspendu dans 300 µL de milieu par tube. Puis,

10 µL de FLICA (dilué au 1:30) ont été ajoutés pour le marquage des cellules. L'incubation a été effectuée 60 minutes à 37 °C, en mélangeant doucement toutes les 10 min à l'abri de la lumière. Ensuite, ajouter 2 mL de wash buffer dans chaque tube, mélanger et centrifuger à 200 g pendant 5 minutes pour permettre à tout FLICA non lié de se diffuser hors des cellules. Enlever le surnageant et resuspendre dans du PBS. 100 µL de chaque échantillon à tester ont été transférés dans une plaque 96 puits noir à fond plat en triplicata. La libération des fluorochromes a été mesurée à l'aide d'un spectromètre à fluorescence (Infinite Pro F200, Tecan) avec une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et une longueur d'onde d'émission de 525 nm. Les activités des enzymes ont été représentées par les pourcentages relatifs de fluorescence qui ont été normalisées par rapport au contrôle.

8. Etude statistique

Les résultats sont exprimés sous forme moyenne $\pm$ écart-type. Les études statistiques ont été effectuées pour évaluer les effets des différentes conditions expérimentales et leurs interactions par une analyse de variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs selon l'étude. En cas d'interaction entre différents facteurs, l'analyse de variance a été suivie par des tests post-hoc (tests de Duncan ou de Bonferroni) réalisés afin d'identifier les différences significatives. Pour la comparaison de 2 moyennes, des tests t de Student ont été réalisés. Ces résultats sont considérés comme statistiquement significatifs si la valeur p est inférieure à 0.05 (*p<0.05).



II- Résultats

1. Analyses chimiques du safran

1.1. Analyse par HPLC

À partir de quatre extractions méthanol- eau effectuées, le rendement obtenu a varié entre 40 et 42 %. La figure 41 montre le chromatogramme type d'un échantillon de safran libanais analysé par HPLC afin de quantifier en terme d'unité d'absorbance (AU) les deux principaux composés : le safranal et la crocine avec ses différents isoformes.

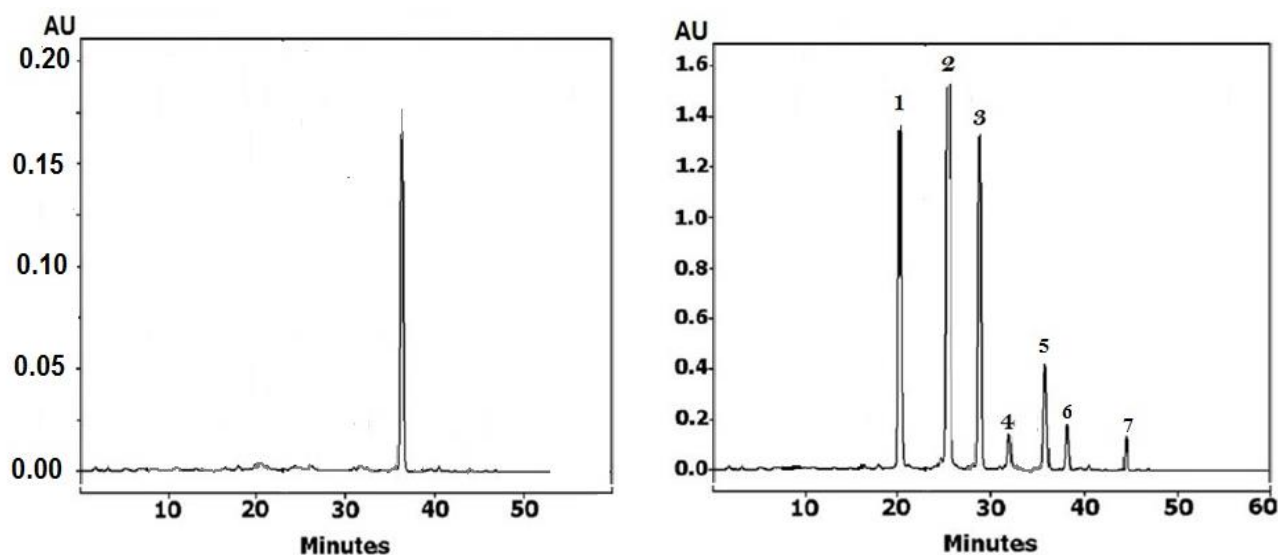


Figure 41. Chromatogrammes par HPLC représentatifs des échantillons de safran libanais, enregistrés à deux longueurs d'onde : le safranal à 310 nm et les crocines à 440 nm. La phase mobile consistait en un gradient linéaire de méthanol (10-100 %) dans l'eau (15 % d'acétonitrile) avec un débit de 1.0 mL/min et le volume d'injection était de 20 μ L ont été utilisés pour les déterminations quantitatives.

A gauche, le pic de safranal (correspondant à 1.22 mg/g de stigmates de safran)

A droite, étalon interne 2-nitroaniline (pic 1); trans-crocine 4 (pic 2, 36.75 mg/g); trans-crocine 3 (pic 3, 29,33 mg/g); trans-crocine 2 (pic 4, 2.45 mg/g); cis-crocine 4 (pic 5, 6.75 mg/g); trans-crocine 2' (pic 6, 1.88 mg/g.); cis-crocine 2 (pic 7, 1.12 mg/g).

1.2. Dosage des polyphénols

0,2489 est l'absorbance des polyphénols du safran (à 725 nm) et sa concentration correspondante est de 16 ± 1.8 mg GAE/L (GAE: équivalent acide gallique) à partir de 4 échantillons.

2. Recherche in vitro du pouvoir antioxydant du safran, safranal et crocine

2.1. Effet sur le radical superoxyde

Dans le système enzymatique xanthine-xanthine oxydase (XXO) qui génère le radical superoxyde, la superoxyde dismutase (SOD), à la concentration optimale de 100 U/mL, provoque une forte diminution de l'absorbance comparativement au témoin. Par contre, la déféroxamine (DFX) un chélateur de fer, à la concentration optimale de 100 μ M, a un effet minime (figure 42). Le safran, utilisé à des concentrations allant de 10 à 30 μ g/mL, provoque dans ce système, un effet inhibiteur dose-dépendant pouvant atteindre 80 % à la 10^{ème} minute par rapport au témoin (figure 43). Dans la figure 44 A et B, sont représentés respectivement les effets de la crocine et du safranal. Ainsi, la crocine possède un effet assez remarquable, ce qui n'est pas le cas du safranal.

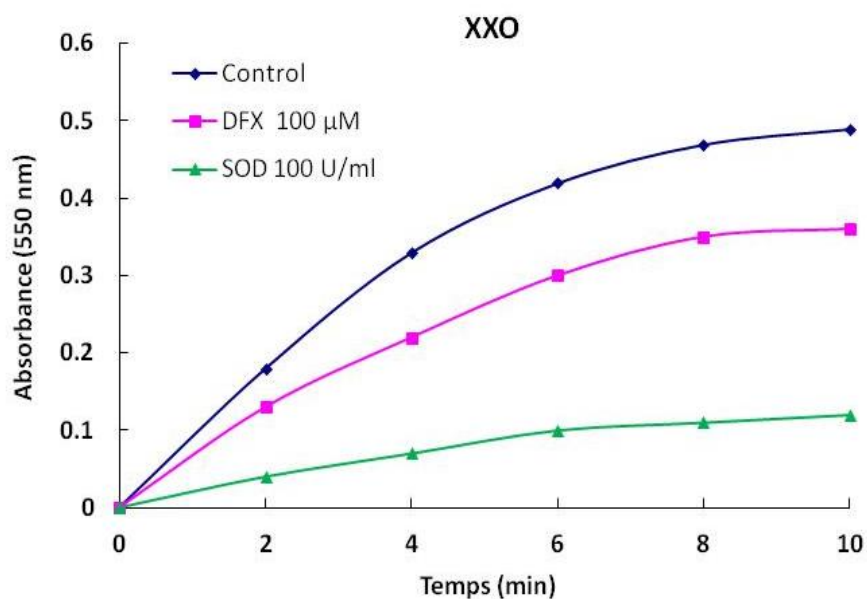


Figure 42. Effet inhibiteur de la superoxyde dismutase SOD et de la déféroxamine DFX, contre le radical superoxyde généré par le système enzymatique Xanthine-Xanthine Oxydase XXO (n=3).

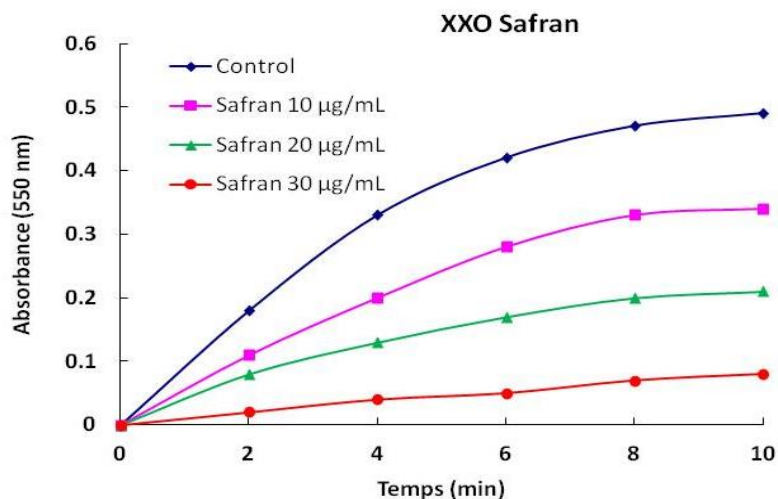
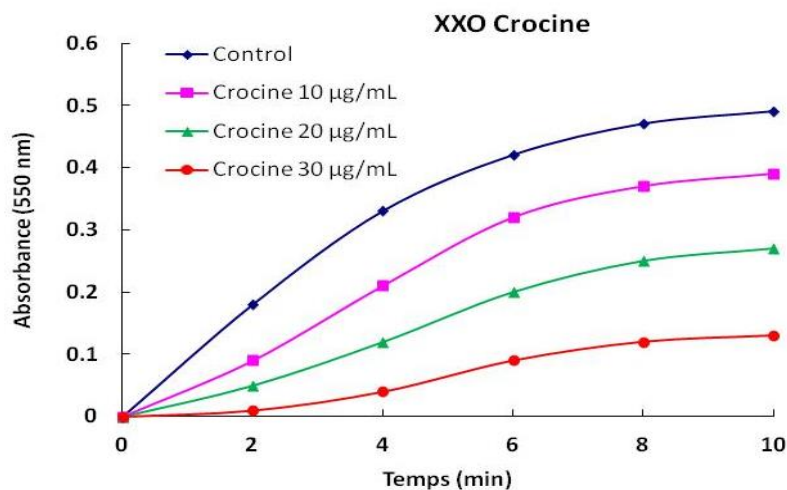


Figure 43. Effet inhibiteur du safran (10 à 30 µg/mL), contre le radical superoxyde généré par le système enzymatique Xantine-Xantine Oxydase XXO (n=3).

A



B

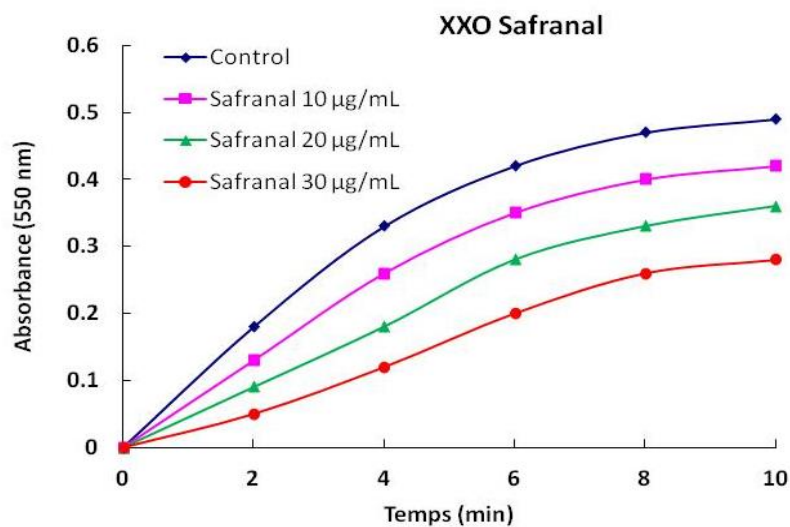


Figure 44. Effet de la crocine (A) et du safranal (B) contre le radical superoxyde généré par le système enzymatique XXO (n=3).

2.2. Effet sur les radicaux générés par électrolyse

Dans le système de l'électrolyse qui génère une cascade de radicaux libres; la DFX, à la concentration optimale de 100 μM , provoque une forte diminution de l'absorbance comparativement au témoin. Alors que la SOD, à la concentration optimale de 100 U/mL, exerce un effet minime (figure 45). Le safran, utilisé à des concentrations allant de 25 à 100 $\mu\text{g/mL}$, provoque dans ce même système, un effet inhibiteur dose-dépendant pouvant atteindre 75 % à la 4^{ème} minute par rapport au témoin (figure 46). Dans la figure 47 A et B, sont représentés respectivement les effets de la crocine et du safranal qui possèdent le même profil d'inhibition que dans le système XXO; la crocine possède un effet plus marqué que le safranal.

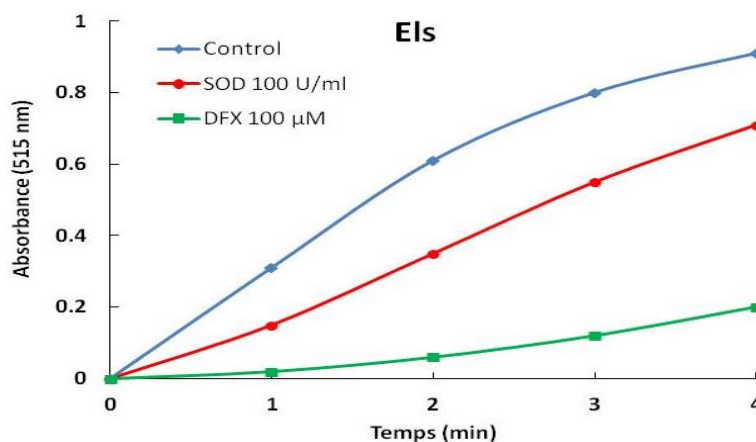


Figure 45. Effet inhibiteur de la superoxyde dismutase SOD et de la déféroxamine DFX, contre les radicaux libres générés par électrolyse (n=3).

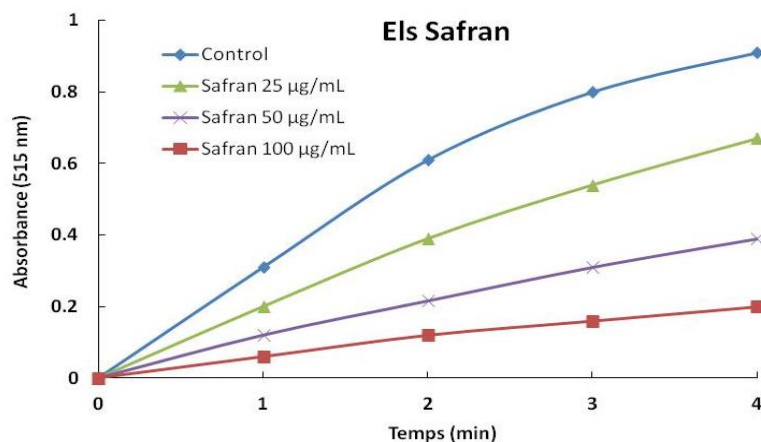
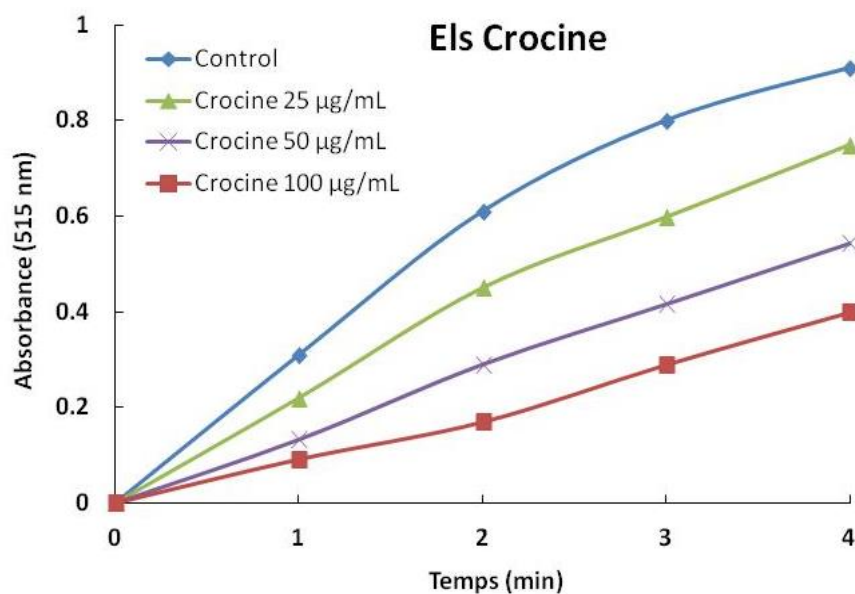


Figure 46. Effet inhibiteur du safran (25 à 100 $\mu\text{g/mL}$), contre les radicaux libres générés par électrolyse (n=3).

A



B

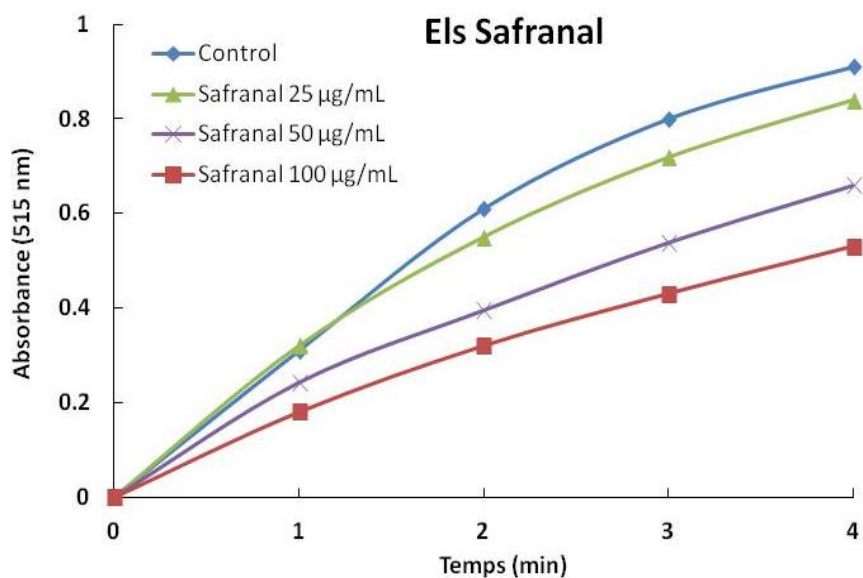


Figure 47. Effet de la crocine (A) et du safranal (B) contre les radicaux libres générés par électrolyse (n=3).

Il est à noter que nous avons procédé au début de cette étude dans le système d'électrolyse à une comparaison entre la même concentration d'extraits aqueux, méthanoliques, ainsi que d'une solution de safran bouilli, afin d'évaluer le pouvoir piègeur de chaque solution. Il s'avère que c'est la solution méthanol-eau qui possède le pouvoir le plus important de piéger les radicaux libres (figure 48).

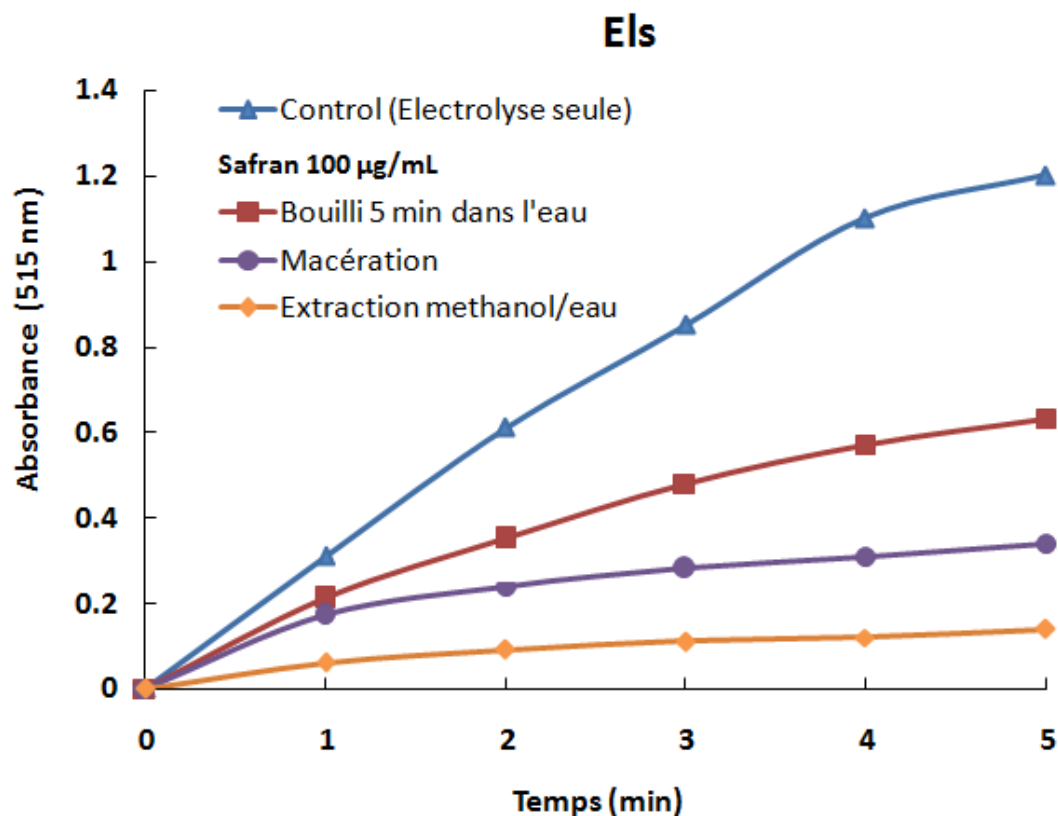


Figure 48. Effet de 1mL de différents types d'extraction de safran dans le système d'électrolyse (n=3).

2.3. Discussion

En premier lieu, il est capital de noter que les extraits des stigmates des fleurs de safran qui ont servi pour tous les protocoles de notre étude ne sont pas adultérés, ils proviennent de la même safranière dans la plaine de la Bekaa. Parce que le séchage des stigmates est une étape très délicate, toutes les mesures ont été prises pour assurer une bonne déshydratation afin d'empêcher le développement des moisissures ce qui va se répercuter sur sa qualité et par conséquent sur ses propriétés biologiques.

Le safran doit perdre environ le 4/5 de son poids et le taux d'humidité restante doit être au maximum 10 % selon la norme internationale ISO. Les stigmates après séchage doivent être au toucher ni trop secs, ni trop mous et la couleur rouge foncée uniforme. Etant très hygroscopique, le safran est conservé après séchage dans un endroit sec et à l'abri de l'air.

Les extractions méthanol-eau ont été retenues pour tous les protocoles de notre thèse, quoique plusieurs extractions aient été réalisées à partir des stigmates séchées. En effet, à travers notre

recherche bibliographique nous avons remarqué que la plupart des études sur le safran sont réalisées sur les extraits méthanoliques ce qui facilite la comparaison avec autrui. Par ailleurs, nos rendements sont proches de ceux trouvés dans la littérature, à savoir entre 40 et 42 %. La lyophilisation nous a permis une bonne conservation des extraits et de préparer à chaque séance d'expérimentation une solution fraîche et de concentration exacte.

Il était important de quantifier les composants actifs du safran, en l'occurrence le safranal et les crocines ; en effet ce sont ces derniers qui jouent le rôle prépondérant dans l'activité antioxydante du safran. De la famille C20 caroténoïdes estérifiées, il existe 6 types de crocines, le composé majeur étant la crocine 4 ou alpha crocine (Tarantilis et al., 1995; Pfister et al., 1996). Les analyses par HPLC que nous avons réalisées sur nos extraits ont étayé ce que ces auteurs ont trouvé (tableau 4). Par ailleurs, le dosage des polyphénols dans nos échantillons a révélé aussi des valeurs, non seulement dans la moyenne des concentrations trouvées dans différents safrans, mais nos extraits peuvent être classés, selon les normes internationales ISO, parmi le haut de gamme des safrans du monde.

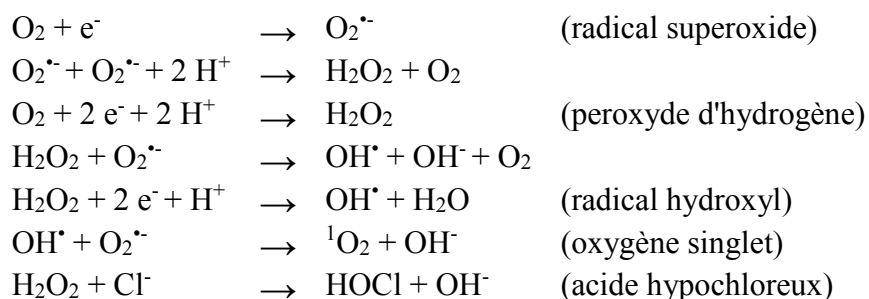
Tableau 4. Comparaison entre les constituants actifs du safran libanais avec quatre autres safrans réalisée par HPLC. Valeurs exprimées en mg/g de stigmates.

	Liban (Bekaa)	Grèce	Inde	Iran	Chine
Safranal	1.22 ±0.042	1.24 ±0.037	1.25 ±0.053	0.65 ±0.001	0.22 ±0.001
Trans crocin4	36.75 ±0.457	37.54 ±0.636	40.77 ±0.568	38.41 ±0.428	6.29 ±0.024
Trans crocin3	29.33 ±0.363	22.16 ±0.251	30.36 ±0.213	23.58 ±0.196	2.44 ±0.002
Trans crocin2	2.45 ±0.021	2.61 ±0.001	2.84 ±0.022	1.33 ±0.034	-
Trans crocin2'	1.88 ±0.051	1.01 ±0.084	2.16 ±0.015	1.15 ±0.012	-
cis crocin4	6.75 ±0.062	9.10 ±0.021	10.14 ±0.091	4.73 ±0.016	0.31 ±0.001
cis crocin2	1.12 ±0.012	3.29 ±0.023	0.23 ±0.002	0.12 ±0.003	-

Avant d'utiliser les extraits de safran dans un modèle animal, nous avons voulu rechercher le pouvoir antioxydant dans deux systèmes qui génèrent des radicaux libres in vitro de manière différente.

Le premier système XXO auquel on a eu recours est de nature enzymatique et produit spécifiquement le radical superoxyde in vitro. Ce radical est un précurseur des autres espèces réactives de l'oxygène impliquées dans les dommages cellulaires et tissulaires et joue un rôle important dans les lésions post-ischémiques (Lee et al., 2009).

Le système d'électrolyse que nous avons utilisé ensuite produit une cascade de RLO dans la solution physiologique de la façon suivante:



Le système d'électrolyse pourrait paraître à prime à bord loin des conditions de génération des RLO par l'organisme, cependant c'est un modèle fiable et reproductible qui produit une quantité d'espèces réactives de l'oxygène équivalentes à celles produites lors des états de stress oxydatif intense tel que démontré par résonance paramagnétique électronique (Lecours et al., 1998).

Les extraits de safran ainsi que ses deux principaux constituants, crocine et safranal ont été évalués par le biais de ces deux systèmes afin de déterminer leur pouvoir piègeur de RLO. Nous avons utilisé la SOD et la DFX comme produits de référence. En effet, la SOD permet d'accélérer la réaction de dismutation du radical superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$ qui est toxique en O_2 et H_2O_2 . Ce dernier peut réagir avec le radical $\cdot\text{O}_2$ pour donner le radical $\cdot\text{OH}$ hydroxyle hautement réactif qui peut être à l'origine de l'oxydation des constituants cellulaires. Cette réaction de Haber-Weiss est catalysée par des ions fer et cuivre. La DFX est un chélateur puissant de fer et empêche donc la formation de $\cdot\text{OH}$. Dans le système d'électrolyse, il semblerait que la demi-vie du radical superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$ est extrêmement brève et se transforme fougusement en $\cdot\text{OH}$ via la réaction de Habber-Weiss de ce fait la déféroxamine possède un effet inhibiteur puissant et non la SOD.

Dans les conditions expérimentales que nous avons sélectionnées, l'extrait méthanol-eau possède un pouvoir de piéger les RLO d'une manière plus efficace par rapport aux extraits aqueux. Par ailleurs, la crocine semble être le constituant le plus efficace en terme de pouvoir AO. Dans ce contexte, Mehri et al., 2012, rapportent un effet AO très puissant de la crocine, étant un caroténoïde, sur les cellules neuronales. Le safran et la crocine ayant un effet "piégeur" plus marqué dans le système d'électrolyse que celui de XXO agirait préférentiellement en aval du radical superoxyde, plus spécifiquement au niveau de la réaction de Habber-Weiss. Nous avons ainsi adopté l'extrait méthanol-eau pour la suite des expériences.

3. Effet des extraits de safran sur le cœur isolé de lapin

3.1. Détermination de la dose non toxique de safran

Trois solutions de concentrations différentes de safran (0.01, 0.1 et 1 mg/mL), diluées dans la solution de tyrode à partir d'une solution mère fraîchement préparée de l'extrait méthanolique de safran lyophilisé, ont été testées afin d'évaluer leur effet direct sur l'activité du cœur isolé. La solution de safran a été filtrée puis perfusée dans la circulation coronaire via la canule aortique utilisant une seringue placée sur un perfuseur à débit réglable à la vitesse de 0.1 ml/min.

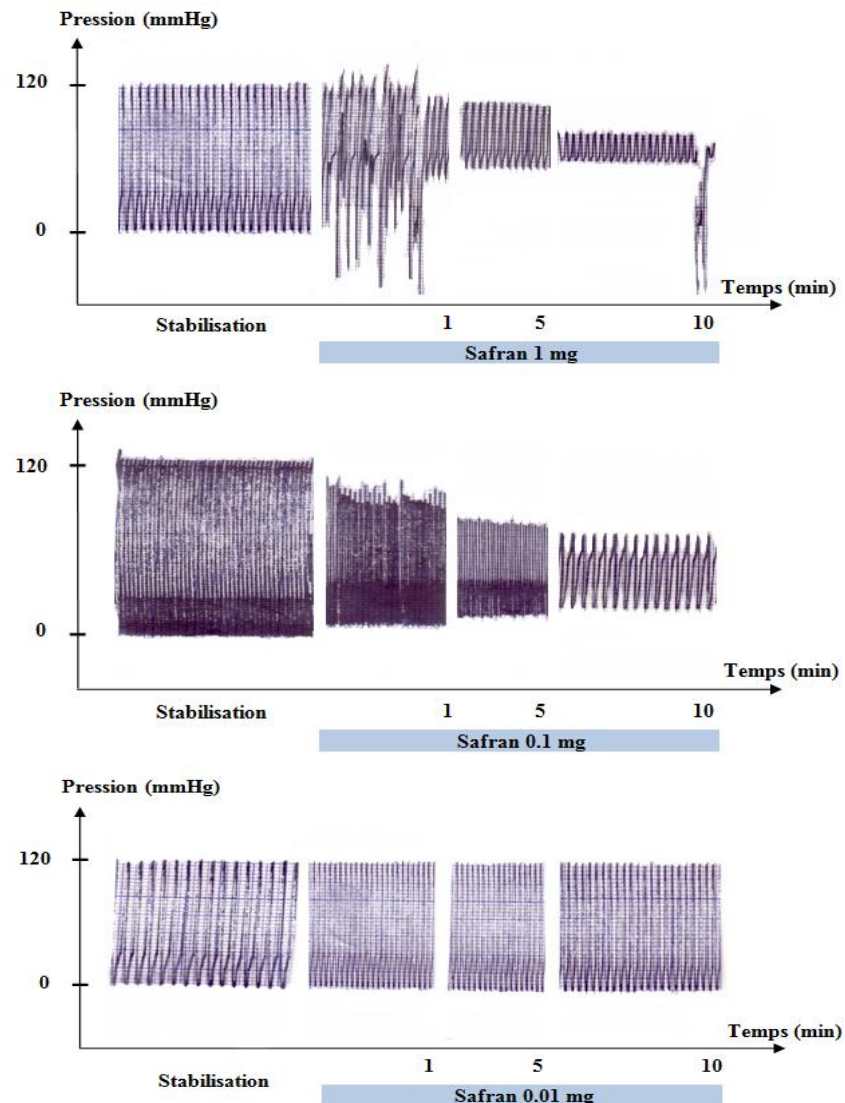


Figure 49. Tracés représentant l'effet dose-dépendant de la perfusion de safran dans la circulation coronaire sur les paramètres cardiodynamique du cœur isolé de lapin.

Ainsi, comme le montre la figure 49, les extraits de safran s'avèrent toxiques pour le cœur à des concentrations égales ou supérieures à 1 mg/mL délivrées au cœur pendant 10 min. En effet, il diminue d'une manière drastique dès les premières minutes la pression ventriculaire gauche, la fréquence et le débit cardiaque et augmente la pression ventriculaire télédiastolique. A une concentration de 0.1 mg/mL, le safran affecte significativement ces paramètres à partir de la dixième minute de perfusion. Par contre, il peut être perfusé à une concentration de 10 µg/mL pendant 60 min, sans effets notables sur ces paramètres. Par conséquent, 10 µg/mL (0.01 mg/mL) a été choisie comme étant la dose maximale non toxique des extraits méthanol/eau de safran. Il est à noter que la dose effective des extraits de safran qui atteint le myocarde est aussi diluée dans le débit coronaire.

3.2. Effet comparatif de la doxorubicine et de l'électrolyse sur les paramètres cardiodynamiques du cœur isolé de lapin

Nous avons recherché dans ce protocole l'effet protecteur de la dose optimale de safran préétablie (10 µg/mL) contre les RLO générés par électrolyse de la solution qui perfuse le cœur pendant 30 min comparativement à une perfusion de doxorubicine (30 µM) pendant 30 min dans la circulation coronaire.

3.2.1. Paramètres cardiodynamiques

La figure 50 montre les pourcentages de récupération des paramètres cardiodynamiques après 30 min d'électrolyse et 30 min de perfusion de doxorubicine en présence ou absence de safran ou de catalase utilisée comme produit de référence.

Le tableau 5 montre en détail l'évolution des paramètres cardiodynamiques au cours de ce protocole. En ce qui concerne les cœurs contrôle, la LVP reste relativement stable autour de 120 mmHg et la LVEDP autour de 10 mmHg. De même, c'est le cas de HR, environ 160 battements/min et CF autour de 24 mL/min. L'électrolyse de la solution de tyrode qui perfuse le cœur isolé pendant 30 min, génère des RLO en grandes quantités et produit des altérations au niveau du cœur se manifestant par une baisse de la LVP, HR et CF avec une augmentation de la LVEDP. Le safran (10 µg/mL), perfusé 1 min avant et pendant l'électrolyse protège le myocarde

contre les effets délétères des radicaux libres. En effet, les paramètres hémodynamiques sont améliorés significativement suite au traitement par le safran et par la catalase, mais sans retour total à la normale. La catalase, un piègeur de radicaux libres connus, procure une protection d'environ 50% à la dose optimale de 150 UI dans le système d'électrolyse. D'autre part, la DOX perfusée à 30 μ M pendant 30 min induit, comme l'électrolyse, une diminution significative de la LVP, HR et CF avec une augmentation de la LVEDP. Le safran et la catalase, administrés 1 min avant et pendant la perfusion de DOX fournissent une protection partielle des paramètres hémodynamiques. Ainsi le safran possède une activité protectrice plus marquée contre les dommages de l'électrolyse que ceux provoqués par la doxorubicine. La figure 51 présente un tracé type de la pression ventriculaire gauche.

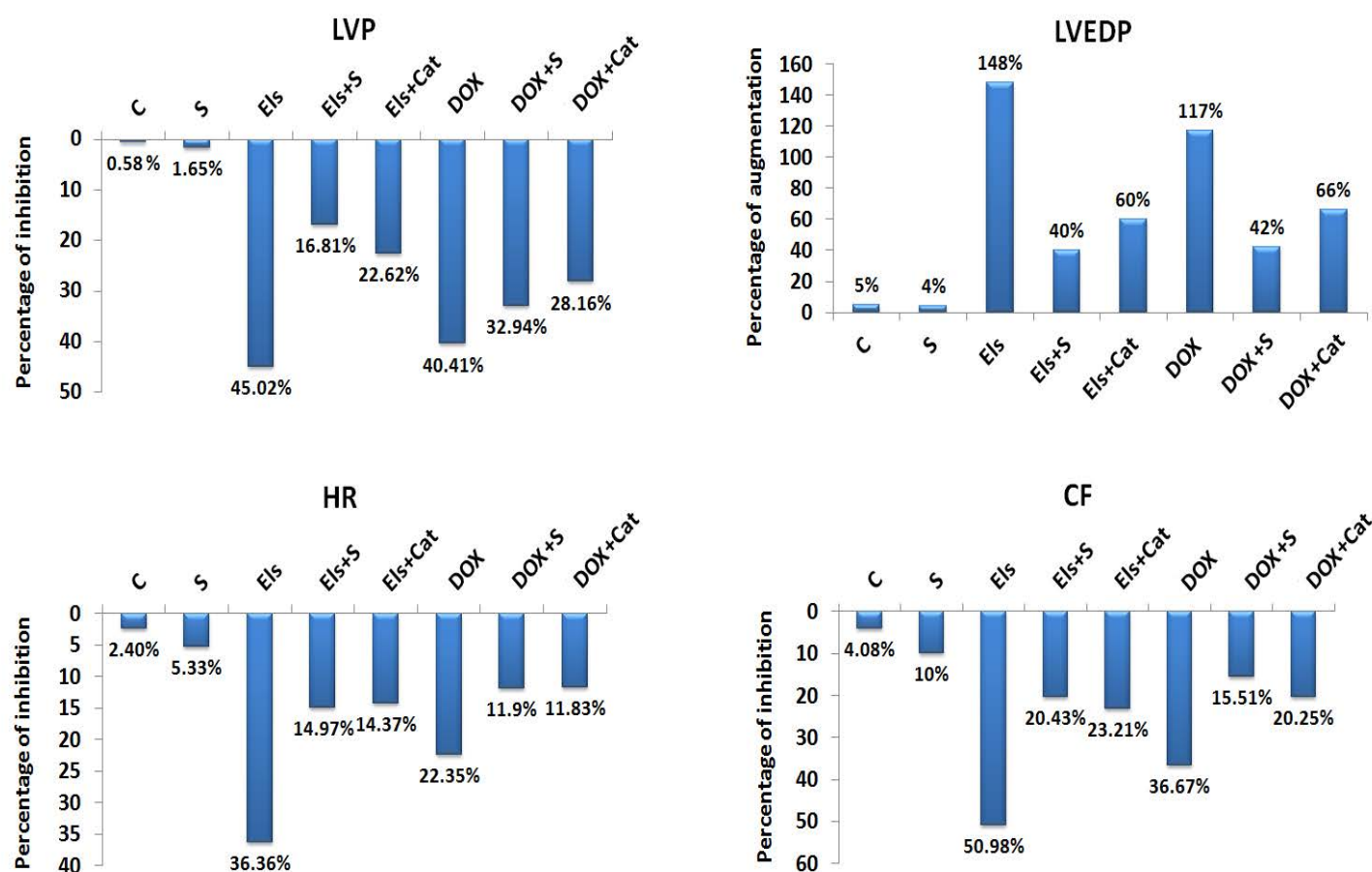


Figure 50 . Les pourcentages de variation des paramètres cardiodynamiques en réponse aux différents traitements. Les données représentent les pourcentages par rapport aux valeurs de bases avant traitement. LVP: pression ventriculaire gauche; LVEDP: pression télédiastolique; CF: débit coronaire; HR: rythme cardiaque. C: contrôle; Cat: catalase; DOX: doxorubicine; Els: électrolyse; S: safran.

Tableau 5. Effet de différents traitements sur les paramètres cardiodynamiques du cœur isolé de lapin. LVP: pression ventriculaire gauche; LVEDP: pression télédiastolique; CF: débit coronaire; HR: rythme cardiaque. C: témoin; Cat: catalase; DOX: doxorubicine; Els: électrolyse; S: safran. * p <0.05 par rapport au C; # p <0.05 par rapport à Els; † p <0.05 par rapport à DOX; n = 5-8.

Time (min)	C	S	Els	Els+S	Els+Cat	DOX	DOX+S	DOX+Cat
LVP (mm Hg)								
0	120.7±10.2	121.5±9,7	119.5±9.8	118.4±8.2	120.7±10.5	121.5±11.3	119.6±9.7	119.3±9.0
10	121.0±9.4	118.4±8.1	90.4±5.6*	108.6±7.3#	108.3±7.2#	98.5±8.3*	100.3±8.4*	98.0±8.4*
20	121.3±9,5	118.8±7.5	77.3±4.5*	105.9±6.8#	98.5±7.8*#	87.8±7.6*	92.6±7.0*	97.6±8.5*
30	120.2±9.7	119.5±8.6	65.7±4.0*	98.5±6.9*#	93.4±7.0*#	72.4±6.5*	80.2±6.6*	85.7±6.5* [†]
LVEDP (mm Hg)								
0	10	10	10	10	10	10	10	10
10	10.7±0.4	11.2±0,7	16.6±0.8*	10.3±0,7#	10.7±0.4#	16.0±1.7*	12.3±1,4 [†]	13.4± 1.7* [†]
20	10.8±0,6	10.5±0,5	20.9±1.3*	13.5±1.2*#	15.2±1.6*#	19.5±2,8*	13.4±1.6* [†]	15.5±2.6* [†]
30	10.5±0.5	10.4±0.4	24.8±1.5*	14.0±1.8*#	16.0±2.0*#	21.7±3.7*	14.2±2.5* [†]	16.6±3.0* [†]
HR (battements/min)								
0	167±7	169±9	165±8	167±9	167±8	170±9	168±7	169±8
10	165±9	167±8	126±5*	148±10#	154±12#	150±7*	157±8	160±7
20	167±8	160±10	117±4*	144±12*#	148±13#	143±6*	153±7	155±6 [†]
30	163±8	160±9	105±4*	142±9*#	143±9*#	132±5*	148±7 [†]	149±8 [†]
CF (mL/min)								
0	24.3± 2.8	25.0±2.3	25.5±2.6	23.5±3.4	23.7±2.9	24.0±3.1	24.5±2.6	23.7±2.5
10	25.2± 3.2	24.5±2.7	18.2±2.0*	22.8±2.5#	20.3±2.4	19.5±1.9*	20.4±2.5	21.3±2.6
20	24.1± 3.5	23.7±2.4	15.0±1.4*	19.6±1.9#	18.5±1.9*#	17.4±1.6*	20.3±2.2	19.7±1.8
30	23.5± 3.4	22.5±2.0	12.5±1.2*	18.7±1.8#	18.2±1.7#	15.2±1.4*	20.7±2.1 [†]	18.9±1.7 [†]

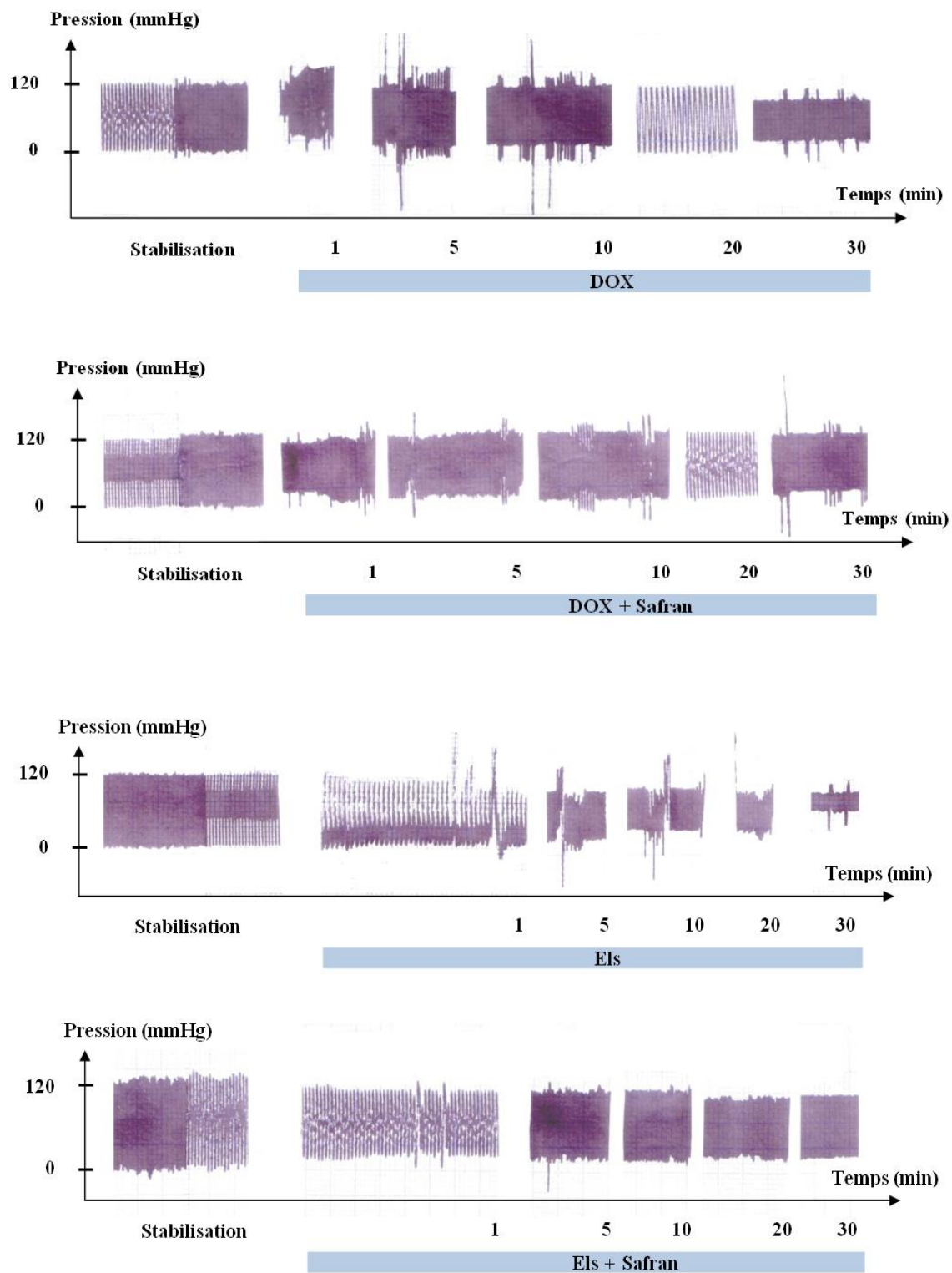


Figure 51. Tracés type montrant la pression ventriculaire gauche du cœur isolé de lapin soumis à une électrolyse source de radicaux libres ou à la doxorubicine en absence ou présence de safran. DOX: doxorubicine; Els: électrolyse.

3.2.2. Quantification des arythmies

Le tableau 6 montre que les cœurs témoins ne présentent pas d'arythmies à part quelques rares extrasystoles (PVC) qui ont été observées. Les cœurs perfusés avec le safran (10 µg/mL), ne présentent pas de différence significative par rapport au témoin quant à la survenue des arythmies. Les cœurs ayant subi l'électrolyse manifestent surtout des fibrillations ventriculaires (VF) et/ou tachycardies ventriculaires (VT), alors que les cœurs perfusés avec DOX manifestent principalement des PVC et rarement des VT/VF. Le safran, ainsi que la catalase, ont été plus efficaces sur l'électrolyse que sur la DOX, pour réduire l'incidence des arythmies. La figure 52 présente un tracé type des différentes arythmies analysées.

Tableau 6. Quantification des arythmies. Le nombre d'extrasystoles (PVC premature ventricular contractions) et les pourcentages de tachycardie et fibrillation ventriculaire (VT/VF) des cœurs témoins et des cœurs soumis à l'électrolyse ou à la doxorubicine avec et sans traitement par le safran ou la catalase. * p <0.05 par rapport au C; # p <0.05 par rapport à Els; † p <0.05 par rapport à DOX, n = 5-8. C: cœurs contrôle; S: safran, Els: électrolyse; DOX: doxorubicine; Cat: catalase.

C	S	Els	Els+S	Els+Cat	DOX	DOX+S	DOX+Cat
PVC (n)							
1.80 ± 0.8	3.65 ±1.4	17.7 ± 2.6*	5.5 ± 2.4*#	7.3 ± 3.6*#	42.7 ± 7.3*	22.0 ± 3.2*†	15.2 ± 4.8*†
VT/VF (%)							
0	0	66.6*	16.6*#	18.4*#	0	0	0

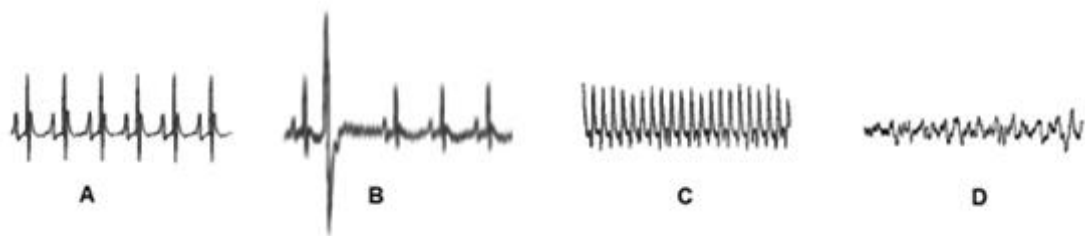


Figure 52. Tracés type d'épi-ECG. A : ECG normal. B : PVC (contraction ventriculaire prématurée). C : Tachycardie ventriculaire. D : Fibrillation ventriculaire

3.2.3. Marqueurs enzymatiques d'oxydation

La figure 53 montre que l'électrolyse (3 mV pendant 30 min), et la doxorubicine (30 μ M pendant 30 min) augmentent significativement la peroxydation lipidique du myocarde jusqu'à 70.58 et 50.16 nmol/g de tissu respectivement par comparaison à 32.58 nmol/g de tissu pour le groupe témoin. De plus, l'électrolyse et la DOX provoquent une diminution significative de l'enzyme antioxydante SOD pour atteindre 7.3 et 7.66 U/mg de tissu respectivement par comparaison à 12.44 unité/mg de tissu pour le groupe témoin. Le safran, comme la catalase, ont été efficaces sur ces deux paramètres en diminuant la peroxydation lipidique et en augmentant la SOD significativement.

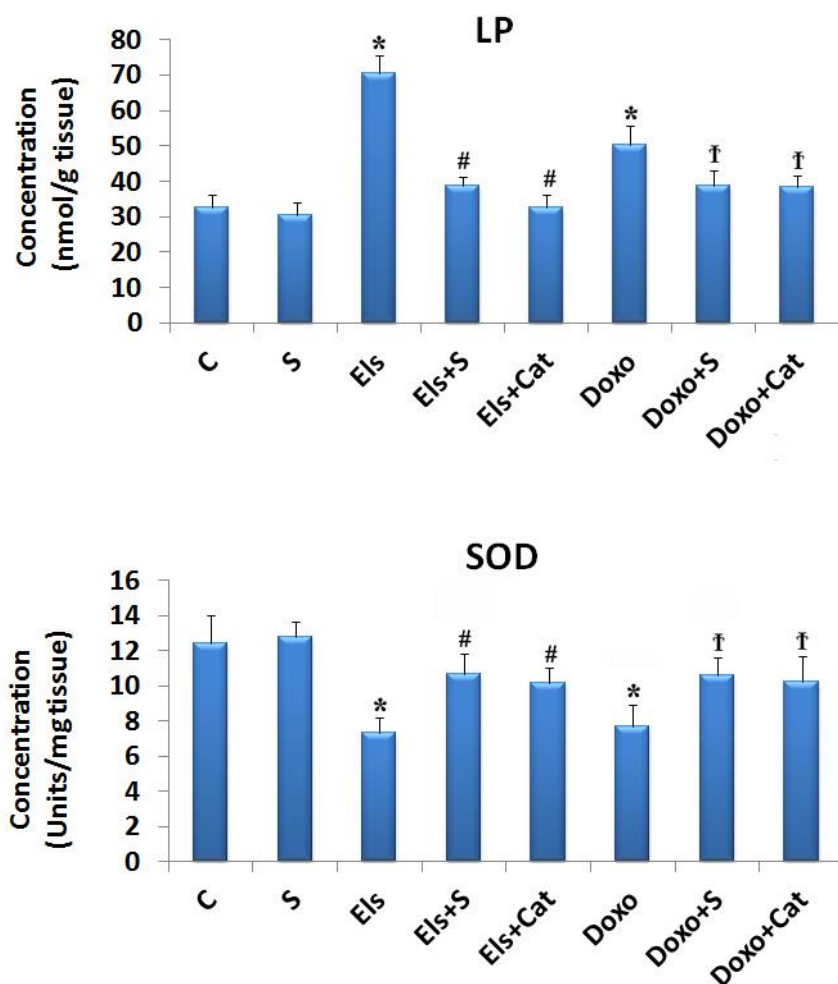


Figure 53. Les changements dans les taux de peroxydation lipidique (LP) et l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). Dans les tissus des cœurs témoins et des cœurs soumis à l'électrolyse ou à la doxorubicine avec et sans traitement par le safran ou la catalase. * $p < 0.05$ par rapport au C; # $p < 0.05$ par rapport à Els; † $p < 0.05$ par rapport à DOX. $n = 5-8$. C: cœurs contrôle; S: safran; Els: électrolyse; DOX: doxorubicine; Cat: catalase.

3.2.4. Coupes histologiques

Dans les cœurs soumis à l'électrolyse, on note l'apparition de cardiomyocytes déformés avec des espaces intercellulaires larges (figure 54 B). De même, pour les cœurs perfusés avec la DOX, l'architecture du myocarde est fortement affectée par une augmentation des espaces intercellulaires, moins l'adhérence entre les cardiomyocytes et la formation d'œdème (figure 54 D). D'autre part, suite au traitement par le safran avec la DOX ou l'électrolyse, l'aspect général du tissu cardiaque se rapproche de la normale et les espaces entre les cardiomyocytes semblent significativement réduit (figure 54 C et E).

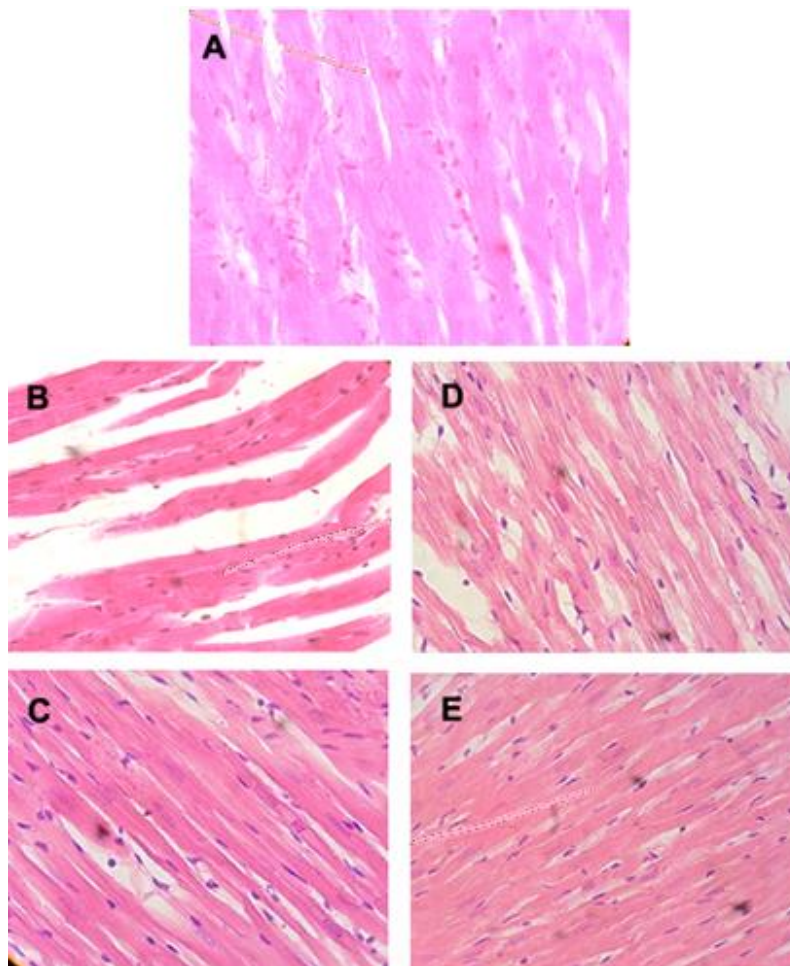


Figure 54. Examen histologique en microscopie optique (x400). A: cœur témoin; B: cœur soumis à l'électrolyse; C: cœur soumis à l'électrolyse + traitement au safran; D: cœur perfusé avec la doxorubicine; E: cœur perfusé avec la doxorubicine + safran.

3.2.5. Discussion

Dans cette première série d'expérience, nous avons tout d'abord perfusé le cœur isolé de lapin avec différentes concentrations d'extraits de safran afin de rechercher la dose thérapeutique non toxique. Des doses uniques, ainsi que des perfusions continues de 60 min ont été réalisées à différentes vitesses. Ainsi, à une concentration supérieure à 100 $\mu\text{g/mL}$, le safran est toxique pour le cœur. Par suite, la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ a été considérée comme dose optimale n'ayant pas un effet direct sur la mécanique cardiaque. A noter que la concentration finale qui atteint le myocarde est bien moins importante car elle est aussi dissoute dans le débit coronaire qui est de 20 mL/min en moyenne.

Nous sommes les premiers à rapporter des valeurs concernant la toxicité du safran sur le myocarde de lapin. Dans la littérature il existe une seule étude réalisée par Boskabady et al., 2008 qui ont utilisé des concentrations d'extraits de safran allant de 1 à 5 mg/100mL sur le cœur isolé de cochon d'inde trouvant aussi un effet inotrope négatif et une bradycardie. Dans ce contexte, il existe des valeurs concernant la DL50 des extraits de safran administrés par voie intrapéritonéale chez la souris qui sont de 2 à 6 g/kg. Ces extraits diminuent la valeur de l'hématocrite, l'hémoglobine et le nombre des érythrocytes; mais sans provoquer des effets pathologiques significatives dans différents organes (Escribano et al., 1996). Des doses orales et intrapéritonéales élevées de crocine (3 g/kg) pendant 2 jours n'ont pas causé la mort chez la souris (Hosseinzadeh et al., 2010). Chez les humains, le safran à des doses comprises entre 1.2 et 2 g induit des nausées, des vomissements, de la diarrhée et des saignements (Schmidt et al., 2007). À des doses entre 200 et 400 mg/jour pendant une semaine, des comprimés de safran ont changé certains paramètres hématologiques et biochimiques chez des volontaires adultes en bonne santé; mais sans être cliniquement significatifs (Modaghegh et al., 2008). Imanshahidi et al., (2010) rapportent une diminution de plus de 50 % de la pression artérielle des rats ayant reçu des extraits par voie intraveineuse de safran (10 mg/kg), de safranale (1 mg/kg) et de crocine (200 mg/kg), attribuant ainsi au safranale le pouvoir hypotenseur majeur.

Dans une deuxième étape, nous avons utilisé le système d'électrolyse pour la production de RLO dans le cœur isolé. En effet, l'électrolyse produit une cascade de radicaux comme l'a confirmé la technique de résonance paramagnétique électronique (Lecours et al., 1998), qui cause un dommage important au myocarde. Enfin, dans la dernière étape, nous avons testé la doxorubicine

perfusée directement dans la circulation coronaire afin de mesurer l'ampleur des dommages cardiaques qu'elle cause. A noter que la quantité de doxorubicine administrée au cœur de lapin a été choisie comme étant proche de celle qui peut atteindre le cœur par l'intermédiaire de la circulation suivant une dose utilisée en chimiothérapie. Dans ces deux modèles, le traitement par le safran, fournit une protection significative contre les dommages causés au myocarde par l'électrolyse et à un degré moindre contre ceux provoqués par la doxorubicine.

Il est évident que les RLO générés, par l'électrolyse ou la doxorubicine, réagissent avec les lipides, les protéines ainsi que d'autres constituants cellulaires provoquant des cassures de l'ADN. Par ailleurs, une peroxydation lipidique, des dommages mitochondriaux et une altération des membranes cellulaires du muscle cardiaque peuvent être induits (Dziegiel et al., 2002). En effet, le tissu cardiaque est sensible aux dommages oxydatifs en raison de sa vulnérabilité au stress oxydatif et les défenses antioxydantes faibles de cet organe par rapport aux autres. Le niveau élevé de stress oxydatif pendant la chimiothérapie peut surmonter les défenses antioxydantes dans le tissu cardiaque conduisant ainsi à la toxicité (Daloz et al., 1999).

Comme on s'y attendait, le safran administré pendant l'électrolyse qui produit des RLO en abondance, est capable de protéger le cœur contre leurs effets délétères. Cette protection est assez importante en se basant sur les paramètres cardiodynamiques, biochimiques et pathologiques qui retournent vers la normale lors du traitement par le safran.

Dans nos conditions expérimentales, le safran offre aussi une protection significative contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en se fiant aux paramètres cardiodynamiques et les résultats biochimiques. Toutefois, cette protection n'est pas aussi importante que dans l'électrolyse. Notez que la catalase, produit de référence utilisé à la dose optimale, ne donne pas une protection complète dans notre système, ce qui suggère qu'un autre mécanisme à côté de la génération de RLO pourrait être impliqué dans la cardiotoxicité de la doxorubicine. Ainsi, le safran, comme la catalase, n'est pas en mesure de s'opposer complètement à la toxicité de la DOX tel qu'il est utilisé dans ce modèle. Comme une extension logique de cette étude, le safran sera testé après dans un modèle de cardiotoxicité chronique par la DOX.

3.3. Effet du safran contre la cardiotoxicité aigüe de la doxorubicine sur le cœur isolé de lapin en condition ischémique

Dans ce deuxième protocole, nous avons voulu examiner si la dose optimale de safran (10 µg/mL) est capable d'assurer une protection contre les RLO libérés à la reperfusion suite à une ischémie globale de 30 min. Par ailleurs, le but ultime de cette série d'expérience est de tester l'effet des extraits de safran, en pré ou post traitement, sur le cœur isolé soumis à la fois à l'IR et l'administration de la DOX.

3.3.1. Paramètres cardiodynamiques

Dans les figures 55 et 56, l'effet de l'IR (I 30 min/ R 40 min) ou l'IR + DOX (5 µg/mL) est étudié sur la fonction cardiaque en présence ou absence d'extraits de safran (10 µg/mL) pendant 5 minutes en prétraitement ou à la reperfusion. Dans les cœurs témoins, les paramètres cardiaques restent stables tout au long de la période de perfusion de 70 min.

Suite à 30 min d'ischémie globale, tous les paramètres ont été affectés sans atteindre les valeurs initiales après 40 min de reperfusion. L'administration de DOX (5 µg/mL) lors de la reperfusion aggrave la fonction cardiaque, ce qui provoque une récupération du cœur plus lente. Ainsi, les cœurs ayant subi l'IR en présence de DOX ont montré à la fin de la reperfusion, une réduction de la LVP qui atteint 65 mmHg par rapport au contrôle (120 mmHg), et une augmentation de la LVEDP à 18 mmHg par rapport au contrôle (10 mmHg). Le traitement au safran avant l'ischémie améliore la récupération du cœur, tandis que donné à reperfusion, il améliore significativement la LVP et LVEDP qui se rapprochent des valeurs de référence (92 et 14 mmHg, respectivement). HR et CF ont également été considérablement améliorées. HR a diminué suite au traitement par la DOX et IR pour atteindre 110 battements/min et augmente jusqu'à 148 battements/min lorsque le safran a été administré à la reperfusion, par rapport au contrôle (178 battements/min). CF a également diminué suite au traitement par la DOX et IR pour atteindre 17 mL/min et augmente jusqu'à 21 mL/min lorsque le safran a été administré à la reperfusion, par rapport au contrôle (22 mL/min). La figure 57 représente les enregistrements-types de la LVP du cœur isolé de lapin.

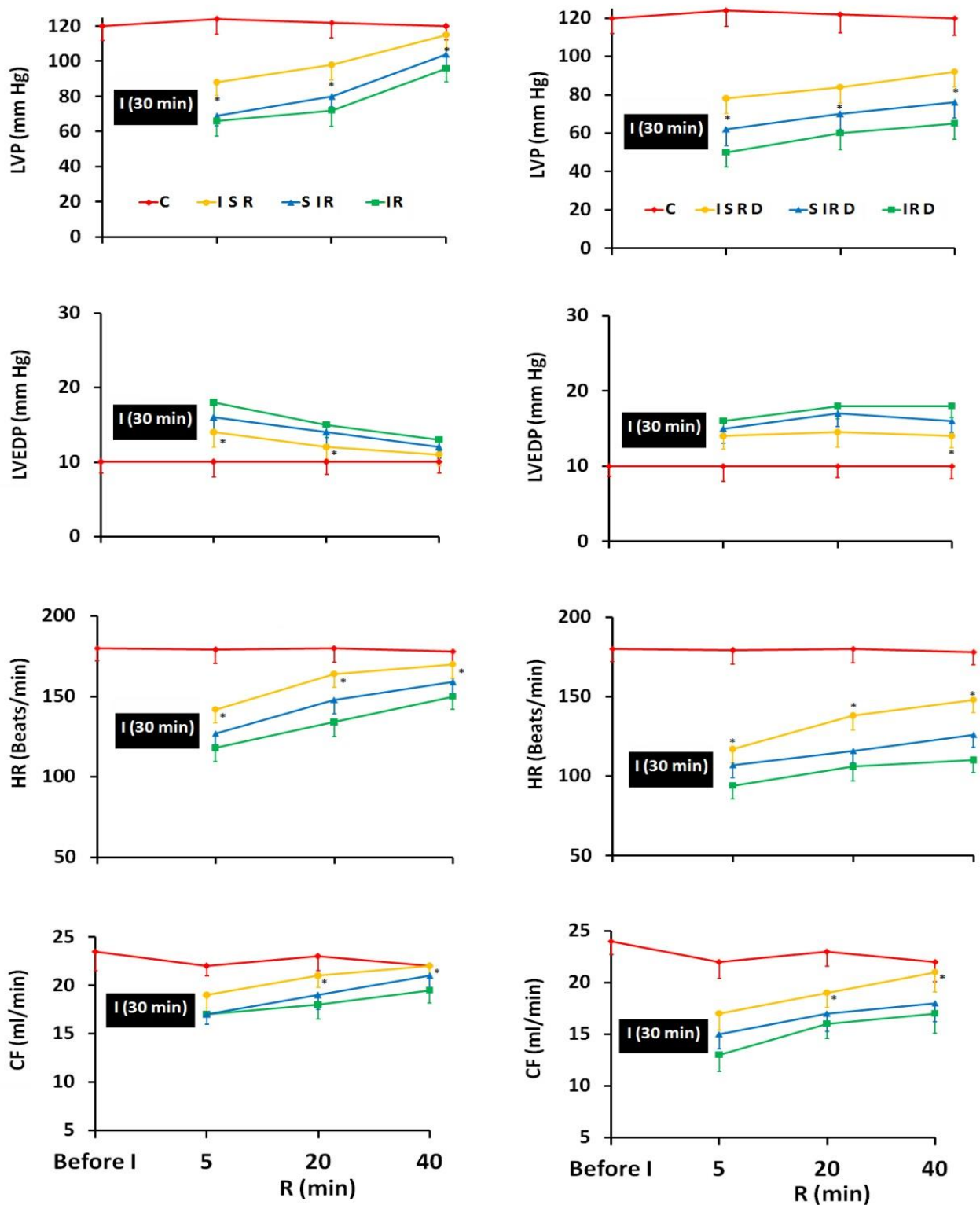


Figure 55. Série de gauche: protocole d'ischémie/reperfusion (IR) sans ou avec traitement au safran avant l'ischémie (S IR) ou à la reperfusion (I S R). * $p < 0.05$ par rapport à IR.

Série de droite: protocole d'ischémie/reperfusion + doxorubicine (IR D) avec et sans traitement au safran avant l'ischémie (S IR D) ou à la reperfusion (I S R D). * $p < 0.05$ par rapport à IR D.

C: contrôle; LVP: pression ventriculaire gauche; LVEDP: pression télédiastolique; CF: débit coronaire; HR: rythme cardiaque ; R: reperfusion (n=6).

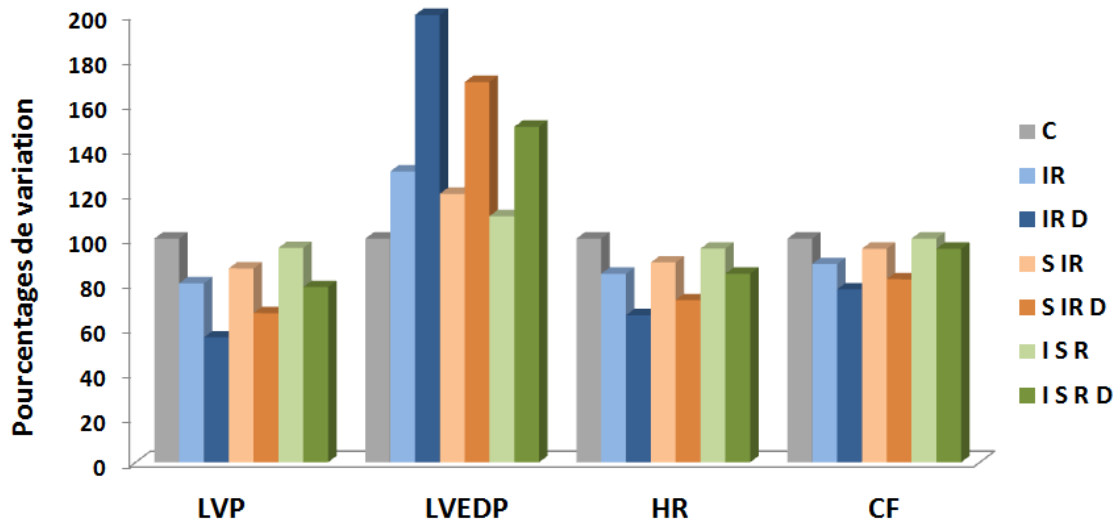


Figure 56. Comparaison des pourcentages de récupération hémodynamique par rapport au témoin (100%) dans les deux protocoles à 40 min de reperfusion. IR: Ischémie/reperfusion; S IR: IR + safran avant l'ischémie; I S R: IR + safran à la reperfusion. IR D: IR + doxorubicine; S IR D: IR D + safran avant l'ischémie; I S R D: IR D + safran à la reperfusion; C: contrôle; LVP: pression ventriculaire gauche; LVEDP: pression télédiastolique; CF: débit coronaire; HR: rythme cardiaque.

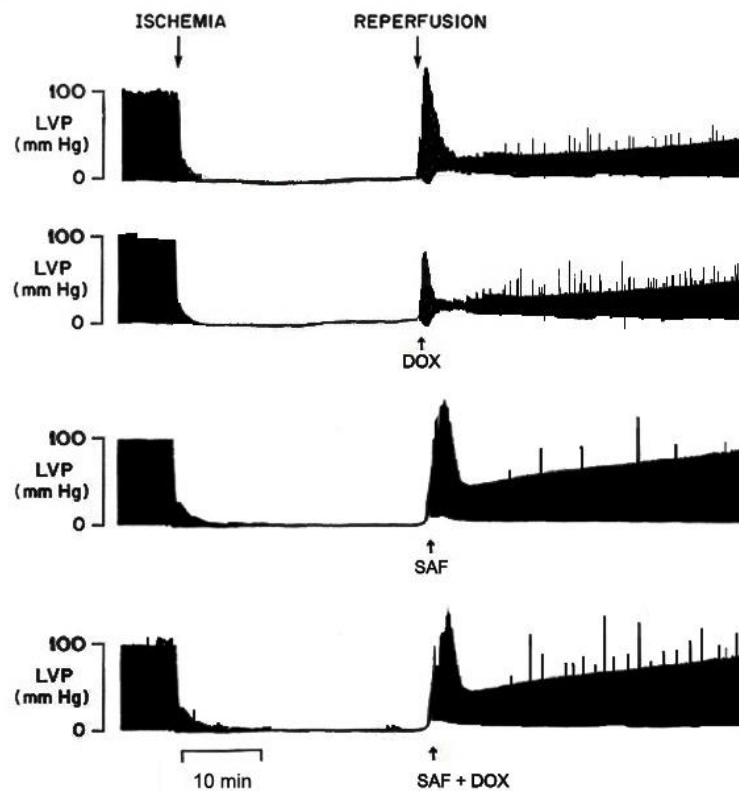


Figure 57. Enregistrements-types de la LVP du cœur isolé de lapin soumis à une période d'ischémie globale suivi d'une reperfusion en présence et en absence de doxorubicine (DOX, 5 $\mu\text{g/mL}$) et safran (SAF, 10 $\mu\text{g/mL}$).

3.3.2. Quantification des arythmies

Dans le groupe contrôle, il n'y a pas d'arythmie; de très rare extrasystoles (PVC) peuvent être observées parfois dans quelques cœurs de lapin. Au cours de la première minute de reperfusion, suite à 30 minutes d'ischémie, une période de tachycardie ventriculaire (VT) grave apparaît dans tous les cœurs non traités, cette période a ensuite été atténuée et remplacée par des PVC fréquentes. La DOX, injectée durant la reperfusion, augmente la fréquence des PVC. Il n'y a pas diminution des arythmies lorsque les cœurs sont perfusés avec le safran (10 µg/mL) avant l'ischémie; mais quand il est administré à la reperfusion, le safran réduit de façon significative la production des PVC et VT. Ainsi, les extraits de safran présentent un effet anti-arythmique puissant contre l'ischémie-reperfusion seule et dans une moindre mesure contre la reperfusion et l'administration de DOX à la fois (tableau 7).

Tableau 7. Le nombre d'extrasystoles PVC (premature ventricular contractions) et les pourcentages de VT (tachycardie ventriculaire) enregistrés lors de la reperfusion dans les différents groupes. *p<0.05 par rapport à IR. #p<0.05 par rapport à IR D. IR: ischémie-reperfusion; S: safran; D: doxorubicine (n=6).

	C	IR	SIR	ISR	IRD	SIRD	ISRD
PVC (n)	5 ± 4	56 ± 11	40 ± 9	28 ± 7*	92 ± 16*	80 ± 11*	47 ± 8[#]
VT (%)	0	100	75	25*	100	75	50^{*#}
Durée des VT (sec)	0	52 ± 12	38 ± 9	14 ± 5*	47 ± 10	35 ± 8	24 ± 6^{*#}

3.3.3. Marqueurs enzymatiques d'oxydation

Comme le montre le tableau 8, les cœurs soumis à l'IR présentent une augmentation significative des taux de MDA par rapport aux cœurs témoins; ceci augmente d'avantage quand la DOX a été administrée pendant la reperfusion. Le safran, administré pendant les premières minutes de la reperfusion, diminue de manière significative le niveau de MDA. Concernant l'activité de la SOD, elle diminue de façon significative après l'IR et d'une façon radicale suite à la perfusion de

DOX. Le safran, perfusé pendant les premières minutes de la reperfusion, augmente de façon significative l'activité de la SOD vers les valeurs des contrôles. La créatine kinase dans la solution de perfusion a augmenté dans les cœurs soumis à l'IR et traités par la DOX et s'approche des valeurs du contrôle dans les cœurs traités avec du safran à la reperfusion (tableau 8).

Tableau 8. Changements dans les niveaux de la peroxydation lipidique (LP), l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et l'activité de la créatine kinase (CK) dans la solution de perfusion dans les différents groupes. *p<0.05 par rapport au contrôle, #p<0.05 par rapport à IR, †p<0.05 par rapport à IR D. IR: ischémie-reperfusion; S: safran; D: doxorubicine.

	LP (nmol MDA/g tissue)	SOD (U/mg tissue)	CK IU /mL
Control	30.60 ± 4.95	12.04 ± 1.87	1.12± 0.14
IR	46.93 ± 5.97*	8.72 ± 1.50*	1.68 ± 0.17*
SIR	42.50 ± 4.27*	9.88 ± 1.76 *	1.54 ± 0.20*
ISR	38.25 ± 3.90 [#]	10.92 ± 1.44 [#]	1.35 ± 0.16 [#]
IRD	58.10 ± 5.35* [#]	5.86 ± 0.70* [#]	2.17 ± 0.32* [#]
SIRD	50.42 ± 4.82* [#]	6.90 ± 1.12* [#]	1.84 ± 0.22*
ISRD	43.05 ± 5.34* [†]	8.04 ± 1.66* [†]	1.49 ± 0.17* [†]

3.3.4. Histopathologie

Les coupes histologiques du tissu des cœurs contrôles a montré une morphologie normale; les fibres musculaires cardiaques sont alignées, les stries transversales sont claires et bien distribués, pas d'œdème ni de nécrose ont été notés (figure 58 A). Les fibres musculaires cardiaques des cœurs soumis à 30 min d'ischémie et 40 min de reperfusion (figure 58 B) sont irrégulières avec perte des stries et augmentation de la distance entre les fibres. La DOX administrée pendant la reperfusion (figure 58 C) provoque une disposition irrégulière des fibres, une augmentation

prononcée de la distance entre les fibres et la nécrose. Lorsque le safran est perfusé avant l'ischémie puis les cœurs sont soumis à la reperfusion avec DOX; les coupes histologiques ne révèlent pas moins de dommages (figure 58 D). La perfusion de safran pendant les premières minutes de la reperfusion protège le myocarde; en effet, on remarque un léger élargissement des fibres musculaires sans perte de stries et aucune nécrose (figure 58 E).

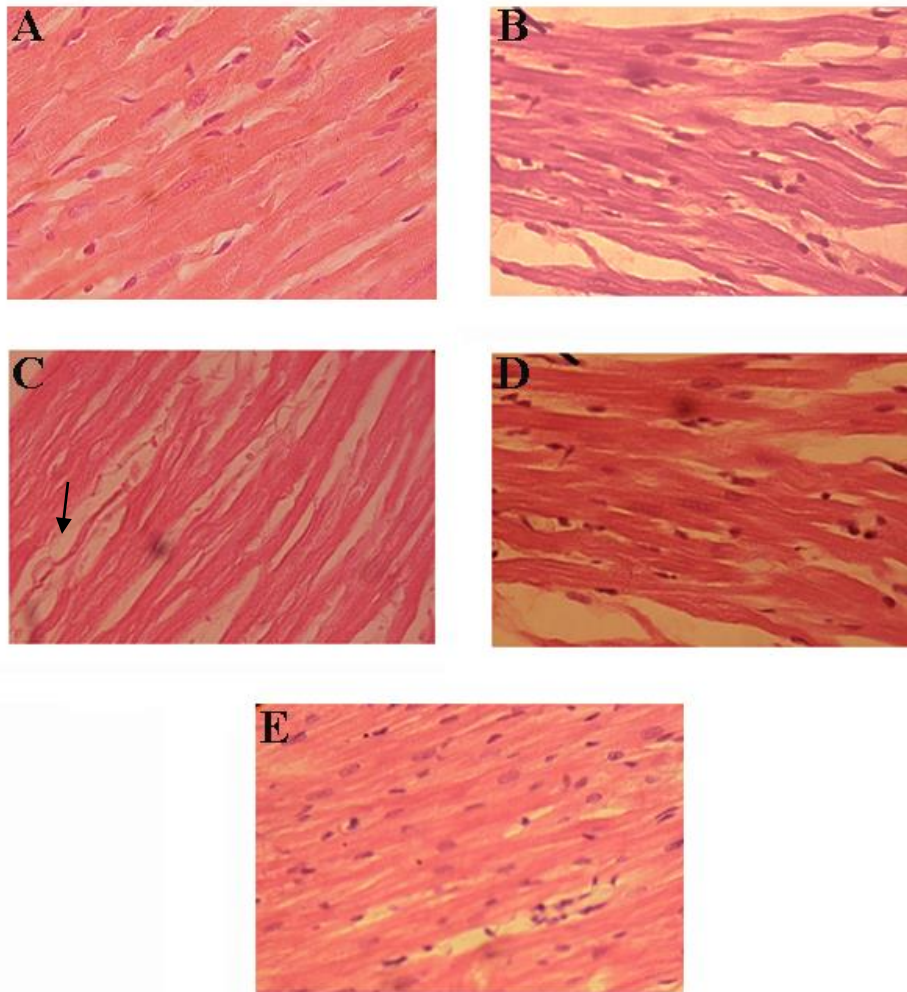


Figure 58. Coupes histologique au microscope optique représentant le tissu musculaire cardiaque coloré à l'HE (grossissement original x 400). A: Cœur contrôle: les fibres musculaires sont alignées, les stries transversales sont claires et bien réparties et pas d'œdèmes ou de nécroses sont notés. B: Cœur soumis à 30 min d'ischémie et 40 min de reperfusion: les fibres musculaires sont irrégulières avec une perte des stries et augmentation de la distance entre les fibres. C: Cœur soumis à une perfusion de DOX lors de la reperfusion: disposition irrégulière et marquée des fibres, augmentation de la distance entre les fibres et nécrose. D: Cœur perfusé au safran avant l'ischémie et soumis à la reperfusion avec DOX: plus ou moins de dégâts persistent. E: Cœur perfusé au safran pendant les premières minutes de reperfusion: élargissement des fibres musculaires sans perte de stries et pas de nécrose des myocytes (n=4).

3.3.5. Voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection du safran

Comme cela est illustré dans la figure 59, les résultats du western blot montrent que l'IR (I 30 min/ R 40 min) diminue la phosphorylation de AKT, mTOR et 4EBP1 par rapport au témoin. Cette phosphorylation diminue d'avantage lorsque les cœurs sont soumis à l'IR et traités par la DOX (5 µg/mL) ensemble (IR D). Par contre, le traitement par les extraits de safran (10 µg/mL) à la reperfusion (I S R), et de même suite au traitement par le safran (10 µg/mL) et la DOX (5 µg/mL) à la reperfusion (I S R D), il y a augmentation significative de p-AKT (Ser473), p-mTOR (Ser2448) et p-4EBP1 (Ser 65 et Thr 70) en comparaison avec les groupes (I R) et (I R D) respectivement. Les taux de AKT, mTOR et 4EBP1 totales étant inchangé.

D'autre part, l'ischémie/reperfusion (I 30 min/ R 40 min) augmente la phosphorylation de P38 par rapport au contrôle. Cette phosphorylation augmente encore plus lorsque les cœurs sont soumis à l'IR et traités par la DOX (5 µg/mL) ensemble (IR D). Le traitement par le safran (10 µg/mL) à la reperfusion (I S R), et de même suite au traitement par le safran (10 µg/mL) et la doxorubicine (4 µmol/L) à la reperfusion (I S R D), nous observons une diminution de la phosphorylation de P38 sur les résidus Thr180 et Tyr182 en comparaison avec les groupes (I R) et (I R D) respectivement. Le taux de P38 totale étant inchangé (figure 60).

Le niveau d'expression de la troponine T cardiaque (cTnT) a aussi été recherché. L'ischémie/reperfusion (I 30 min/ R 40 min) entraîne la perte considérable de l'expression de la cTnT. Suite à l'ischémie/reperfusion et la DOX (5 µg/mL) ensemble (IR D), la perte du niveau de cTnT est exacerbée. Par contre, le niveau de la troponine T se rétablit proche de la normale quand les cœurs sont traités au safran (10 µg/mL) à la reperfusion avec et sans doxorubicine (I S R et I S R D) (figure 61).

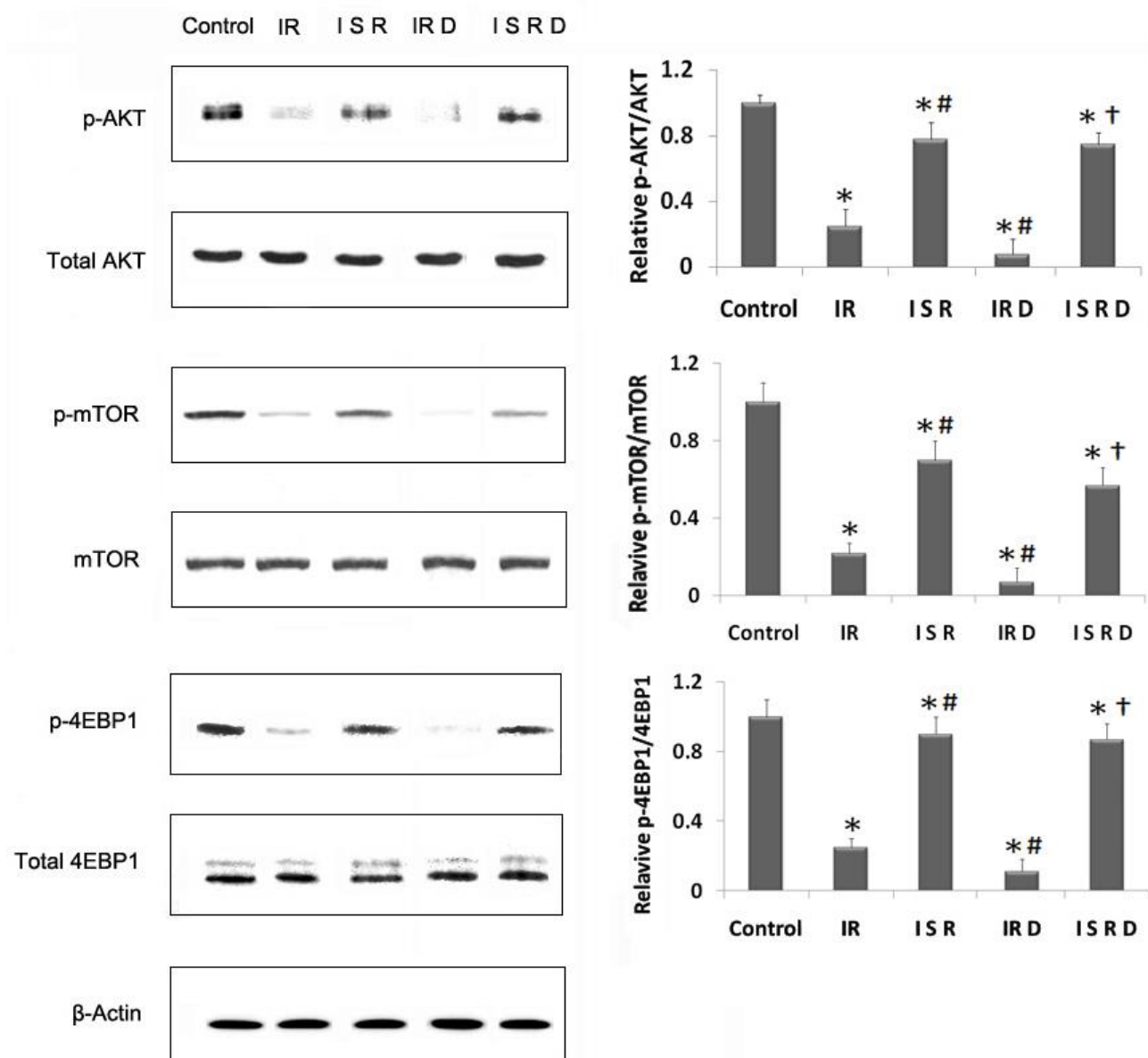


Figure 59. Western blot représentatif de la phosphorylation de AKT Ser473, mTOR Ser2448 et 4EBP1 Ser 65 et Thr 70 dans les cœurs isolés de lapin.

- cellules non traitées (Control);
- cellules soumises à: Ischémie/Reperfusion (IR) 30min/40min
- cellules soumises à: IR 30min/40min et Safran (S) 10 μ g/mL
- cellules soumises à: IR 30min/40min et Doxorubicine (D) 5 μ g/mL
- cellules soumises à: IR 30min/40min, S 10 μ g/mL et D 5 μ g/mL

Les western blots anti-AKT, anti-mTOR, anti-4EBP1 totales et anti- β -Actin ont été réalisés comme contrôle de la quantité de protéines déposées. La quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie est effectuée à l'aide du logiciel Image j. Les données sont exprimées en quantité de protéines AKT, mTOR et 4EBP1 phosphorylées rapporté à la quantité de protéines AKT, mTOR et 4EBP1 totales. Les résultats exprimés représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences. * $p < 0.05$ vs control, # $p < 0.05$ vs IR, † $p < 0.05$ vs IR D.

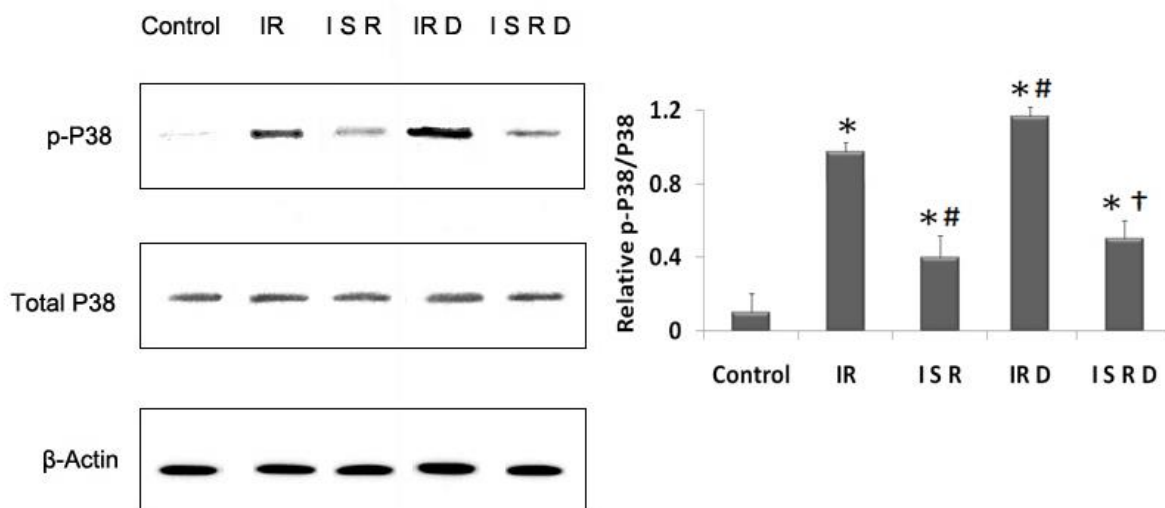


Figure 60. Western blot représentatif de la phosphorylation de P38 Thr180 et Tyr182 dans les cœurs isolés de lapin. Cellules non traitées (Control); cellules soumises à une Ischémie/Reperfusion (IR) 30min/40min; cellules soumises à IR 30min/40min et Safran (S) 10 μ g/mL; cellules soumises à IR 30min/40min et Doxorubicine (D) 5 μ g/mL; cellules soumises à IR 30min/40min, S 10 μ g/mL et D 5 μ g/mL. Les western blots anti-P38 totale et anti- β -Actin ont été réalisés comme contrôle de la quantité de protéines déposées. La quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie est effectuée à l'aide du logiciel Image j. Les données sont exprimées en quantité de protéines P38 phosphorylées rapporté à la quantité de protéines P38 totales. Les résultats exprimés représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences. * p <0.05 vs control, # p <0.05 vs IR, † p <0.05 vs IR D.

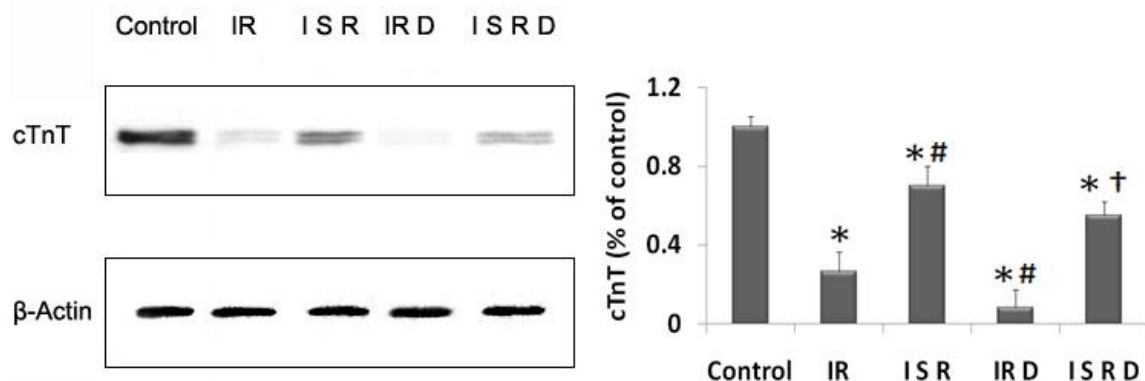


Figure 61. Western blot représentatif du niveau de troponine T cardiaque (cTnT) dans les cœurs isolés de lapin. Cellules non traitées (Control); cellules soumises à une Ischémie/Reperfusion (IR) 30min/40min; cellules soumises à IR 30min/40min et Safran (S) 10 μ g/mL; cellules soumises à IR 30min/40min et Doxorubicine (D) 5 μ g/mL; cellules soumises à IR 30min/40min, S 10 μ g/mL et D 5 μ g/mL. Anti- β -Actin a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées. La quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie est effectuée à l'aide du logiciel Image j. Les données sont exprimées en quantité de protéines cTnT rapporté au contrôle. Les résultats exprimés représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences. * p <0.05 vs control, # p <0.05 vs IR, † p <0.05 vs IR D.

3.3.6. Discussion

Il existe de nombreuses études sur la cardiotoxicité induite par la DOX, mais peu d'études ont été consacrées à comprendre les complications de la cardiotoxicité de la DOX dans des conditions ischémiques qui est une préoccupation clinique pouvant se dérouler pendant les stades d'un cancer qui survient chez des patients cardiaques (Boucher et al., 1995; Schjott et al., 1996; Bozcali et al., 2012). L'originalité de notre travail n'est pas seulement l'utilisation du safran contre la toxicité aiguë de la DOX lors de lésions d'ischémie-reperfusion, mais en plus nous avons testé si cette protection est due à des mécanismes de prévention ou à sa capacité de piéger les radicaux libres lors de la reperfusion et ceci par l'administration du safran avant l'ischémie ou à la reperfusion.

La concentration de DOX que nous avons utilisée (5 µg/mL) est conforme à celle qui est citée dans la littérature (Ramond et al., 2008; Gratia et al., 2012). En ce qui concerne le safran, nous avons utilisé une concentration de 10 µg/mL pendant 5 min avant l'ischémie ou à la reperfusion. Ce choix est dû au fait que dans des essais préliminaires, les concentrations plus importantes présentent un effet toxiques sur la contractilité du cœur, alors que les plus faibles concentrations ne possèdent pas un effet protecteur significatif.

Dans la présente étude, la préparation de cœur isolé soumis à une ischémie globale de 30 min suivi de 40 min de reperfusion a été utilisée comme un modèle d'ischémie myocardique aiguë suffisante pour causer des dommages importants sans provoquer un arrêt cardiaque (Kilgore et al., 1994; Palmer et al., 2004). Dans ce modèle, les principaux déterminants de la performance gauche du myocarde, ainsi que la fréquence cardiaque, le débit coronaire et l'ECG ont été dûment contrôlés et mesurés.

Le traitement par la DOX à la reperfusion aggrave les paramètres hémodynamiques et retarde la récupération cardiaque. Les extraits de safran administrés avant l'ischémie ne sont pas en mesure d'améliorer fortement la récupération de la contractilité tandis que lors de la reperfusion, ils améliorent cette récupération significativement. À cet égard, les résultats sont conformes à ceux obtenus par Hosseinzadeh et al., 2009 à l'aide d'extraits de safran et de ses constituants actifs (crocine et safranale), qui ont donné une protection significative contre les lésions d'ischémie-

reperfusion du muscles squelettiques de rat ainsi que sur la cardiotoxicité induite par l'isoprotérénol et le diazozin (Mehdizadeh et al., 2013; Razavi et al., 2013). En outre, les effets anti-arythmiques exhibées par le safran ont été rapportés par Joukar (Joukar et al., 2013). Bien que le cœur isolé perfusé a certaines limites, cette préparation est particulièrement utile pour les interventions qui peuvent agir directement et/ou indirectement sur le cœur.

Au niveau biochimique, l'ischémie-reperfusion et la DOX induisent une diminution des niveaux de SOD et une augmentation de la peroxydation lipidique dans le tissu cardiaque; ainsi qu'une élévation de CK dans le perfusat. En effet, un manque d'apport en oxygène et glucose peut endommager les cellules myocardiques. Les études histopathologiques laissent présager que des lésions peuvent provoquer la perméabilisation des membranes cellulaires résultant en une fuite des enzymes. Ceci suggère que le stress oxydatif induit par la DOX se produit en grande partie par l'intermédiaire de la génération de RLO dans le myocarde (Hardina et al., 2000; Takacs et al., 1992). A rappeler que le tissu cardiaque est particulièrement vulnérable aux dommages des radicaux libres en raison des faibles teneurs en enzymes de détoxification des RLO, y compris SOD, catalase et glutathion. Les lésions cellulaires sont donc provoquées par l'épuisement en enzymes de détoxification des RLO; ce qui est étroitement liée à la peroxydation lipidique et la perturbation des influx de Ca^{2+} provoquées par ces agents toxiques. En outre, la DOX a également une forte affinité pour la composante phospholipidique de la membrane mitochondriale dans les cardiomyocytes, conduisant à l'accumulation de cette substance dans le tissu cardiaque (Montaigne et al., 2010; Gharanei et al., 2013).

Lorsque le safran a été administré avant l'ischémie, une amélioration a été notée dans les taux d'enzymes antioxydantes, mais elle est non significative. Cependant, l'administration de safran pendant les premières minutes de reperfusion du myocarde réduit significativement les dommages oxydatifs. Le safran réduit de façon significative la peroxydation lipidique, augmente les niveaux de SOD et diminue la fuite de CK, indiquant un effet protecteur du safran sur la cardiotoxicité induite par la DOX en piégeant les RLO. Le traitement avec l'extrait de safran avant la période ischémique pourrait avoir un effet protecteur comme agent stabilisant de membrane; cependant lors de la reperfusion, l'administration du safran contribue à maintenir la concentration en enzymes près de la normale, ce qui empêche la perturbation de la cellule en

diminuant la production de RLO et l'influx de Ca^{2+} (Sachdeva et al., 2012; Razavi et al., 2013; González-Salazar et al., 2011).

Pour déterminer quelles voies de signalisation impliquent l'amélioration des paramètres cardiodynamiques des cœurs traitée avec le safran, nous avons examiné les voies PI3K/AKT et p38 MAPK par western blot. Plus spécifiquement nous avons étudié la phosphorylation de AKT, mTOR, 4EBP1 et p38 sur des protéines extraites d'homogénats de cœurs de lapins ayant subi l'IR avec et sans doxorubicine et safran.

La voie PI3K/AKT favorise la survie et la croissance des cardiomyocytes. AKT est une protéine anti-apoptotique dont la phosphorylation est dépendant de PI3K. L'activation de PI3K/AKT pourrait phosphoryler les protéines pro-apoptotiques, comme BAD et BAX, entraînant leur inactivation. Une autre action de AKT est la phosphorylation et l'inhibition de la caspase 9, une caspase initiatrice de la voie intrinsèque de l'apoptose. Les résultats suggèrent que la phosphorylation de AKT, mTOR et 4EBP1 a été inhibé dans les tissus cardiaques qui ont subi l'IR et cette inhibition est plus prononcée suite au traitement par la DOX, comparativement au groupe témoin. Par contre, on remarque une activation du niveau de p-AKT, p-mTOR et p-4EBP1 dans les tissus cardiaques ayant subi un traitement par le safran à la reperfusion avec ou sans DOX. Nos résultats sont en concordance avec d'autres études qui ont reporté une inhibition de la voie PI3K dans les extraits de cœur exposés à la DOX (Gianni et al., 2008). Ainsi, suite à IR et DOX, il y a altération de la phosphorylation de AKT qui augmente vers la normale suite au traitement par le safran, ce qui indique une augmentation de la prolifération cellulaire par le safran. De plus, nous avons déterminé l'activation de la voie mTOR, une voie de signalisation en aval de PI3K/AKT, qui a un rôle important dans la traduction. IR et DOX ont diminué la phosphorylation de mTOR (Ser2448), alors que le traitement au safran à la reperfusion (I S R et I S R D) maintient sa phosphorylation. 4EBP1 est une protéine qui est régulée par mTOR. La phosphorylation de 4EBP1 (Ser 65/Thr 70) par mTOR résulte en une dissociation de eIF4E, un facteur régulateur de la traduction et un inhibiteur de l'apoptose; suite à l'enlèvement de l'effet inhibiteur de 4EBP1, il y a initiation de la traduction. IR et DOX diminuent la phosphorylation de mTOR et par suite de 4EBP1, ce qui augmente la mort des cellules cardiaques; alors que le safran inverse ce phénomène. Ainsi, le safran inhibe l'apoptose induite par DOX et IR via la voie de signalisation AKT/mTOR/4EBP1.

De plus, un mécanisme important utilisé par les cardiomyocytes pour contrôler leur prolifération est l'activité de la protéine pro-apoptotique P38 MAPK. Il a été montré que l'activation de P38 induit la sortie du cycle cellulaire et l'hypertrophie des cardiomyocytes. La taille de l'infarctus est réduite en présence d'inhibiteur de P38 MAPK, ce qui a souligné l'effet cardioprotecteur de l'inhibition de p38 MAPK (Liang & Molkentin 2003). Nos résultats ont montré une augmentation de la phosphorylation et activation de P38 suite à l'IR et la DOX comparativement au groupe témoin, ce qui pourrait être en partie responsable de l'induction de l'apoptose des cellules cardiaques. Cette activation de p38 est atténuée dans les tissus cardiaques ayant subi un traitement par le safran à la reperfusion avec ou sans DOX. Ainsi, après traitement au safran, il y a perte de la phosphorylation de P38, ce qui pourrait être en partie responsable de l'activation de la prolifération cellulaire et la diminution de l'apoptose des cellules cardiaques. Par suite, le safran administré à la reperfusion pourrait avoir un rôle cardioprotecteur anti-apoptotique en sous exprimant P38 suite à des périodes d'IR et de DOX dans les cœurs isolés de lapin.

D'autre part, la troponine régule la formation de l'actine-myosine pendant le processus de contraction-relaxation du cœur. La diminution de la troponine cardiaque est un marqueur sensible et spécifique des lésions du myocarde. La perte des troponines I et T est considéré comme l'une des principales causes de la diminution des fonctions contractiles cardiaques induite par la doxorubicine (Wallace et al., 2004). Nos résultats montrent une perte de la troponine T cardiaque suite à IR et DOX. Par contre, le safran à la reperfusion inhibe la diminution de cTnT qui va être conservée proche de la normale. Ainsi, le safran pourrait protéger les fonctions cardiaques en maintenant le niveau d'expression de la troponine T suite à IR et DOX.

Enfin, on a trouvé que la troponine T ainsi que PI3K/AKT/mTOR/4EBP1 et P38MAPK sont des voies de signalisation qui semblent jouer un rôle important dans la physiopathologie et les lésions cardiaques de l'IR et de la DOX. Elles sont essentiellement régulées par le safran pour inhiber l'apoptose induite par ces deux traitements dans les cœurs isolés de lapin. Les résultats montrent que le safran atténue la voie P38 MAPK, active la voie PI3K/AKT et préserve la troponine T pour maintenir le fonctionnement cardiaque; son rôle cardioprotecteur est donc, au moins en partie, lié à ces effets au niveau moléculaire.

Ainsi, ceci nous mène à penser que l'activation de la voie AKT/mTOR/4EBP1 qui régule la traduction, pourrait expliquer le maintien de la traduction de cTnT et par suite la préservation de son niveau d'expression après traitement par le safran durant la reperfusion. D'autre part, l'effet protecteur anti-apoptotique du safran pourrait provenir de son action anti-oxydante piègeur de RLO suite au stress oxydatif généré par IR et DOX dans les cœurs isolés de lapins.

On peut se demander si le safran peut être administré à la fois comme agent anticancéreux et cardioprotecteur. Ceci est une question de dose; à la concentration que nous avons utilisé, c'est un agent cardioprotecteur alors qu'à des concentrations plus élevées le safran possède une activité anticancéreuse (Dickey et al., 2013; Samarghandian et al., 2014). Dans le contexte de la découverte de thérapies qui offriraient une cardioprotection sans affecter les effets anti-tumoraux, le safran peut servir en tant que complément lors de la chimiothérapie par la doxorubicine en réduisant sa toxicité sur le myocarde.

En conclusion, ces résultats suggèrent que les extraits méthanoliques de safran Libanais préviennent la toxicité induite par la doxorubicine lors de l'ischémie-reperfusion myocardique en stimulant l'activité antioxydante endogène et en tant que piègeur de radicaux libres. D'autres études sont nécessaires pour élucider le mécanisme cellulaire de l'action du safran et de ses applications cliniques.



3.4. Effet du safran contre la cardiotoxicité chronique de la doxorubicine sur le cœur isolé de lapin en condition ischémique

3.4.1. Observation des animaux

Dans nos conditions expérimentales, le traitement par la DOX seule (une dose IP unique de 2.5 mg/kg de poids) par semaine pendant 4 semaines a provoqué une mortalité de 4 lapins sur 12 ainsi que d'autres symptômes pathologiques (tableau 9). Le prétraitement par voie orale avec une dose optimale d'extraits de SAF (5 mg/kg de poids/j) pendant 6 semaines a donné une nette diminution de cette mortalité (1 sur 10) et une diminution de la gravité des symptômes. Aucune mortalité ou symptômes n'ont été observés dans le groupe témoin ou celui traité par le SAF.

Tableau 9. Effet du safran (SAF) sur les modifications induites par la doxorubicine (DOX) en ce qui concerne la mortalité prématurée, le poids corporel avant et après traitement et les symptômes pathologiques (ascites, diarrhée, léthargie, épistaxis).

Paramètres	n	Mort prématurée	Poids avant (kg)	Poids après (kg)	Ascites	Diarrhée	Léthargie	Épistaxis
Control	10	0	1.9±0.1	2.1±0.1	0/10	0/10	0/10	0/10
SAF	10	0	2.0±0.1	2.1±0.1	0/10	0/10	0/10	0/10
DOX	12	4	2.1±0.1	1.8±0.1	4/12	5/12	12/12	4/12
SAF + DOX	10	1	2.0±0.1	2.0±0.1	1/10	2/10	5/10	1/10

3.4.2. Paramètres cardiodynamiques

Une semaine après la fin du traitement, les lapins survivants ont été sacrifiés et leurs cœurs isolés et perfusés selon le modèle de Langendorff et soumis à 30 min d'ischémie globale suivie de 30 min de reperfusion. Tous les cœurs ont survécus jusqu'à la fin du protocole sans mortalité.

Les figures 62 et 63 rapportent les valeurs de la pression ventriculaire gauche (LVP), la pression ventriculaire télédiastolique (LVEDP), la fréquence cardiaque (HR) et le débit coronaire (CF). Ainsi, il apparaît clair que les cœurs non traités soumis à la reperfusion post-ischémique récupèrent leur force contractile à environ 70 % à la 30^{ème} minute. Les cœurs provenant de

lapins traités par la DOX ne sont capables de récupérer leur contractilité que de 50 % suite à l'ischémie-reperfusion (I 30 min/R 30 min). Les cœurs provenant de lapins prétraités par le SAF récupèrent à presque 100 %; alors que ceux ayant reçu la DOX et le SAF arrivent à récupérer mais sans jamais atteindre les valeurs pré-ischémiques. Ceci est aussi valable pour HR et CF qui présentent grosso modo le même profil. Concernant la LVEDP, elle augmente suite à l'IR et encore d'avantage lorsque les cœurs proviennent de lapins traités par la DOX. Le prétraitement par le SAF limite significativement cette augmentation, mais à un degré moindre en présence de DOX.

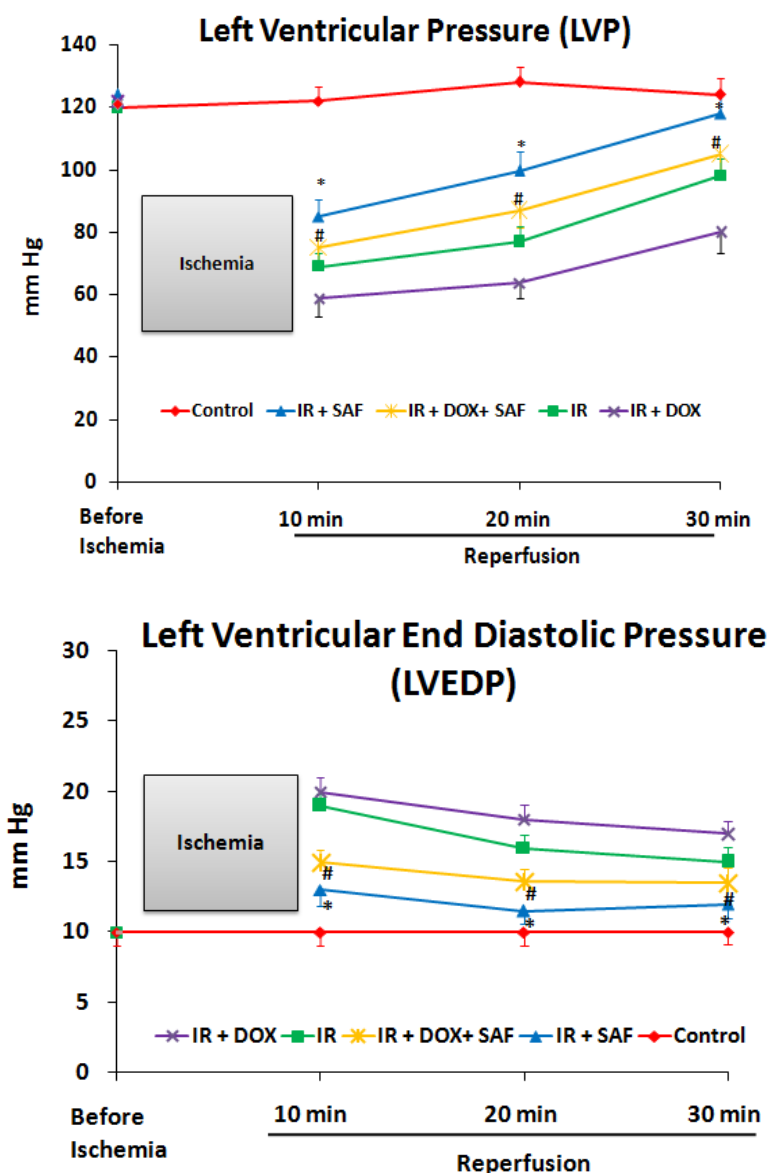


Figure 62. Changements des paramètres cardiodynamique LVP et LVEDP en réponse à l'ischémie-reperfusion (IR) suite à différents traitements. DOX: doxorubicine; SAF: safran; LVP: pression ventriculaire gauche; LVEDP: pression télédiastolique. * $p < 0.05$ vs IR; # $p < 0.05$ vs IR+DOX (n=6).

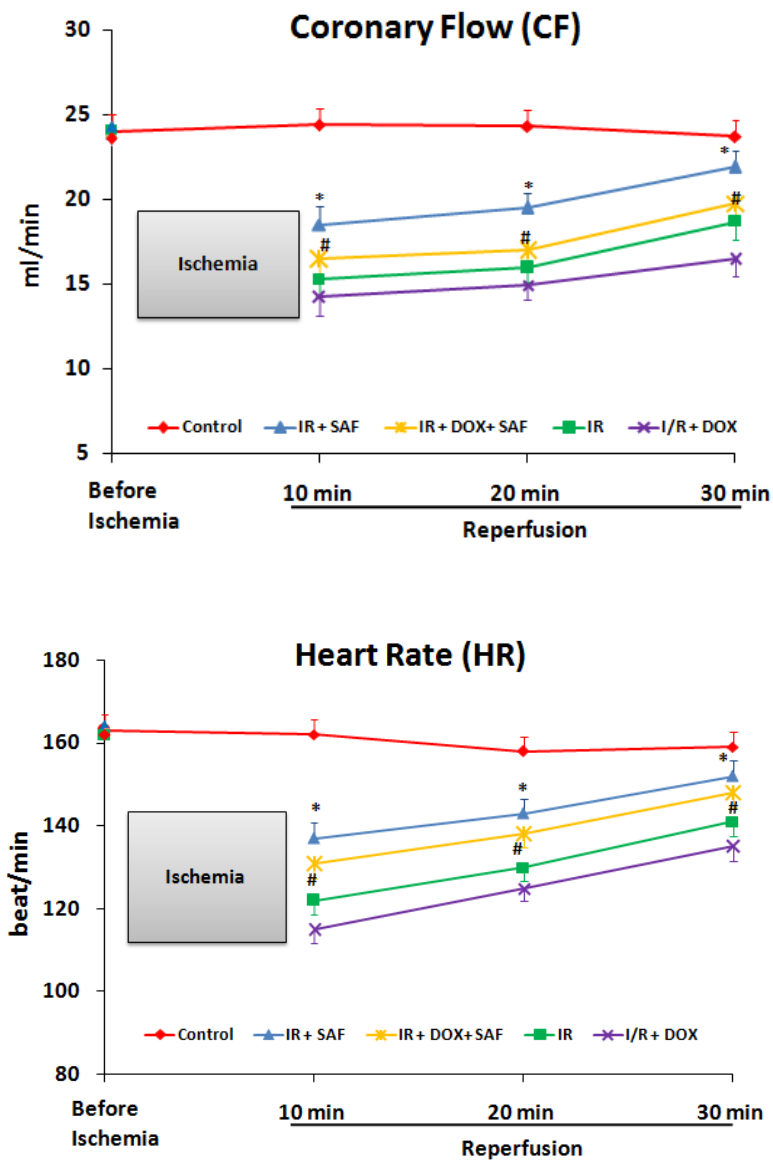


Figure 63. Changements des paramètres cardiodynamique CF et HR en réponse à l'ischémie-reperfusion (IR) suite à différents traitements. DOX: doxorubicine; SAF: safran; CF: débit coronaire; HR: rythme cardiaque. * $p < 0.05$ vs IR; # $p < 0.05$ vs IR+DOX (n=6).

3.4.3. Paramètres électro-physiologiques

Les cœurs provenant du groupe témoin n'ont pratiquement pas présenté d'arythmies notables. A la reperfusion, suite à une ischémie globale de 30 min, une période de tachycardie ventriculaire (VT) s'installe qui peut durer de quelques secondes à une minute, continue ou entrecoupée et ceci pour tous les cœurs non traités. Cette période est remplacée ensuite par des contractions

ventriculaires prématurées (PVC) fréquentes. Pour les cœurs provenant de lapins ayant reçu la DOX, la période de VT est toujours présente sans modification notable par rapport aux cœurs précédents. Par contre, l'incidence des PVC augmente significativement. Les VT et les PVC s'atténuent nettement dans les cœurs provenant de lapins ayant reçu quotidiennement du safran pendant 6 semaines et soumis à l'ischémie-reperfusion. Toutefois, les cœurs provenant de lapins traités avec DOX et SAF montrent une diminution, mais elle est moins prononcée que le groupe précédent (tableau 10).

Tableau 10. Le nombre d'extrasystoles PVC (premature ventricular contractions) et les pourcentages de tachycardie et fibrillation ventriculaire (VT/VF) des cœurs témoins et des cœurs soumis à l'ischémie-reperfusion (IR) suite au traitement à la doxorubicine (DOX) avec ou sans extraits de safran (SAF) 5 mg/kg. *p <0.05 par rapport au Control; #p <0.05 par rapport à IR (n=6).

Control	IR	IR + SAF	IR + DOX	IR + DOX + SAF
PVC (n)				
4±2	51±8*	18±4*#	89±14*#	47±10*
VT/VF (%)				
0	100*	40*#	100*	60*#

3.4.4. Paramètres biochimiques

La figure 64 montre que la MDA, marqueur de la peroxydation lipidique, augmente alors que la glutathion peroxydase diminue dans les cœurs de lapins non traités et soumis à la reperfusion suite à une ischémie globale de 30 minutes, par rapport au témoin. Pour les cœurs provenant de lapins ayant reçu la DOX, les valeurs de la MDA augmentent encore plus et la glutathion diminue d'avantage par rapport aux cœurs précédents. Les niveaux de la MDA et de la glutathion se rapprochent de ceux des témoins dans les cœurs provenant de lapins ayant reçu du safran et soumis à l'ischémie-reperfusion. Ces valeurs s'améliorent dans les cœurs provenant de lapins traités avec DOX et SAF, mais se rapprochent moins que le groupe précédent des valeurs des témoins.

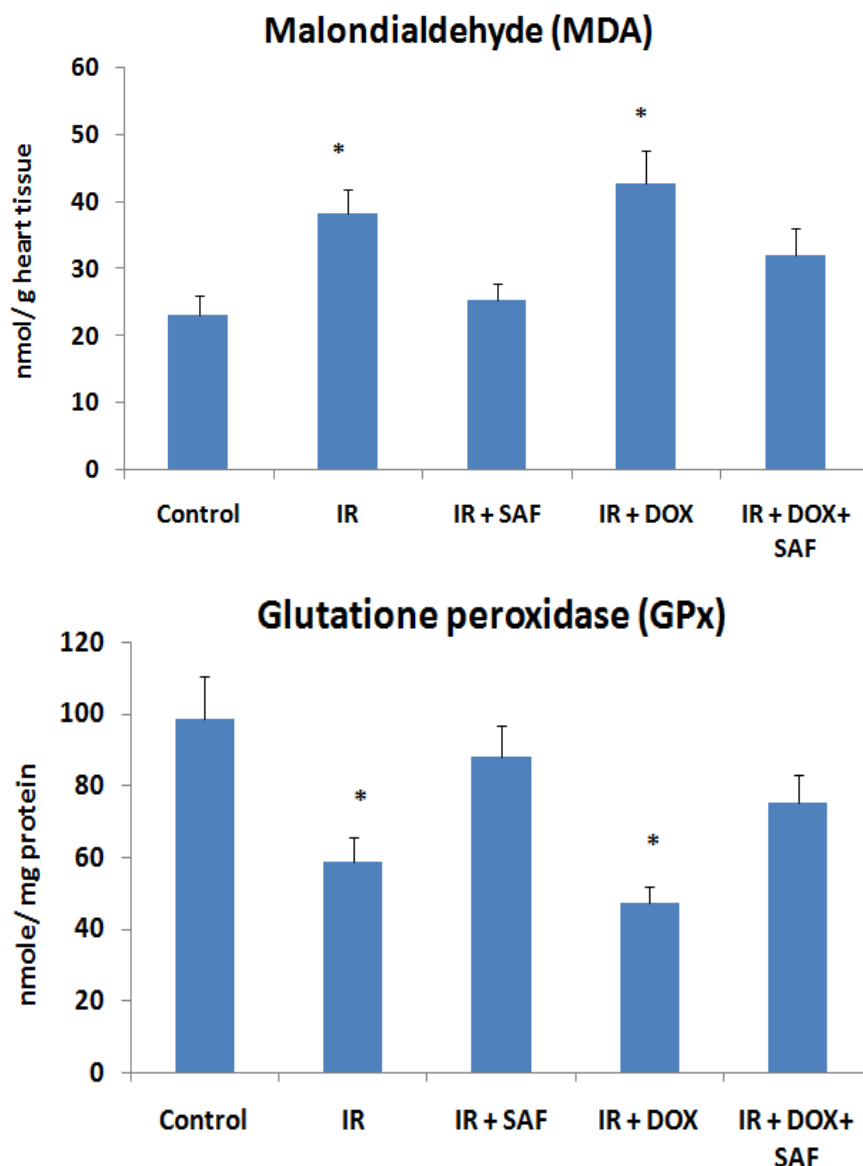


Figure 64. Variation des taux de malondialdéhyde (MDA) comme indicateur de la peroxydation lipidique et de l'activité de la glutathionne peroxydase dans les tissus des cœurs témoins (control) et des cœurs soumis à une ischémie-reperfusion (IR) sans traitement préalable des lapins et suite à un traitement avec la doxorubicine (DOX) en présence ou en absence de safran (SAF) 5 mg/kg. * $p < 0.05$ par rapport aux cœurs témoins ($n=6$).

3.4.5. Taille de la zone ischémique

La taille de la zone ischémique a été évaluée suite à 30 min d'ischémie globale suivie de 30 min de reperfusion. Les zones qui sont colorées en rouge vif sont celles qui sont non ischémiques alors que les zones colorées en rouge pâle sont celles qui ont subi l'ischémie. Les résultats

illustrés à la figure 65 ont permis de mettre en évidence une réduction significative de la zone ischémisée des cœurs provenant de lapins ayant reçu le safran po pendant 6 semaines comparativement à ceux qui ont reçu une solution physiologique (IR). Les cœurs provenant de lapins traités par la DOX montrent une augmentation prononcée de la taille de la zone ischémique. Par contre, les cœurs provenant de lapins ayant reçu le safran avant et pendant le traitement par la DOX présentent une réduction de la zone ischémique.

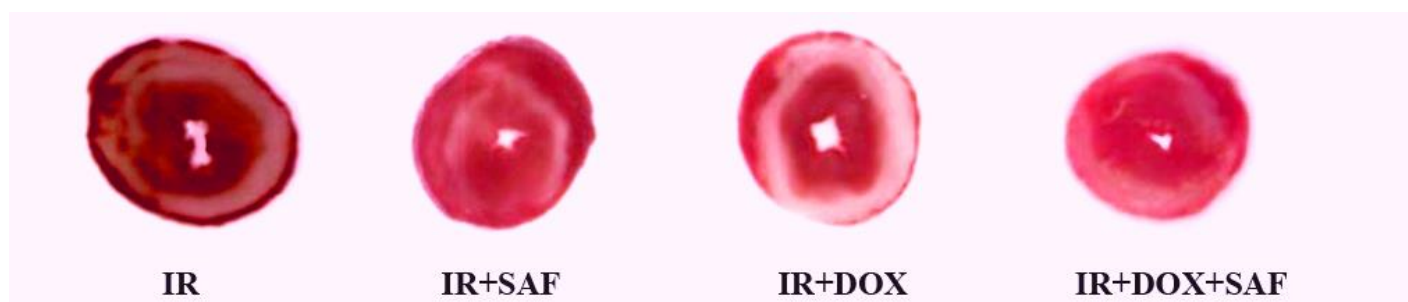


Figure 65. Effet du traitement par la doxorubicine (DOX) et le safran (SAF) chez les lapins sur la taille de l'infarctus myocardique des cœurs isolés après le protocole d'IR. Les zones de couleur rouge vif présentent les tissus cardiaques protégés (n=4).

3.4.6. Réduction du Nitroblue tetrazolium

Les RL produits sont capables de réduire le NBT qui se transforme en cristaux de formazan qui se déposent au niveau du myocarde. Ainsi, le traitement de certains cœurs par le NBT à la fin du protocole montre que ce dernier se transforme en cristaux de formazan de couleur violette visibles sur les coupes histologiques (figure 66). Ces cristaux qui se forment suite à la combinaison des RL avec le NBT en fin de reperfusion sont très nombreux dans le myocarde des lapins traités par la DOX (figure 66 B). Alors que les cœurs provenant de lapin ayant reçu du safran avant et pendant le traitement par la DOX montrent un dépôt moins important de formazan (figure 66 C).

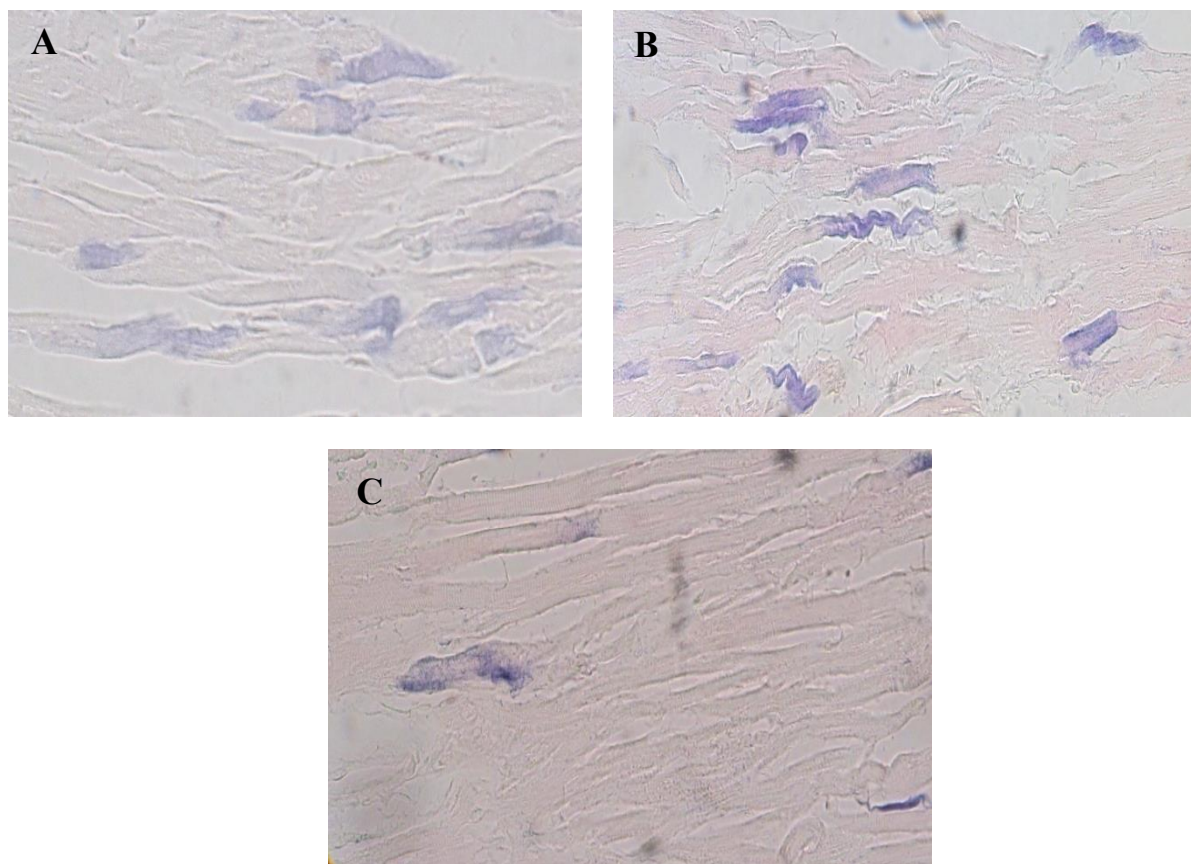


Figure 66. Coupes histologiques de cœurs de lapins colorées à l'hématoxyline-éosine et observées au microscope optique (x400). A : Cœurs soumis à l'ischémie-reperfusion IR + NBT (dépôts de formazan); B : Cœurs traités par DOX + IR + NBT (augmentation des dépôts de formazan); C : Cœurs traités par SAF + DOX + IR + NBT (diminution des dépôts de formazan) (n=4).

3.4.7. Discussion

Dans nos conditions expérimentales, le traitement par la DOX seule a provoqué une mortalité de 1/3 des lapins, alors que le prétraitement avec le safran a donné une nette diminution de cette mortalité (1/10). Par ailleurs, lors de la reperfusion, les cœurs de lapins ayant reçu le safran avant et pendant le traitement par la DOX montrent des paramètres cardiodynamiques significativement proches des cœurs témoins, ce qui n'est pas le cas des cœurs provenant de lapins traités par la DOX sans safran.

Le cœur de lapin perfusé selon la méthode de Langendorff est l'un des modèles les plus étudiés de la physiologie et la physiopathologie cardiaque. En effet, de nombreux types d'arythmies

observées cliniquement pourraient être reproduits dans le modèle du cœur de lapin. Il a été démontré que les ondes dans le cœur de lapin au cours des arythmies ventriculaires, sont très similaires à celles du cœur humain. Il a également été montré que les aspects critiques du couplage excitation-contraction du myocarde de lapin, tels que la contribution relative du réticulum sarcoplasmique, est très similaire à celui de l'homme (Lou et al., 2011).

Nous avons quantifié dans le myocarde d'une part la peroxydation lipidique et d'autre part l'activité glutathionne peroxydase (figure 64). La peroxydation lipidique est un indice couramment utilisé afin de démontrer les dommages d'un stress oxydatif, quoiqu'il soit critiqué par certains scientifiques, il reste toutefois valable s'il est conduit dans des conditions optimales. Ce test est basé sur la quantification de la malondialdéhyde (MDA), qui représente un métabolite final de la peroxydation lipidique. Nous avons retrouvé une augmentation de la peroxydation lipidique dans les cœurs soumis à l'ischémie-reperfusion et traités par la DOX. Par contre, le prétraitement par le safran est capable de la diminuer significativement. Sur le versant de la glutathion peroxydase, qui est l'enzyme clef dans la transformation des radicaux en produits moins toxiques, le même scénario se reproduit; dans le sens que cette activité baisse fortement dans le myocarde soumis à l'ischémie-reperfusion suite au traitement par la DOX, alors que le prétraitement par le safran est capable de contrecarrer significativement cette baisse. De plus, la génération de RLO a été détectée en utilisant le NBT qui, une fois réduit, il forme des dépôts de formazan. Les coupes histologiques montrent une augmentation des dépôts de formazan, donc du stress oxydatif dans les cœurs traités à la DOX et soumis à IR. Par contre, le prétraitement par le safran diminue significativement la formation de RLO (figure 66).

La détermination de l'étendue de la zone ischémique est aussi un moyen plausible pour quantifier le dommage du myocarde. D'après les coupes effectuées et traitées par le chlorure de triphenyltetrazolium qui indique le pourtour de la zone ischémique, il apparaît clairement que les cœurs provenant de lapins ayant reçus le safran avant et pendant l'administration de la DOX présentent des zones ischémiques moins étendues (fig 65).

La principale conclusion de ce travail est que le safran protège le cœur contre les dommages liés à l'ischémie-reperfusion et la doxorubicine dans un modèle de cœur isolé de lapin, et cet effet cardioprotecteur est, au moins en partie, lié fortement au pouvoir antioxydant du safran.

4. Effet du safran contre la cytotoxicité de la doxorubicine au niveau des cardiomyocytes H9c2 en condition ischémique

4.1. Effet du safran et de la doxorubicine sur la viabilité cellulaire

Les cardiomyocytes ont été incubés d'abord avec 1 à 100 $\mu\text{g/mL}$ de safran pendant 16 h, ensuite, avec 10 $\mu\text{g/mL}$ de safran pendant 2 à 24 h. Les pourcentages de viabilité cellulaires apparaissent dans la figure 67 (A) et (B) et montrent clairement que ces différents traitements n'ont aucun effet cytotoxique sur les cellules H9c2. Les concentrations allant de 10 à 100 $\mu\text{g/mL}$ pendant 16 h augmentent la viabilité cellulaire de 30% en moyenne. Ainsi, la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ de safran pendant 16 h a été sélectionnée.

La survie des cardiomyocytes a été évalué pour différentes concentrations de doxorubicine allant de 1 à 10 $\mu\text{mol/L}$ pour 3 h qui résulte par une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire. Les pourcentages de viabilité cellulaires sont présentés dans la figure 67 (C), les concentrations de 4, 8 et 10 $\mu\text{mol/L}$ de DOX pour 3 h sont nettement cytotoxiques. De plus, le traitement par 4 $\mu\text{mol/L}$ de DOX durant 1 à 24 h montre une diminution temps-dépendante de la viabilité cellulaire. En effet, une diminution de la survie des cardiomyocytes se manifeste de 3 à 24 h pour 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine comme présenté dans la figure 67 (D). 4 $\mu\text{mol/L}$ de DOX durant 3 h montre une viabilité cellulaire de 54 % par rapport au contrôle. Ainsi, la concentration de 4 $\mu\text{mol/L}$ de DOX durant 3 h a été sélectionnée.

Les cardiomyocytes ont été exposés à des concentrations de safran de 1 à 100 $\mu\text{g/mL}$ pendant 16 h et 4 $\mu\text{mol/L}$ de DOX pendant 3 h. Les résultats des tests MTT montrent une diminution significative de la viabilité cellulaire à 54 % avec DOX qui augmente pour atteindre un maximum à 85 % suite à un prétraitement avec 10 $\mu\text{g/mL}$ de safran par rapport au contrôle (100%). Cette augmentation est dose-dépendante et culmine à la dose de 10 $\mu\text{g/mL}$. De plus, 4 $\mu\text{mol/L}$ de DOX induisent une augmentation significative de la LDH à 145 % qui est inhibée pour se rapprocher de la normale et atteindre un minimum à 107 % suite à un prétraitement avec 10 $\mu\text{g/mL}$ de safran. Ces résultats montrent que le safran (10 $\mu\text{g/mL}$) peut diminuer la cytotoxicité induite par la doxorubicine (4 $\mu\text{mol/L}$) (figure 68).

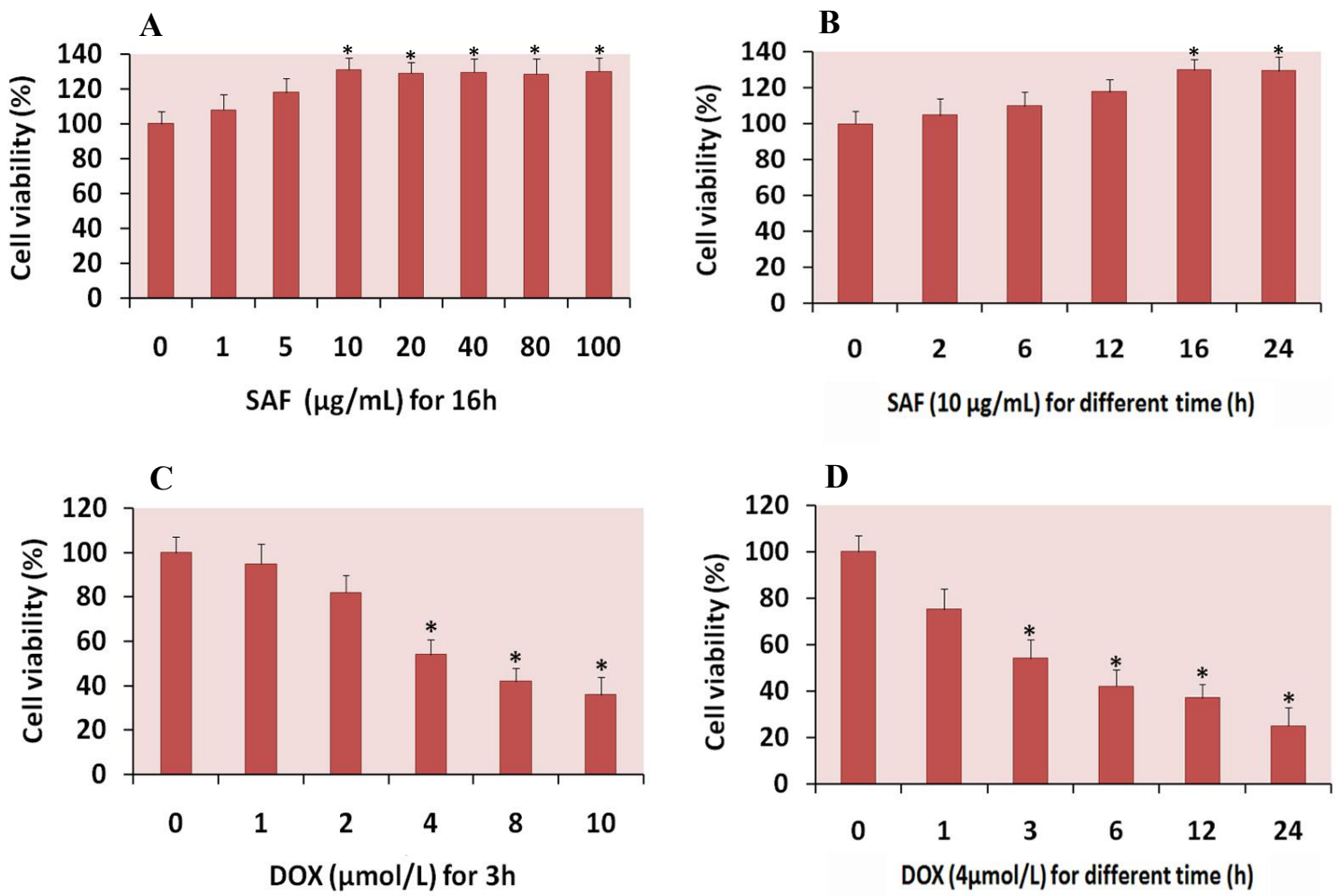


Figure 67. Viabilité cellulaire évaluée grâce à la technique MTT réalisée sur des cardiomyocytes H9c2 traités avec: A. 1 à 100 µg/mL de safran pendant 16 h. B. 10 µg/mL de safran pendant 2 à 24h. C. 1 à 10 µmol/L de doxorubicine pendant 3h et D. 4 µmol/L de doxorubicine pendant 1 à 24h. Les données représentent le pourcentage de cellules vivantes par rapport au contrôle à la fin des différents traitements. Les barres montrent la moyenne de trois essais $\pm$ écarts-types. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au témoin, * $p < 0,05$ vs 0.

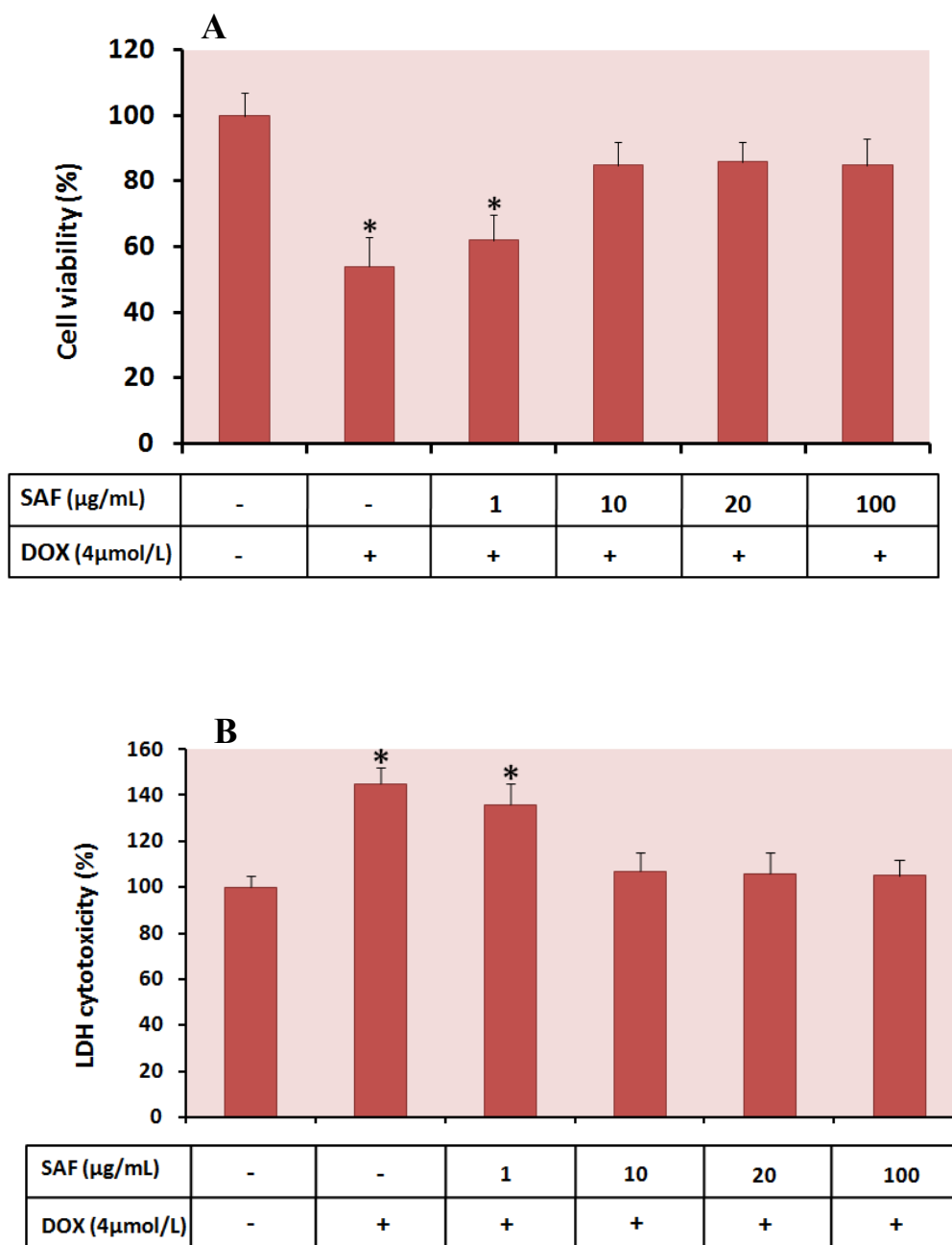


Figure 68. Effet du safran sur la cytotoxicité induite par la doxorubicine. Les cardiomyocytes H9c2 sont incubées avec la doxorubicine (4 µmol/L) pendant 3 h en présence ou absence de safran. Le traitement par le safran se fait à des concentrations allant de 1 à 100 µg/mL pendant 16 h. Le pourcentage des cellules viables a été évalué grâce au test MTT (A) et le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé par le dosage de la LDH (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle et représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences. Les astérisques indiquent une différence significative par rapport au contrôle sans traitement, * $p < 0.05$ vs contrôle.

4.2. Effet des extraits de safran et de l'ischémie/reperfusion simulée sur la viabilité cellulaire

La figure 69 (A) montre que 8 h d'anoxie suivit de 16 h de normoxie provoque une mort cellulaire de 50 % des cardiomyocytes par rapport au contrôle en normoxie. Ainsi, le cycle d'anoxie/normoxie pendant 8 h/16 h a été sélectionnée.

La figure 69 (B) représente le pourcentage de viabilité cellulaire pour plusieurs traitements. Les résultats montrent que la doxorubicine exacerbe les dommages causés par l'ischémie-reperfusion. En effet, une période d'IR (8 h/16 h) suivie par un traitement à la DOX (4 $\mu\text{mol/L}$, 3 h) durant la reperfusion provoque une diminution accrue de la viabilité cellulaire qui s'établit à 24 % (IR D) par rapport au contrôle. Plusieurs concentrations de safran (1, 10 et 100 $\mu\text{g/mL}$, 16 h) ont été testé avant l'ischémie ou à la reperfusion pour vérifier son effet protecteur sur la viabilité cellulaire. Utilisé en prétraitement, avant l'ischémie, le safran (1, 10 et 100 $\mu\text{g/mL}$, 16 h) ne semble pas protéger les cellules ni des dommages de l'IR, ni de ceux de l'IR et D ensemble. En effet, la viabilité des cellules ne varie pas et aucune différence significative n'est signalée (S IR et S IR D). Cependant, le safran (10 $\mu\text{g/mL}$, 16 h) utilisé à la reperfusion parait avoir un effet protecteur contre la cytotoxicité de l'IR et de la DOX. La viabilité des cellules a augmenté considérablement pour s'établir à 89 % pour les cellules soumises à IR et traitées par SAF (IR S), et 70 % pour les cellules soumises à IR et traitées par DOX et SAF (IR S D).

Les mêmes expériences ont été réalisées en dosant la LDH. Les résultats ont été confirmés; le safran inhibe la mort cellulaire induite par la DOX et l'IR. La figure 69 (C) montre que la doxorubicine exacerbe les dommages causés par l'ischémie-reperfusion; on remarque ainsi une augmentation de la LDH à 151 % suite à l'IR, à 145 % suite à DOX et à 192 % suite à l'IR et la DOX ensemble. Celle-ci est inhibée en présence de safran (10 $\mu\text{g/mL}$, 16 h) à la reperfusion qui protège les cardiomyocytes. En effet, la LDH diminue significativement jusqu'à 106 % suite à l'IR S et 140 % suite à l'IR S D.

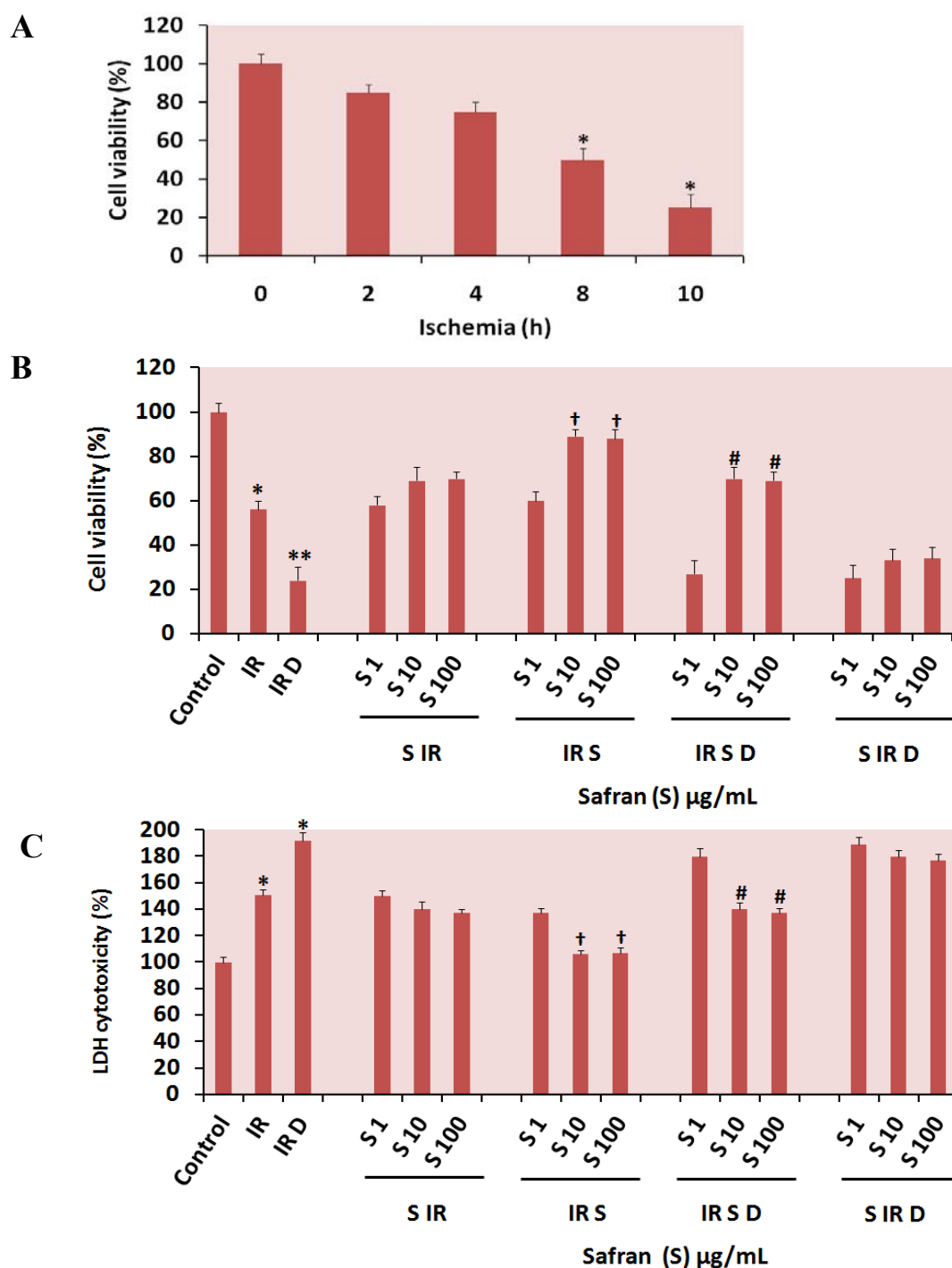


Figure 69. Effet du safran (S), de l'ischémie reperfusion (IR) et de la doxorubicine (D) sur les cellules H9c2. Le pourcentage de viabilité a été déterminé par le test MTT: A. Les cellules H9c2 ont été soumises à des périodes de 2 à 10 h d'ischémie suivit de 16 h de reperfusion. B. Les cardiomyocytes ont été traités en normoxie (contrôle); IR, pendant 8 h/16 h; D, 4 $\mu\text{mol/L}$ pendant 3 h; S, 1, 10 et 100 $\mu\text{g/mL}$ pendant 16 h. La doxorubicine a été ajoutée à la reperfusion. Le safran a été ajouté en prétraitement avant l'ischémie (S IR, S IR D) ou à la reperfusion (IR S, IR S D). C. Le pourcentage de cytotoxicité a été déterminé par le dosage de la LDH. Les résultats sont exprimés en pourcentage et représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences, * $p < 0.05$ vs control, † $p < 0.05$ vs IR, # $p < 0.05$ vs IR D.

4.3. Effet de la crocine et du safranal sur la viabilité des cellules H9c2 soumises à l'ischémie/reperfusion et traités par la doxorubicine

Les cardiomyocytes ont été incubés avec 1 à 100 µg/mL de crocine pendant 16 h. Les pourcentages de viabilité cellulaire apparaissent dans la figure 70 (A) et montrent clairement que ces différents traitements n'ont aucun effet cytotoxique sur les cellules H9c2. Les concentrations allant de 10 à 100 µg/mL pendant 16 h augmentent la viabilité cellulaire d'une moyenne de 28 %. Pour détecter si la crocine peut prévenir la cytotoxicité de la DOX, on a examiné l'effet de plusieurs concentrations de crocine sur les cardiomyocytes traités à la DOX. Les résultats des tests MTT et dosage du LDH sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle à la figure 70 (B) et (C). Les cardiomyocytes ont été exposés à des concentrations de crocine de 1 à 100 µg/mL pendant 16 h et 4 µmol/L de DOX pendant 3 h. Les résultats montrent une diminution significative de la viabilité cellulaire de 54 % avec la DOX qui augmente pour atteindre un maximum de 84 % suite à un prétraitement avec 10 µg/mL de crocine par rapport au contrôle. De plus, 4 µmol/L de DOX induisent une augmentation significative de la LDH à 145 % qui est inhibée pour se rapprocher de la normale et atteindre un minimum à 111 % suite à un prétraitement avec 10 µg/mL de crocine. Ces résultats montrent que la crocine (10 µg/mL), un constituant essentiel du safran, peut diminuer la cytotoxicité induite par la DOX (4 µmol/L) sur les cardiomyocytes H9c2.

D'autre part, les cardiomyocytes ont été incubés avec 1 à 100 µg/mL de safranal, un autre constituant du safran, pendant 16 h. Les pourcentages de viabilité cellulaires apparaissent dans la figure 71 (A) et montrent que les concentrations allant de 1 à 20 µg/mL pendant 16 h n'ont aucun effet sur les cellules H9c2. Alors que la concentration de 100 µg/mL a un effet cytotoxique considérable et diminue la viabilité cellulaire qui atteint 60%. Pour détecter si le safranal peut prévenir la cytotoxicité de la doxorubicine, on a examiné l'effet de plusieurs concentrations de safranal sur les cardiomyocytes H9c2 traités à la doxorubicine. Les résultats des tests MTT et dosage du LDH sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle à la figure 71 (B) et (C). Les cardiomyocytes ont été exposés à des concentrations de safranal de 1 à 100 µg/mL pendant 16 h et 4 µmol/L de DOX pendant 3 h. Les résultats montrent une diminution significative de la viabilité cellulaire de 54 % avec la doxorubicine, ce taux n'est pas rétabli avec les différentes

concentrations de safranal. En effet, la viabilité des H9c2 ayant reçu la doxorubicine reste de 59 % suite à un prétraitement avec 10 µg/mL de safranal par rapport au contrôle. De plus, 4 µmol/L de doxorubicine induisent une augmentation significative de la LDH à 145 % qui n'est pas inhibée par toutes les concentrations de safranal. En effet, le taux de LDH reste de 139 % suite à un prétraitement avec 10 µg/mL de safranal. Ces résultats montrent que le safranal, un constituant essentiel du safran, est différent de la crocine, et n'a aucun effet sur la protection des cardiomyocytes H9c2 suite à la cytotoxicité induite par la DOX (4 µmol/L).

D'autre part, l'effet protecteur de la crocine et du safranal sur la cytotoxicité induite par la doxorubicine et l'ischémie/reperfusion sur les cardiomyocytes H9c2 a été évaluée. La figure 72 (A) représente le pourcentage de viabilité cellulaire pour plusieurs traitements. Une période d'IR (8 h/16 h) suivie par la DOX (4 µmol/L, 3 h) à la reperfusion provoque une diminution accrue de la viabilité cellulaire qui s'établit à 24 % par rapport au contrôle. Plusieurs concentrations de crocine (1, 10 et 100 µg/mL, 16 h) ont été testées avant l'ischémie ou à la reperfusion pour vérifier son effet protecteur sur la viabilité cellulaire. Utilisé en prétraitement, avant l'ischémie, la crocine (1, 10 et 100 µg/mL, 16 h) ne semble pas protéger les cellules ni des dommages de l'IR, ni de ceux de l'IR et DOX ensemble. En effet, la viabilité des cellules ne varie pas et aucune différence significative n'est signalée. Cependant, la crocine (10 µg/mL, 16 h) utilisé à la reperfusion paraît avoir un effet protecteur contre la cytotoxicité de l'IR et de la DOX. La viabilité des cellules a augmenté considérablement pour s'établir à 85 % pour les cellules soumises à l'IR et traités avec la crocine (IR Cr), et 72 % pour les cellules soumises à IR et traités avec la DOX et la crocine (IR Cr D). Ainsi, dans nos conditions, la crocine utilisé à la reperfusion inhibe la cytotoxicité de la doxorubicine et de l'ischémie/reperfusion en augmentant la survie des cardiomyocytes.

Le même protocole a été utilisé avec plusieurs concentrations de safranal (1, 10 et 100 µg/mL, 16h). La figure 72 (B) montre qu'il n'y a pas augmentation du taux de la viabilité cellulaire suite aux différents traitements par le safranal. Ainsi, le safranal, pour les différents protocoles et les différentes concentrations utilisés ne confère aucune protection contre les dommages de la doxorubicine et de l'ischémie/reperfusion.

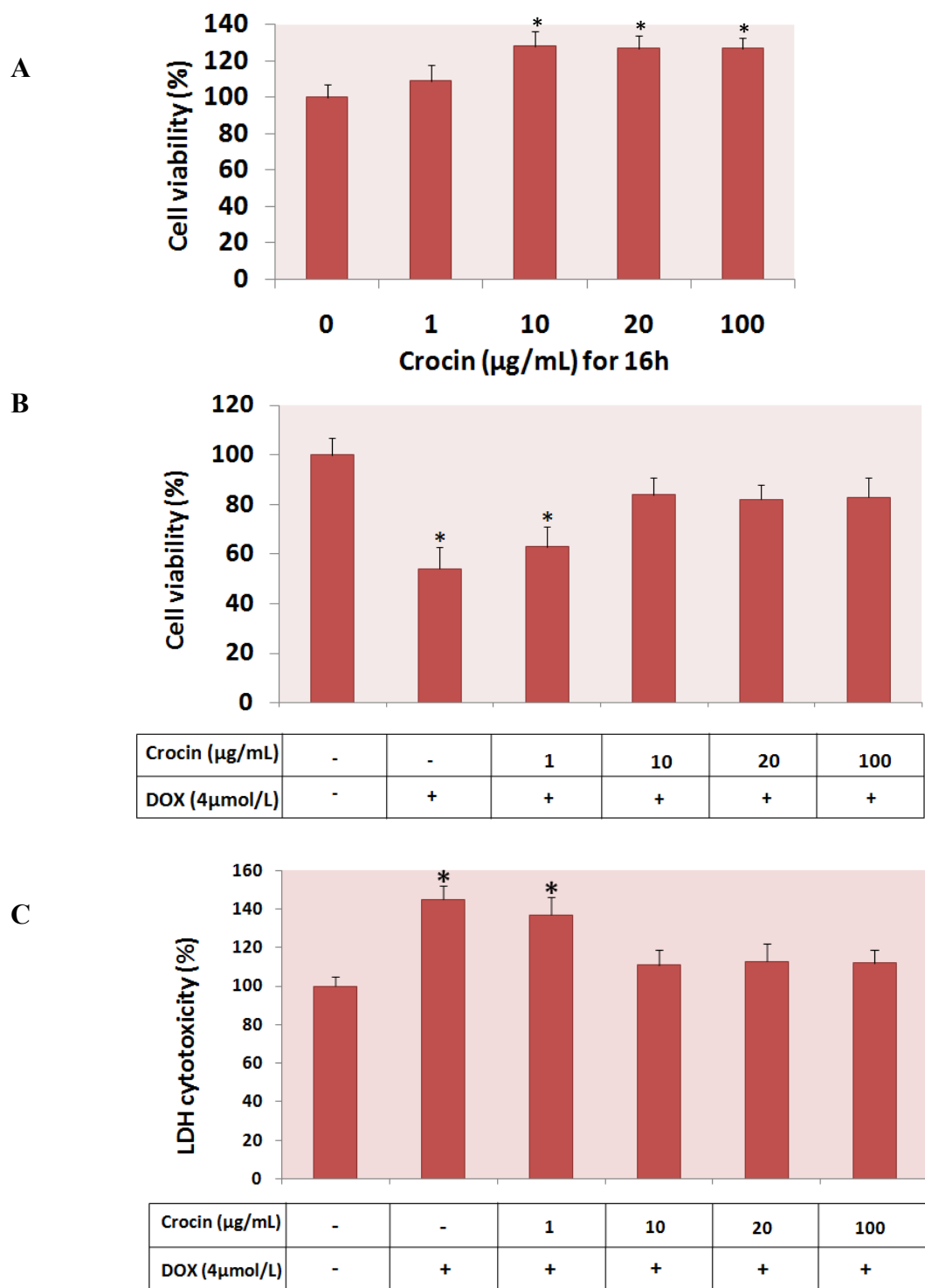


Figure 70. Effet de la crocine sur les cellules H9c2. A. Test de MTT, les cardiomyocytes H9c2 sont traités avec 1 à 100 µg/mL de crocine pendant 16 h. B. Test de MTT, les cardiomyocytes sont traités avec 1 à 100 µg/mL de crocine pendant 16 h et 4 µmol/L de doxorubicine (DOX) pendant 3h. C. Test de LDH, les cardiomyocytes sont traités avec 1 à 100 µg/mL de crocine pendant 16 h et 4 µmol/L de doxorubicine pendant 3h. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle sans traitement et représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences, * $p < 0.05$ vs contrôle.

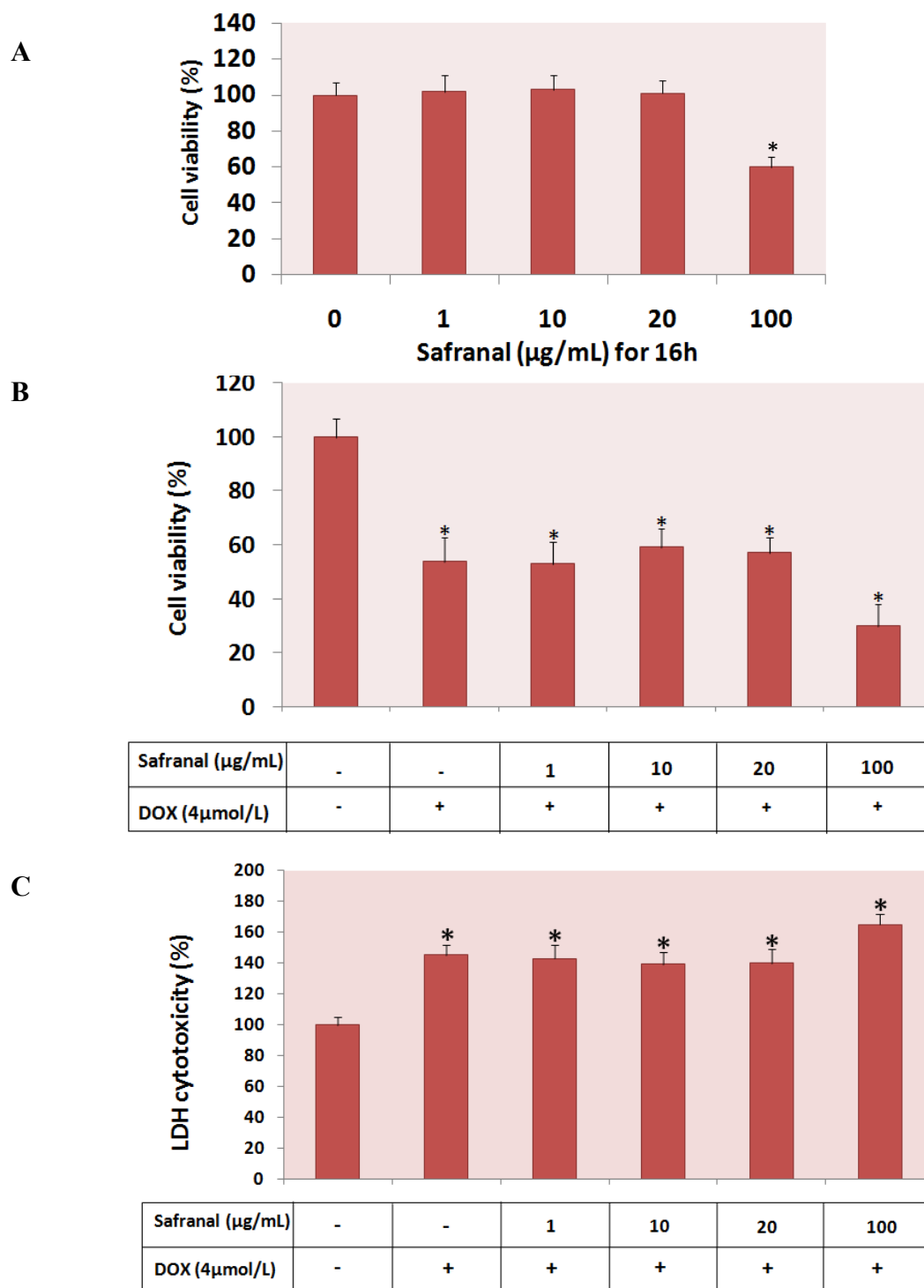
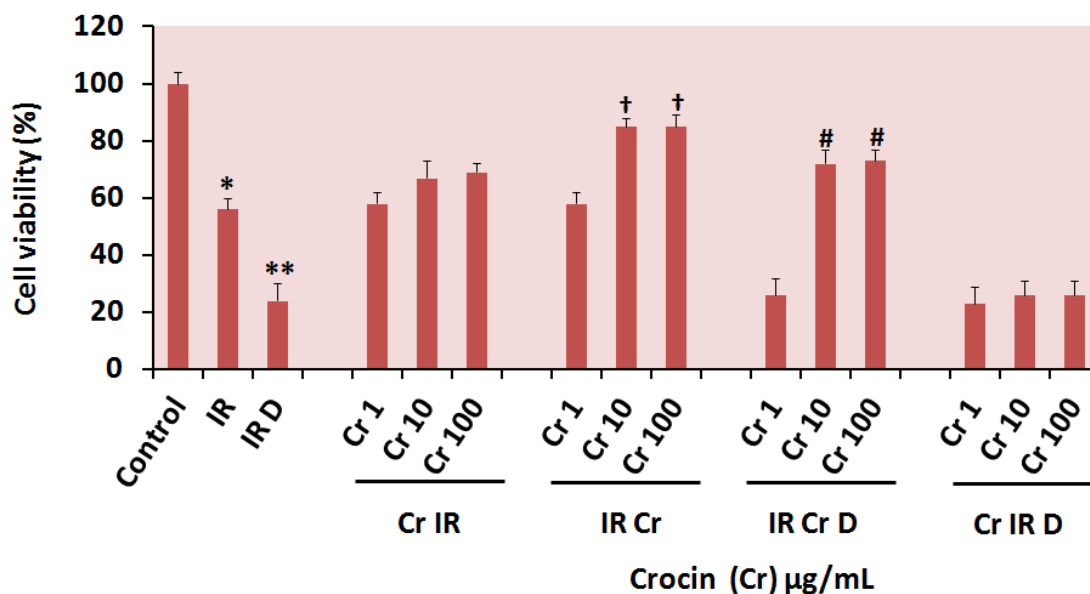


Figure 71. Effet du safranal sur les cellules H9c2. A. Test de MTT, les cardiomyocytes H9c2 sont traités avec 1 à 100 µg/mL de safranal pendant 16 h. B. Test de MTT, les cardiomyocytes sont traités avec 1 à 100 µg/mL de safranal pendant 16 h et 4 µmol/L de doxorubicine (DOX) pendant 3 h. C. Test de LDH, les cardiomyocytes sont traités avec 1 à 100 µg/mL de safranal pendant 16 h et 4 µmol/L de doxorubicine pendant 3h. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle sans traitement et représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences, * $p < 0.05$ vs contrôle.

A



B

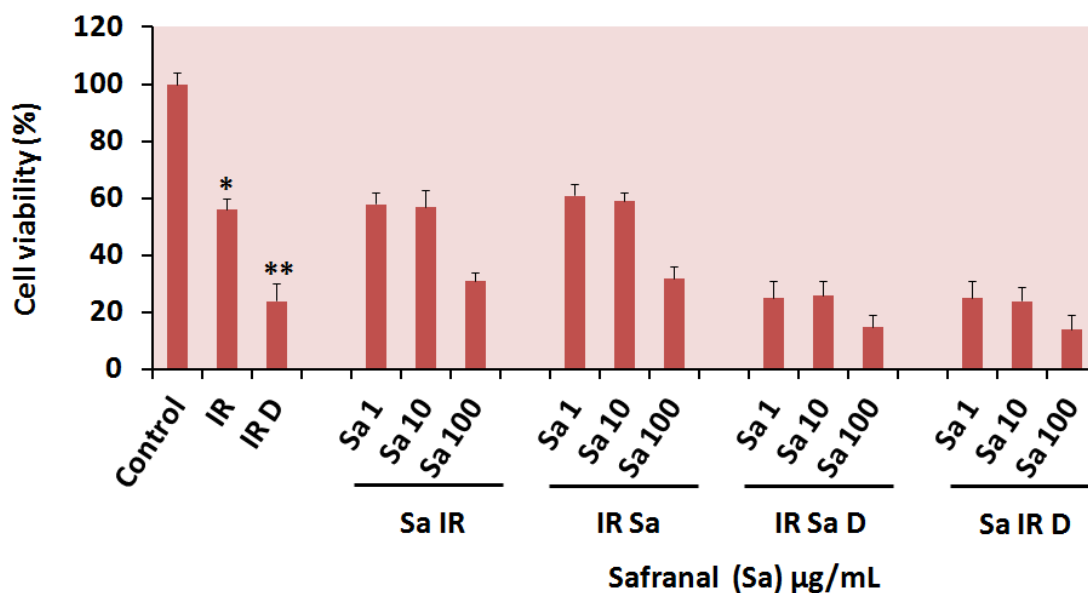


Figure 72. Effet de la crocine (Cr) et du safranal (Sa) sur la survie des cellules H9c2 soumises à l'ischémie/reperfusion et à la doxorubicine. Le pourcentage des cellules viables a été déterminé par le test MTT. A. Les cardiomyocytes sont traités en normoxie (contrôle); IR, ischémie/reperfusion pendant 8 h/16 h; D, doxorubicine, 4 μ mol/L pendant 3 h; Cr, crocine, 1, 10 et 100 μ g/mL pendant 16 h. La doxorubicine a été ajoutée à la reperfusion. La crocine a été ajoutée en prétraitement avant l'ischémie (Cr IR, Cr IR D) ou à la reperfusion (IR Cr, IR Cr D). B. Les cardiomyocytes sont traités en normoxie (contrôle); IR, pendant 8 h/16 h; D, 4 μ mol/L pendant 3 h; Sa, safranal, 1, 10 et 100 μ g/mL pendant 16 h. La doxorubicine a été ajoutée à la reperfusion. Le safranal a été ajouté en prétraitement avant l'ischémie (Sa IR, Sa IR D) ou à la reperfusion (IR Sa, IR Sa D). Les résultats sont exprimés en pourcentage et représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences, * p <0.05 vs control, † p <0.05 vs IR, # p <0.05 vs IR D.

4.4. Effet du safran sur les voies de signalisation suite à une ischémie/reperfusion et un traitement par la doxorubicine au niveau des cardiomyocytes H9c2

4.4.1. Activation des voies de signalisation AKT/P70S6K et ERK 1/2 par le safran dans les cardiomyocytes H9c2 soumis à l'ischémie/reperfusion et traités par la doxorubicine

Parallèlement aux expériences de prolifération, nous avons étudié l'activation des voies AKT/P70S6K et ERK 1/2 par le safran. P70S6K étant une kinase en aval de AKT. Ainsi, les cardiomyocytes H9c2 ont été d'abord traités en normoxie (contrôle) puis exposés au safran, à la doxorubicine et à l'ischémie/reperfusion de la façon suivante:

- 1- Contrôle: cardiomyocytes n'ayant pas subi de traitement.
- 2- IR: cardiomyocytes soumis à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h.
- 3- DOX (D): cardiomyocytes traités par la dose optimale de doxorubicine 4 $\mu\text{mol/L}$ pendant 3 h.
- 4- SAF + DOX (S D): cardiomyocytes traités par la dose optimale de safran 10 $\mu\text{g/mL}$ pendant 16 h et 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine pendant 3 h.
- 5- IR + DOX (IR D): cardiomyocytes soumis à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h en présence de 4 $\mu\text{mol/L}$ doxorubicine durant 3 h à la reperfusion.
- 6- IR + SAF + DOX (IR S D): cardiomyocytes soumis à une hypoxie de 8 h suivi d'une réoxygénation de 16 h en présence concomitante de 10 $\mu\text{g/mL}$ de safran durant 16 h et 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine durant 3 h à la reperfusion (dose et durée optimale).

Comme est illustré dans la figure 73, les résultats du western blot montrent que l'IR (8h/16h) ou la DOX (4 $\mu\text{mol/L}$) diminuent la phosphorylation de AKT, P70S6K et ERK1/2 par rapport au contrôle. Cette phosphorylation diminue d'avantage lorsque les cardiomyocytes H9c2 sont soumis à l'ischémie/reperfusion (8 h/16 h) et traités par la doxorubicine (4 $\mu\text{mol/L}$) ensemble (IR D). Suite au traitement par le safran (10 $\mu\text{g/mL}$) avec la doxorubicine (S D), et de même suite au traitement par le safran (10 $\mu\text{g/mL}$) et la doxorubicine (4 $\mu\text{mol/L}$) durant la reperfusion (IR S D), nous observons une augmentation significative de la phosphorylation de AKT sur le résidu Ser473, de P70S6K sur le résidu Thr389 et de ERK 1/2 sur les résidus Thr202 et Tyr204 en comparaison avec les groupes (D) et (IR D) respectivement. Les quantités totales de AKT, P70S6K et ERK 1/2 restent stable.

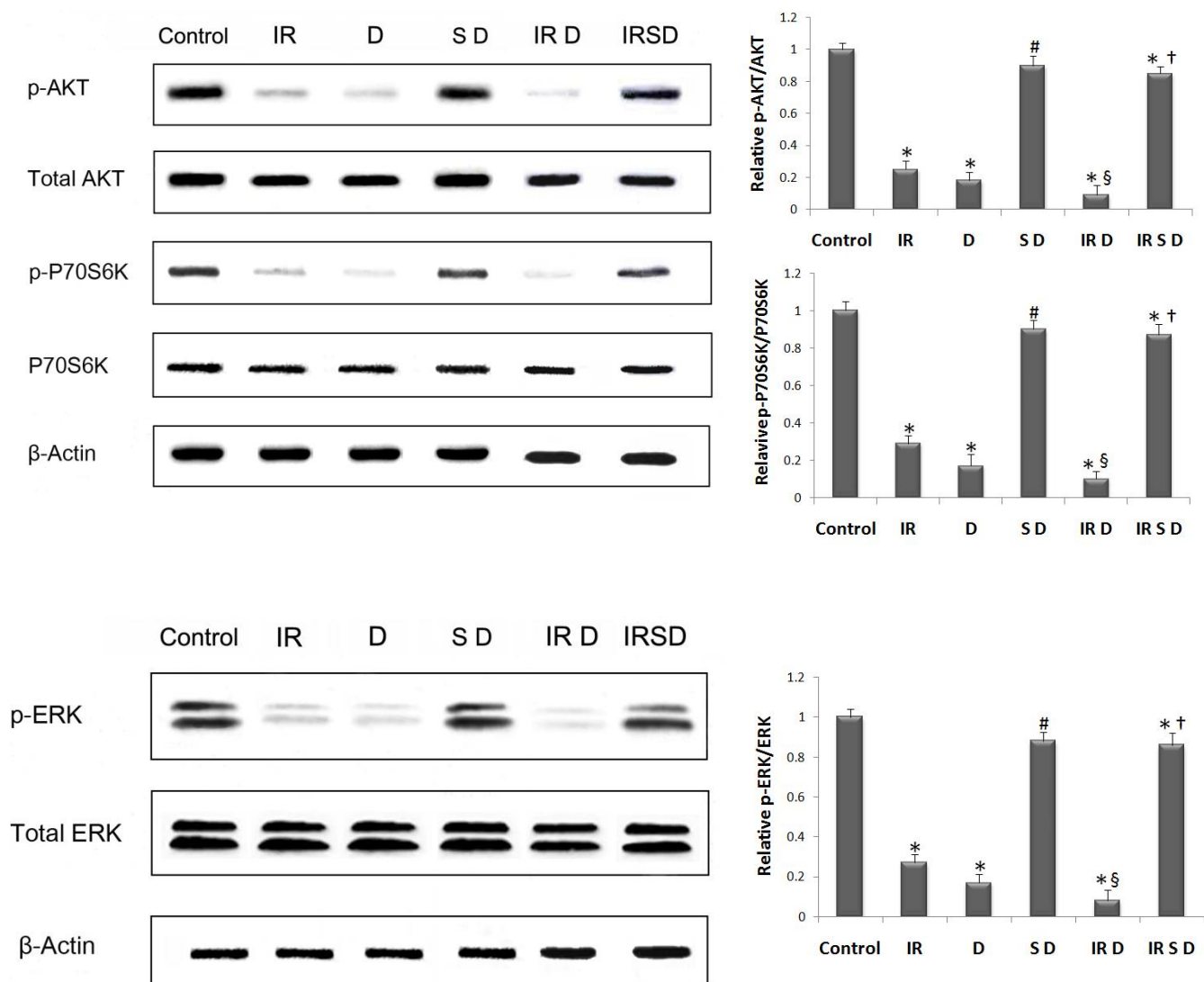


Figure 73. Western blot représentatif de la phosphorylation de AKT Ser473, P70S6K Thr389 et ERK 1/2 Thr202 et Tyr204 dans les cardiomyocytes H9c2.

- cellules non traitées (Control);
- cellules soumises à: Ischémie/Reperfusion (IR) 8 h/16 h
- cellules traitées avec: Doxorubicine (D) 4 $\mu\text{mol/L}$, 3h;
- cellules traitées avec: Safran (S) 10 $\mu\text{g/mL}$, 16 h et D 4 $\mu\text{mol/L}$, 3 h;
- cellules soumises à: IR 8 h/16 h, et D 4 $\mu\text{mol/L}$, 3 h;
- cellules soumises à: IR 8 h/16 h, S 10 $\mu\text{g/mL}$, 16h et D 4 $\mu\text{mol/L}$, 3 h.

Les western blots anti-AKT, anti-P70S6K, anti-ERK 1/2 totales et anti- β -Actin ont été réalisés comme contrôle de la quantité de protéines déposées. La quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie est effectuée à l'aide du logiciel Image j. Les données sont exprimées en quantité de protéines AKT, P70S6K et ERK 1/2 phosphorylées rapportées à la quantité de protéines AKT, P70S6K et ERK 1/2 totales. Les résultats exprimés représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences, * $p < 0.05$ vs. control. # $p < 0.05$ vs D, † $p < 0.05$ vs IR D, § $p < 0.05$ vs IR.

4.4.2. Augmentation de l'expression des protéines α -Actinine, Troponine C et MLC suite au traitement par le safran et la doxorubicine dans les cardiomyocytes H9c2 soumis à l'ischémie/reperfusion

Nous avons étudié le profil d'expression des protéines contractiles α -Actinine, Troponine C et MLC qui jouent un rôle fondamental dans les mécanismes de la contraction des cardiomyocytes. La figure 74 montre les résultats du western blot; on remarque bien que le traitement par l'IR (8h/16h) ou la DOX (4 μ mol/L) diminue l'expression de α -Actinine, Troponine C et MLC par rapport au control. Ce niveau d'expression diminue d'avantage lorsque les cardiomyocytes H9c2 sont soumis à l'ischémie/reperfusion (8 h/16 h) et traités par la doxorubicine (4 μ mol/L) ensemble (IR D). Suite au prétraitement par le safran (10 μ g/mL) avec la doxorubicine (S D), et de même suite au traitement par le safran (10 μ g/mL) et la doxorubicine (4 μ mol/L) durant la reperfusion (IR S D), nous observons une augmentation significative du profil d'expression de α -Actinine, Troponine C et MLC en comparaison avec les groupes (D) et (IR D) respectivement.

4.5. Effet du safran contre l'apoptose induite par la doxorubicine au niveau des cardiomyocytes H9c2 en condition ischémique

4.5.1. Effet du safran sur le potentiel de membrane mitochondrial

L'étude du potentiel de membrane mitochondriale a été effectuée par le TMRM, un marqueur fluorescent. La figure 75 montre chez le groupe control sans traitement (a), une surface de fluorescence élevée et un potentiel de membrane normal; en comparaison avec le groupe ayant subi l'ischémie/reperfusion (8 h/16 h) (b) et le groupe ayant reçu la doxorubicine (3 h, 4 μ mol/L) (c), où on remarque une diminution accrue de la fluorescence, d'où une perte importante du potentiel de membrane et l'ouverture des mPTP qui mène vers l'apoptose. En revanche, lorsque les cellules ont été prétraités avec le safran (16 h, 10 μ g/mL) puis la doxorubicine (d), la fluorescence du TMRM augmente significativement pour rejoindre le profil obtenu chez le control. Les cardiomyocytes ont donc vu leur potentiel de membrane amélioré, nous constatons une protection contre les dommages induits par la doxorubicine.

D'autre part, lorsque les cardiomyocytes ont subi la période d'ischémie/reperfusion (8 h/16 h) puis la doxorubicine à la reperfusion (e), les images montrent une chute considérable et drastique

de la fluorescence du TMRM. La reperfusion a entraîné la diminution, voir la perte du potentiel de membrane mitochondrial, ce qui implique l'ouverture des mPTP et la mort des cellules. En revanche, les cellules traitées avec le safran et la doxorubicine simultanément à la reperfusion suite à la période d'ischémie (f), ont vu leur potentiel de membrane mitochondrial protégé des dommages induits par la reperfusion et la doxorubicine. En effet, après utilisation du safran à la reperfusion, nous remarquons une nette augmentation de la surface de fluorescence du TMRM; les cellules sont donc repolarisées.

4.5.2. Effet du safran sur la condensation de la chromatine

Le marquage au Hoechst 33258 indique que l'IR et la DOX induisent la condensation de la chromatine des cellules H9c2. En effet, la figure 75 montre que l'IR (8 h/16 h) (h) ou l'exposition à la DOX (3 h, 4 $\mu\text{mol/L}$) (i) résulte en une augmentation des cellules apoptotiques qui apparaît par une coloration bleue intensément lumineuse comparativement au témoin (g). Des taux d'apoptose plus importants ont été observés suite à une période d'IR (8 h/16 h) avec un traitement à la DOX (3 h, 4 $\mu\text{mol/L}$) lors de la reperfusion (k). En revanche, le traitement par le safran diminue les dommages de l'IR et de la DOX au niveau de la condensation de la chromatine et la dégradation du noyau. En effet, on remarque une diminution de la coloration bleue intense pour les cardiomyocytes ayant subi 10 $\mu\text{g/mL}$ de safran durant 16 h et 4 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicine durant 3 h (j). De même, une diminution de l'apoptose et une morphologie normale des noyaux est observée pour les cellules traitées au safran (10 $\mu\text{g/mL}$) et à la doxorubicine (4 $\mu\text{mol/L}$) durant la reperfusion (16 h) suite à la période d'ischémie (8 h) (l). La figure 75 (m-r) montre un double marquage avec TMRM et Hoechst 33342.

4.5.3. Effet du safran sur l'activité des caspases 3

L'activité des caspases 3 effectrices a été recherchée sur les cellules H9c2 traitées par SAF, DOX et soumis à l'IR par utilisation des inhibiteurs fluorescents des caspases activées. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

D'une part, la figure 76 A montre l'activité des caspases 3 dans les cellules H9c2 traités avec des concentrations de safran allant de 1 à 100 $\mu\text{g/mL}$ pendant 16 h et une concentration de doxorubicine de 4 $\mu\text{mol/L}$ pendant 3 h. Lors du traitement par la doxorubicine seule, l'activité des caspases 3 augmente considérablement (150 %) par rapport au témoin (100 %). En revanche, lorsque les cellules H9c2 sont traitées par le safran puis la doxorubicine, on remarque une diminution significative de l'activité des caspases 3. En effet, les cellules traitées par 1 $\mu\text{g/mL}$ de safran présentent une diminution de l'activité des caspases 3 jusqu'à 120 %. Les cellules traitées par 10 $\mu\text{g/mL}$ de safran présentent une inhibition plus prononcée de l'activité des caspases 3 qui va rejoindre les valeurs normales (103 %). Ce résultat montre que la doxorubicine à 4 $\mu\text{mol/L}$ pendant 3 h provoque l'activation des caspases 3 et induit par suite l'apoptose dans les cellules H9c2. En outre, un traitement par administration de la dose optimale de safran (10 $\mu\text{g/mL}$) pendant 16 h, peut inhiber significativement l'activité des caspases 3 effectrices.

D'autre part, la figure 76 B montre l'activité des caspases 3 dans les cellules H9c2 soumis à une ischémie/reperfusion (IR) pendant 8 h/16 h; traités par la DOX (D) (4 $\mu\text{mol/L}$) pendant 3h; soumis à l'IR et traités par la DOX ensemble (IR D); traités au safran (10 $\mu\text{g/mL}$) avec la DOX (SD); traités au safran avec la DOX durant la reperfusion (IR S D). Nous remarquons que le l'IR (8h/16h) ou la DOX (4 $\mu\text{mol/L}$) augmente significativement l'activité des caspases 3. Cette augmentation est nettement plus importante et double par rapport au control pour atteindre 195 % lorsque les cardiomyocytes sont soumis à l'ischémie/reperfusion et traités par la doxorubicine ensemble (IR D). Suite au traitement par le safran avec la doxorubicine (S D), et de même suite au traitement par le safran et la doxorubicine durant la reperfusion (IR S D), nous observons une inhibition significative des caspases 3 pour atteindre 134 % (IR S D).

Les résultats ainsi obtenus mettent en évidence l'activité des caspases 3 dans les cardiomyocytes H9c2 lors des différents traitements. Plus précisément, le safran (16 h, 10 $\mu\text{g/mL}$) a un effet inhibiteur significatif sur l'activité des caspases 3 qui diminuent de 43 % dans les cardiomyocytes traités par la doxorubicine et de 61 % dans les cardiomyocytes ayant subi l'ischémie/reperfusion (8 h/16 h) et traités par la doxorubicine ensemble. L'inhibition des caspases 3 effectrices par la dose optimale de safran freine ainsi l'induction de l'apoptose dans les cellules H9c2.

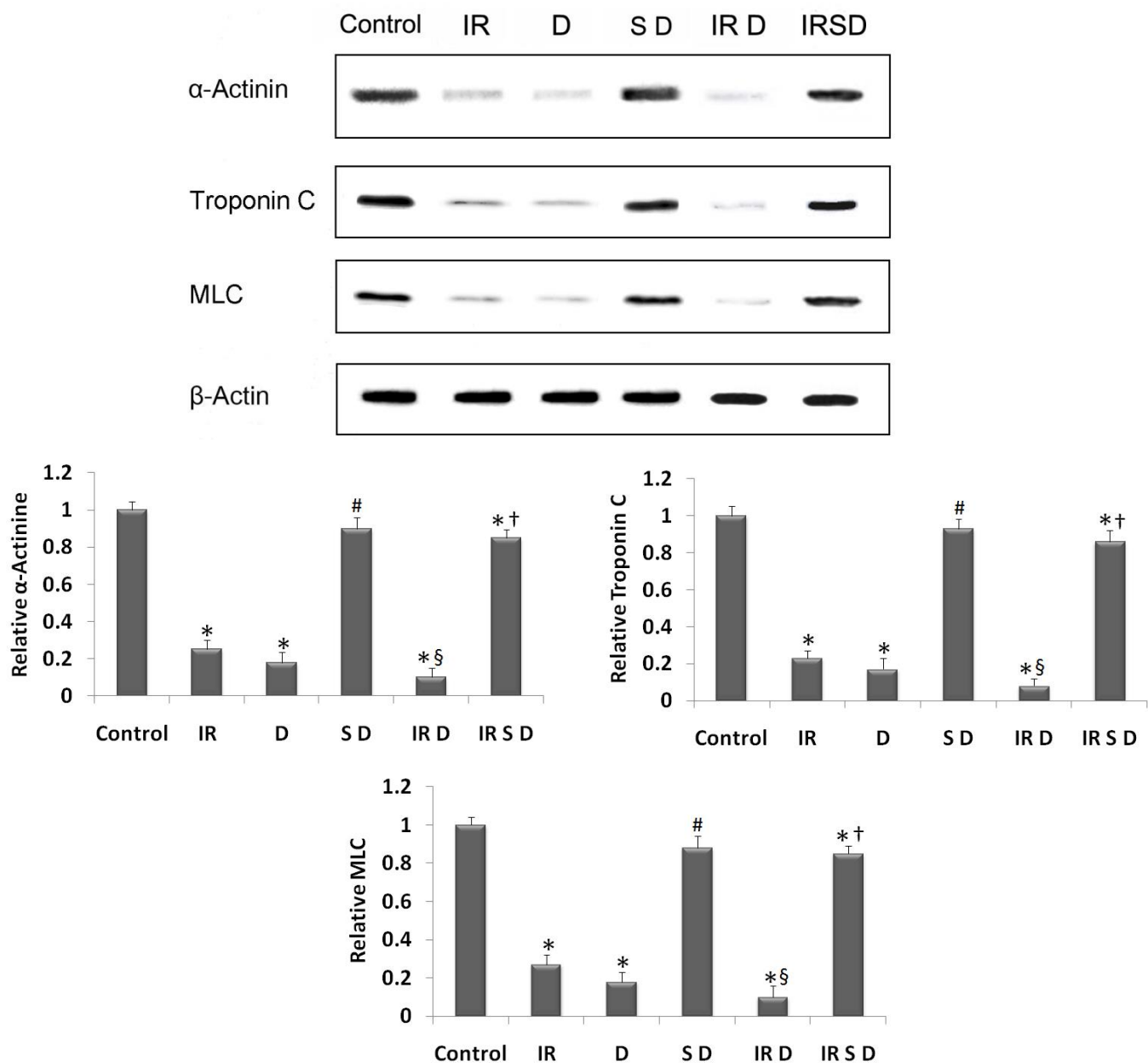


Figure 74. Western blot représentatif de l'expression de l' α -Actinine, Troponine C et MLC dans les cardiomyocytes H9c2.

- cellules non traitées (Control);
- cellules soumises à: Ischémie/Reperfusion (IR) 8 h/16 h
- cellules traitées avec: Doxorubicine (D) 4 μ mol/L, 3h;
- cellules traitées avec: Safran (S) 10 μ g/mL, 16 h et D 4 μ mol/L, 3 h;
- cellules soumises à: IR 8 h/16 h, et D 4 μ mol/L, 3 h;
- cellules soumises à: IR 8 h/16 h, S 10 μ g/mL, 16h et D 4 μ mol/L, 3 h.

Anti- β -Actin a été réalisé comme contrôle de la quantité de protéines déposées. La quantification de l'intensité des bandes obtenues par densitométrie est effectuée à l'aide du logiciel Image j. Les données sont exprimées en quantité de protéines α -Actinine, Troponine C et MLC rapporté à la quantité de protéines des contrôles. Les résultats représentent la moyenne $\pm$ écart type de 3 expériences, * $p < 0.05$ vs. control. # $p < 0.05$ vs D, † $p < 0.05$ vs IR D, § $p < 0.05$ vs IR.

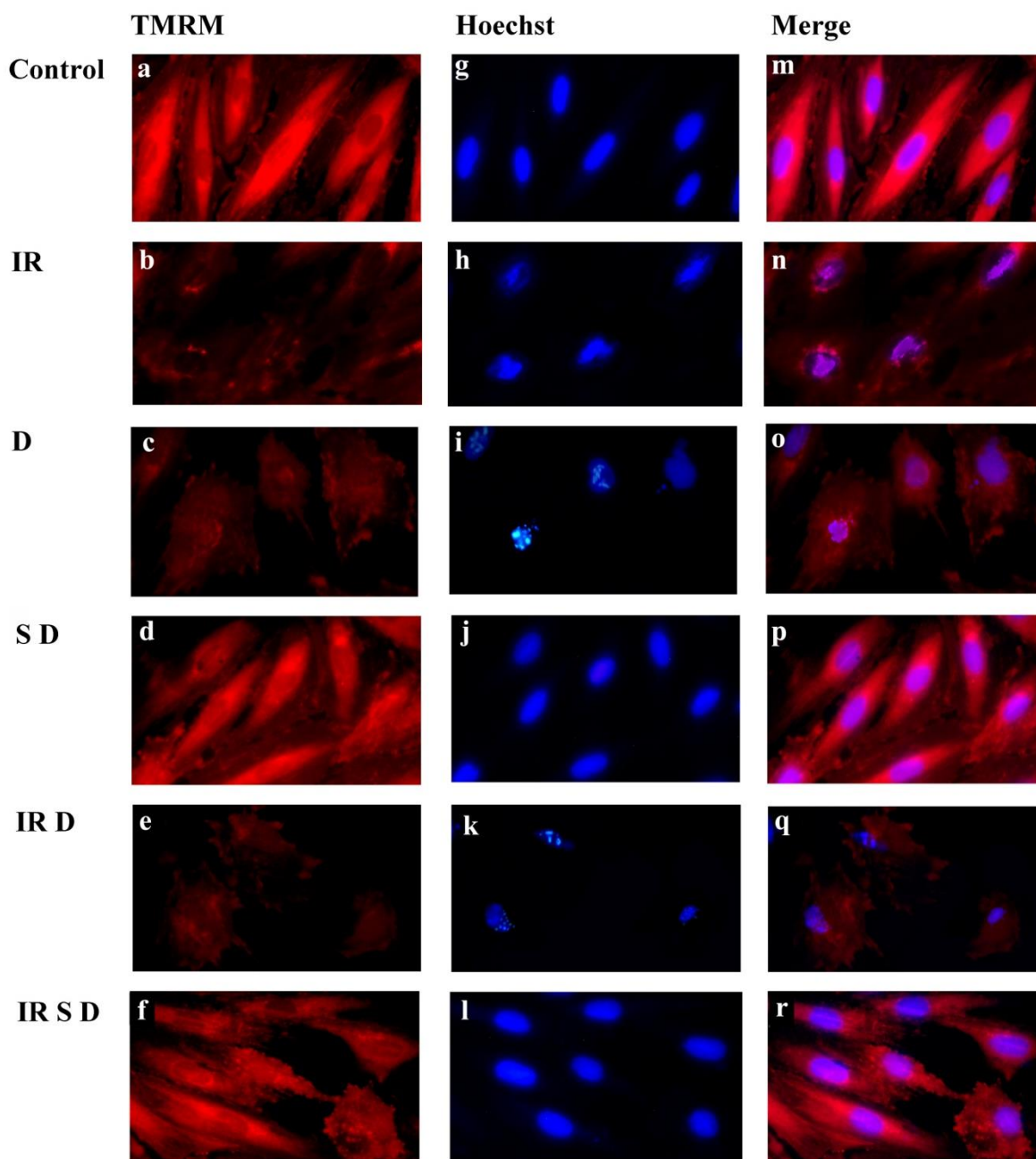
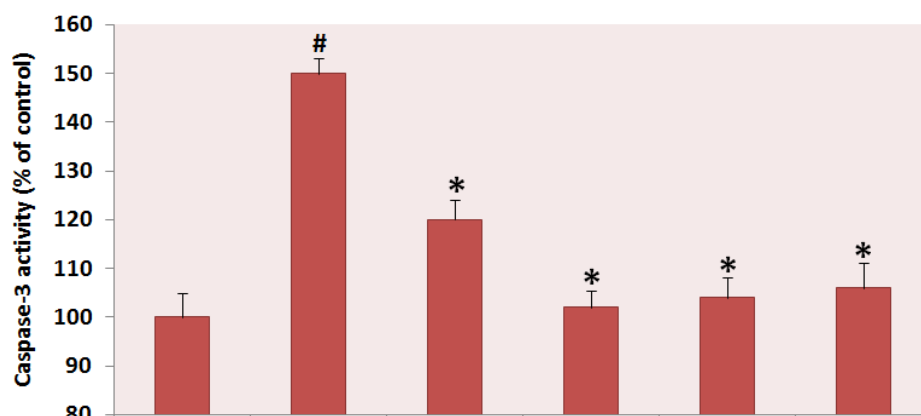


Figure 75. Effet du safran et de la doxorubicine sur la fluorescence TMRM et Hoechst 33342 pendant l'ischémie/reperfusion sur les cellules H9c2. Les images représentent les:

- cellules non traitées (Control);
- cellules soumises à: Ischémie/Reperfusion (IR) 8 h/16 h
- cellules traitées avec: Doxorubicine (D) 4 $\mu\text{mol/L}$, 3 h;
- cellules traitées avec: Safran (S) 10 $\mu\text{g/mL}$, 16 h et D 4 $\mu\text{mol/L}$, 3 h;
- cellules soumises à: IR 8 h/16 h et D 4 $\mu\text{mol/L}$, 3 h;
- cellules soumises à: IR 8 h/16 h, S 10 $\mu\text{g/mL}$, 16 h et D 4 $\mu\text{mol/L}$, 3 h.

Incubées avec la sonde fluorescente TMRM (a-f) ou avec le colorant Hoechst 33342 (g-l) ou un double marquage avec TMRM et Hoechst 33342 (m-r) à la fin des différents traitements (n=3) pendant 30 min à 37 °C puis observées au microscope à fluorescence.

A



SAF (µg/mL)	-	-	1	10	20	100
DOX (4µmol/L)	-	+	+	+	+	+

B

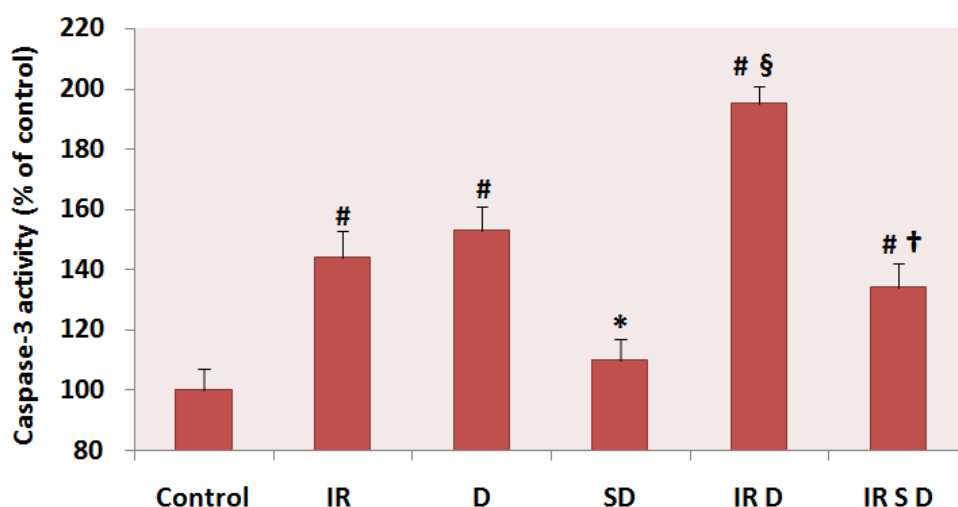


Figure 76. Effet du safran, de la doxorubicine et de l'ischémie/reperfusion sur l'activité des caspases 3.

A. Les cellules H9c2 sont traités avec des concentrations de safran (SAF) allant de 1 à 100 µg/mL pendant 16 h et une concentration de doxorubicine (DOX) de 4 µmol/L pendant 3 h. B. IR: ischémie/reperfusion pendant 8 h/16 h; D: doxorubicine, 4 µmol/L pendant 3 h; S: safran, 10 µg/mL pendant 16 h; le safran et la doxorubicine ont été ajoutés à la reperfusion. Un marquage fluorescent des caspases 3 est effectué, quantifié par un spectromètre à fluorescence à la fin des différents traitements. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au control. Ils représentent la moyenne de 3 expériences ± écart type. # $p < 0.05$ vs control, * $p < 0.05$ vs D, † $p < 0.05$ vs IR D, § $p < 0.05$ vs IR.

4.6. Discussion

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet protecteur des extraits de safran sur les dommages cardiaques induits par une ischémie/reperfusion accompagnée d'un traitement à la doxorubicine et les mécanismes mis en jeu. Le modèle d'IR simulée dans les cardiomyocytes H9c2 reproduit la physiopathologie de l'état de choc. La mesure de l'effet du safran, de la DOX et de l'IR a été effectuée sur la viabilité cellulaire, les voies de signalisation AKT/P70S6K et ERK 1/2, les protéines contractiles α -Actinine, Troponine C et MLC et les lésions apoptotiques: condensation de la chromatine, perte du potentiel de membrane mitochondriale, et activation des caspases 3.

Dans le but de fixer une dose de safran qui n'est pas toxique aux cellules, l'effet de différentes concentrations de safran ont été examinées pour évaluer la viabilité des cellules H9c2. Ainsi, la concentration de 10 μ g/mL de SAF pendant 16 h a été sélectionnée comme dose optimale non toxique qui augmente la viabilité cellulaire de 31%. La survie des cardiomyocytes a aussi été évaluée pour différentes concentrations de doxorubicine; ainsi, la concentration de 4 μ mol/L de DOX durant 3 h a été sélectionnée comme dose qui diminue la viabilité cellulaire de 46% et augmente le taux de LDH de 45%. Pour déterminer les doses de safran qui préviennent la cytotoxicité de la doxorubicine, nous avons étudié l'effet de plusieurs concentrations de SAF sur les cardiomyocytes H9c2 traités à la DOX. Ainsi, les résultats montrent que le safran (16 h, 10 μ g/mL) en prétraitement, prévient l'effet toxique de la doxorubicine (3 h, 4 μ mol/L) sur les cardiomyocytes H9c2 en augmentant la viabilité cellulaire de 31% et en diminuant la quantité de LDH libérée dans le milieu de 38% par rapport à la DOX. Le safran a ainsi un effet cardioprotecteur, anti-apoptotique sur les cellules H9c2.

Comme on a vu précédemment, le safran a des effets cardioprotecteurs envers les effets délétères de l'ischémie/reperfusion sur un modèle ex vivo de cœur isolé de lapin. Afin de reproduire les conditions ischémiques in vitro, un modèle d'hypoxie/réoxygénation a été mis au point, exposant les cardiomyocytes à des conditions les plus proches possibles de celles des cellules cardiaques au cours de l'infarctus du myocarde. Une chambre de culture anaérobique a été utilisée et permet de simuler une IR sur les cellules H9c2 en culture. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet protecteur du safran sur la cytotoxicité induite par l'ischémie/reperfusion et la doxorubicine ensemble sur les cardiomyocytes H9c2. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été mesuré afin

de déterminer les conditions optimales pour le protocole d'ischémie. Ainsi, l'ischémie/reperfusion pendant 8 h/16 h a été sélectionnée comme période qui permet de diminuer la viabilité cellulaire de 50 % et augmenter le taux de LDH de 51%.

Les cardiomyocytes ont subi une période d'IR (8 h/16 h), suivie par un traitement à la doxorubicine (3 h, 4 $\mu\text{mol/L}$) lors la reperfusion, avec ou sans extraits de safran (16 h, 1, 10 et 100 $\mu\text{g/mL}$) adopté en prétraitement ou à la reperfusion. En conséquence, dans nos conditions, les résultats montrent que la doxorubicine exacerbe les dommages de la reperfusion en diminuant la viabilité cellulaire de 76 % et en augmentant le taux de LDH de 92 % par rapport au control. Le traitement par le safran avant la période d'ischémie/reperfusion n'a pas d'effet cardioprotecteur; il n'affecte ni la viabilité des cardiomyocytes ni le taux de LDH. Par contre, le safran (16 h, 10 $\mu\text{g/mL}$) utilisé à la reperfusion, inhibe la cytotoxicité de la doxorubicine (3 h, 4 $\mu\text{mol/L}$) et de l'ischémie/reperfusion (8 h/16 h) ensemble, en augmentant la survie des cardiomyocytes de 46 % et en diminuant la libération du LDH dans le milieu de 52 % par rapport à DOX et IR. Ce qui implique le rôle cardioprotecteur anti-apoptotique du safran sur les cellules H9c2. Plus particulièrement, nous suggérons que l'effet prolifératif du safran pourrait provenir de son action anti-oxydante contre les RLO générés par l'ischémie/reperfusion et par la doxorubicine. Ainsi, le safran pourrait avoir un rôle de piègeur de RLO à la reperfusion plutôt que protecteur avant l'ischémie sur les cardiomyocytes.

Le safran est constitué de plusieurs composés; entre autres, la crocine et le safranal qui lui confèrent les qualités de couleur et d'arôme. Pour détecter quels sont les molécules biologiquement actives qui donnent au safran les propriétés anti-apoptotiques trouvés; nous nous sommes intéressés d'étudier l'effet de ses principaux métabolites: la crocine et le safranal. Les tests de viabilité cellulaire et cytotoxicité ont été effectués sur les cardiomyocytes H9c2 soumis à l'ischémie/reperfusion et traités par la doxorubicine dans les mêmes conditions et mêmes protocoles utilisés précédemment. Ainsi, dans le but de trouver quel constituant essentiel du safran lui procure ses propriétés anti-apoptotiques, l'effet de différentes concentrations de crocine et de safranal ont été examinées pour évaluer la viabilité des cellules H9c2. Dans nos conditions expérimentales, les résultats montrent que l'utilisation de la crocine (16 h, 10 $\mu\text{g/mL}$) en prétraitement diminue la cytotoxicité induite par la doxorubicine (3 h, 4 $\mu\text{mol/L}$) sur les

cardiomyocytes en augmentant la viabilité cellulaire de 30 % et en diminuant la libération du LDH de 34 % par rapport à DOX.

De plus, la crocine (16 h, 10 µg/mL) utilisé à la reperfusion inhibe la cytotoxicité de l'ischémie/reperfusion et de la doxorubicine ensemble en augmentant la survie des cardiomyocytes de 48 % par rapport à DOX et IR. D'autre part, le safran ne confère aucune protection contre les dommages de l'ischémie/reperfusion et de la doxorubicine sur les cardiomyocytes H9c2; en effet, aucune différence significative n'a été signalée. En conséquent, nos résultats suggèrent que les propriétés anti-apoptotiques du safran proviennent essentiellement de la crocine.

Suite aux tests de viabilité, les voies de signalisation ont été explorées. Nous savons que les voies RAS/RAF/ERK1/2 et PI3K/AKT/mTOR/P70S6K sont impliquées dans la cardioprotection et la diminution de l'apoptose des cardiomyocytes. Ces voies de signalisations présentent un rôle central dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire. De plus, les protéines contractiles : α -Actinine, Troponine C et MLC, jouent un rôle fondamental dans les mécanismes de la contraction des cardiomyocytes. Ainsi, le niveau de phosphorylation et d'expression de ces protéines en particulier a été recherché par western blot pour identifier d'une part, leur rôle dans l'apoptose induite par l'ischémie/reperfusion et la doxorubicine et d'autre part, les mécanismes par lesquels le safran affecte les voies de cardioprotection pour atténuer la mort cellulaire. Le but est donc de rechercher les cibles moléculaires de la protection cardiaque du safran suite au traitement par la doxorubicine sur les cardiomyocytes ayant subi l'ischémie et la reperfusion.

Les résultats des westerns blots montrent une diminution de la phosphorylation de AKT, P70S6K, ERK 1/2 et une diminution d'expression de α -Actinine, Troponine C, MLC par rapport au contrôle lorsque les cellules H9c2 sont soumis à l'ischémie/reperfusion (8 h/16 h) et traités par la doxorubicine (3 h, 4 µmol/L). Le safran (16 h, 10 µg/mL) administré à la reperfusion permet de rétablir le niveau de phosphorylation de AKT, P70S6K et ERK 1/2 et le niveau d'expression de α -Actinine, Troponine C et MLC proche de la normale. Ces résultats prouvent que l'apoptose des cardiomyocytes induite par DOX et IR est médiée par l'inactivation des voies de prolifération cellulaire incluant AKT/P70S6K et ERK 1/2; et par diminution de l'expression des protéines contractiles α -Actinine, Troponine C et MLC.

D'une part, la DOX et l'IR provoquent une diminution de la phosphorylation de AKT, P70S6K et ERK 1/2. Suite au traitement par le SAF, la présence de AKT et P70S6K phosphorylées explique l'activation de la voie de signalisation intracellulaire PI3K/AKT anti-apoptotique qui provoque ainsi l'augmentation du taux de prolifération des cardiomyocytes. En effet, la phosphorylation et l'activation de AKT dépendent de PI3K. De même, la phosphorylation de ERK 1/2 étant retrouvée positive montre l'activation constitutive de la voie ERK 1/2 MAPK qui contribue à l'effet anti-apoptotique du safran sur les cellules H9c2 soumis à IR et traités par DOX. Par conséquent, l'effet protecteur des extraits de safran est corrélé à l'inhibition de l'apoptose des cardiomyocytes H9c2 induite par DOX et IR. Ceci s'explique par l'augmentation de la phosphorylation des protéines étudiées AKT, P70S6K et ERK 1/2, impliquant ainsi l'activation des voies de signalisations de cardioprotection PI3K/AKT/P70S6K et ERK 1/2 MAPK.

D'autre part, la doxorubicine et l'ischémie/reperfusion provoquent l'apoptose des cardiomyocytes H9c2 en diminuant significativement l'expression des protéines contractiles α -Actinine, Troponine C et MLC; ce qui est à l'origine des altérations de la fonction contractile, l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque. Le traitement au safran, paraît pouvoir procurer une protection aux cardiomyocytes contre les dommages causés par la doxorubicine et l'ischémie/reperfusion, en augmentant le profil d'expression de l' α -Actinine, Troponine C et MLC, qui se rapprochent de la normale. Ceci se traduit par une diminution des altérations contractiles et une augmentation de la survie des cardiomyocytes H9c2. Par conséquent, ces résultats suggèrent que le safran protège les cellules H9c2 de l'apoptose induite par DOX et IR en régulant l'expression des protéines contractiles α -Actinine, Troponine C et MLC.

Au cours de l'apoptose, les cellules subissent plusieurs changements morphologiques et biochimiques dont la condensation de la chromatine ainsi que le changement de la structure membranaire. Ces caractéristiques apoptotiques résultent en partie de l'activation des caspases et l'ouverture des pores de transition mPTP de la mitochondrie. L'apoptose peut être induite par différentes voies moléculaires dont les mieux caractérisées sont la voie extrinsèque (voie des récepteurs de mort cellulaire) et la voie intrinsèque (voie mitochondriale). La voie extrinsèque est médiée par des facteurs extracellulaires venant se fixer sur des récepteurs situés sur la membrane cytoplasmique des cellules déclenchant une cascade d'activation d'enzymes: les

caspases, qui représentent le principal lien entre cette voie et la voie intrinsèque. La voie intrinsèque dépend de l'activation d'une cascade d'événements intracellulaires qui convergent vers la mitochondrie, entraînant la perméabilisation de ses membranes, l'ouverture des mPTP et la libération de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c, permettant l'activation des caspases effectrices conduisant à la mort de la cellule (Tait, 2008). Pour cela, les différentes caractéristiques de l'apoptose ont été mesurées: la condensation de la chromatine, le potentiel membranaire de la mitochondrie et l'activation des caspases effectrices.

L'étude de la condensation de la chromatine et la dégradation des noyaux a été réalisée par microscopie à fluorescence à l'aide d'un marquage au Hoechst 33258. Il permet d'observer les changements de morphologie des noyaux au cours de l'apoptose. Les cellules normales, marquées avec le Hoechst 33258, sont caractérisées par une fluorescence bleue pâle car la chromatine est répartie dans tout le noyau, tandis que le noyau des cellules apoptotiques est fragmenté et la chromatine est condensée donc l'intensité de la fluorescence des noyaux marqués est accrue. La doxorubicine (4 $\mu\text{mol/L}$) et l'IR (16 h/8 h) résultent en une augmentation des cellules apoptotiques. Par contre, le safran diminue les dommages de la doxorubicine et de l'ischémie/reperfusion au niveau de la condensation de la chromatine et la dégradation du noyau, une morphologie des noyaux proche de la normale est alors observée.

L'étude du potentiel de membrane mitochondriale $\Delta\Psi_m$ a pour but de visualiser en temps réel l'ouverture des pores de transition mPTP et la mort des cellules H9c2 ayant subi différents traitements, ce qui fournit de précieuses informations pour comprendre les mécanismes intracellulaires mis en jeu. Dans le cadre de notre travail, le TMRM, un marqueur fluorescent photoexcitable, a été utilisé pour déterminer les changements du potentiel de membrane $\Delta\Psi_m$ au niveau des mitochondries au microscope à fluorescence. Le TMRM a été incubé à la fin de la reperfusion. La comparaison de l'intensité de fluorescence a été effectuée sur des cardiomyocytes H9c2 en normoxie ou hypoxie étant traités par le safran et/ou la doxorubicine afin d'étudier la perte du potentiel de membrane mitochondriale induite par ces traitements. L'objectif de cette étude est donc d'évaluer l'effet protecteur du safran sur les dommages cardiaques induits par l'ischémie/reperfusion et le traitement à la doxorubicine au niveau du potentiel de membrane mitochondriale.

Les résultats montrent que le safran (10 $\mu\text{g/mL}$) pourrait contribuer à la protection cardiaque contre les effets délétères de l'ischémie/reperfusion et de la doxorubicine. Le safran réduit la perte du potentiel de membrane mitochondrial $\Delta\Psi\text{m}$ observé lors du traitement par DOX et IR. Ceci pourrait être dû à son effet inhibiteur sur les pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP). En effet, l'ouverture du mPTP est un élément décisif de l'induction de la mort cellulaire suite à l'IR et la DOX. Ainsi, l'ouverture des mPTP pourrait être prévenue par le safran appliqué à la reperfusion. Ainsi, cette expérience nous a confirmé d'une part, que la DOX exacerbe les dommages de l'IR par ouverture des mPTP caractérisée par une diminution de la fluorescence du TMRM, une chute de potentiel membranaire et la mort cellulaire. D'autre part, la présence du safran (16 h, 10 $\mu\text{g/mL}$) à la reperfusion permet de prévenir les modifications de la fluorescence du TMRM observé suite au traitement par IR et DOX. Nous pouvons donc suggérer que le safran empêche l'ouverture du mPTP, inhibe la perte de $\Delta\Psi\text{m}$ et de ce fait diminue l'apoptose des cardiomyocytes.

Pour expliquer ce phénomène, nous savons que la production massive de radicaux libres de l'oxygène (RLO) pendant la reperfusion est un facteur favorisant l'ouverture des mPTP. Les RLO provoquent entre autres, une peroxydation des lipides, et l'ouverture des canaux mPTP modifient le fonctionnement mitochondrial et entraînent une déplétion en ATP (Pasdois et al., 2004). Nos résultats ont montrés que la doxorubicine, comme la reperfusion modifie l'ouverture des mPTP, ce qui implique un rôle central des mPTP dans la cardiotoxicité de la DOX. Le traitement par la DOX à la reperfusion exacerbe les dommages de l'IR, ce qui est expliqué par la production accrue de RLO et par le phénomène de calcium overload. Ces résultats sont en faveur du rôle délétère des RLO sur la perte du potentiel de membrane et l'ouverture du mPTP. Ainsi, le safran pourrait limiter l'étendue des dommages myocardiques provoqués par DOX et IR au niveau de la mitochondrie par inhibition directe de l'ouverture des pores mPTP ou indirectement comme piègeurs de RLO afin de diminuer le stress oxydatif.

Dans notre étude, afin de s'assurer que la mort cellulaire est de nature apoptotique et pour confirmer nos résultats obtenus précédemment, l'activation des caspases effectrices 3 a été étudiée. La caspase 3 est connue comme étant une molécule importante dans la cascade d'exécution de l'apoptose. Elle peut être activée par la mitochondrie (cytochrome c, diminution

de Bcl-2, augmentation de BAX et BAD) ou par des stimuli membranaires (TNF- α /TNF- α Receptor). Des taux de caspases 3 élevés ont été signalés dans les dysfonctions et insuffisance cardiaques suite à un stress oxydatif élevé et une génération de RLO qui provoque l'apoptose. Il est ainsi intéressant de détecter l'expression des caspases 3 et la fonction cardiaque suite à l'IR et la DOX; et d'apprécier le rôle du safran à ce niveau. La détection des caspases 3 activées a été réalisée par utilisation des inhibiteurs fluorescents des caspases activées: FAM-DEVD-fmk. Le DEVD étant un substrat sélectivement hydrolysé par la caspase 3 effectrice. La fluorescence est donc une mesure directe de la quantité de caspases 3 activées au moment du marquage. La quantification de la fluorescence, obtenue par un spectromètre à fluorescence, nous a permis d'évaluer l'induction de l'apoptose dans les cardiomyocytes.

Nos résultats montrent une augmentation nettement importante de l'activité des caspases 3 qui doublent lorsque les cardiomyocytes sont soumis à l'ischémie/reperfusion puis traités à la doxorubicine. Ainsi, la doxorubicine permet d'avantage l'augmentation de l'activation des caspases 3 qui est déjà déclenché suite à la période d'ischémie/reperfusion. Cette augmentation de fluorescence est inhibée significativement lorsque le safran (16 h, 10 μ g/mL) est administré à la reperfusion. L'inhibition des caspases 3 effectrices par le safran lors de la reperfusion freine l'induction de l'apoptose.

Pour expliquer ce phénomène, il est admis que le stress oxydatif produit suite à l'ischémie/reperfusion active les caspases 3 effectrices qui vont dégrader les protéines Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) anti-apoptotique. De plus, les études ont montré que la DOX provoque la génération de RLO, l'augmentation du taux des protéines pro-apoptotique BAX et BAD, la diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, mais également l'activation des caspases 3 et la dégradation de l'ADN (Spallarossa et al., 2004). En outre, l'utilisation d'inhibiteurs des caspases 3 a démontré la préservation du myocarde contre les dommages ischémiques (Yaoita et al., 1998). Ceci montre l'implication de la voie impliquant les caspases effectrices dans la protection cardiaque. Nos résultats confirment l'activation des caspases 3 qui est exacerbée lors du traitement par la doxorubicine durant la reperfusion. Ceci pourrait être la conséquence de l'augmentation du stress oxydatif et la diminution des défenses anti-apoptotiques provoqué par la DOX et l'IR. Le traitement par les extraits de safran et la doxorubicine durant la reperfusion

inhibe significative l'activation des caspases 3. Ceci pourrait être dû au rôle du safran comme piègeur de RLO libérés par la reperfusion et la doxorubicine. Ce qui laisse présager une éventuelle diminution de la dégradation de l'ADN et une activation des protéines anti-apoptotiques Bcl-2. En effet, Bcl-2 empêche l'activation des caspases 3 effectrices en inhibant l'ouverture des pores mPTP mitochondriaux, prévient le relargage du cytochrome c et par suite empêche le déclenchement du processus apoptotique. Nos résultats prouvent donc le pouvoir anti-oxydant et anti-apoptotique du safran contre la mort des cardiomyocytes.



Discussion générale

Au terme de cette étude, compte tenu des résultats obtenus et face aux objectifs que nous nous sommes fixés, il est nécessaire de faire le point... Pourquoi un travail sur la cardiotoxicité de la doxorubicine, alors qu'il existe de nombreuses recherches sur le sujet? Certes, mais en conditions ischémiques il existe très peu de travaux, pourtant il n'est pas rare qu'avec l'âge une chimiothérapie soit prescrite chez des patients avec une ischémie myocardique. Nous avons voulu explorer les conséquences sur le myocarde de cette situation qui associe deux dommages ayant comme dénominateur commun sous-jacent le stress oxydatif. Par ailleurs, on peut se demander pourquoi utiliser les antioxydants alors qu'il n'y a pas à cette date une étude qui a rapporté une protection complète contre cette cardiotoxicité induite par les RL et qui serait applicable chez l'homme. Ceci pourrait être vrai, mais dans le domaine de la thérapie en général (Heinrich et al., 2014; Shikov et al., 2014; Tohda & Kuboyama 2014; Hamidpour et al., 2013) et cancéreuse en particulier (Teiten et al., 2013; Bishayee et al., 2012) il existe un retour vers la phytothérapie, il ne faut donc pas capituler. Dans ce contexte, nous avons choisi le safran (variété cultivée au Liban) comme agent phytothérapique, une des épices les plus chers du monde, un antioxydant de premier choix et qui possède un vaste potentiel thérapeutique (Moshiri et al., 2014).

Avant de commencer les protocoles expérimentaux, nous avons effectué plusieurs extractions à partir de stigmates de safran cultivé dans la plaine de la Bekaa. Nous avons opté pour les extraits méthanol-eau qui ont été analysés par HPLC afin de quantifier leur teneur en principes actifs (safranal et crocines), ces extraits ont été lyophilisés et testés d'abord pour leur teneur en polyphénols totaux et leur pouvoir anti-radicalaire dans le système d'électrolyse et de xanthine-xanthine oxydase. Ce travail préliminaire est d'une grande importance car il nous a permis de s'assurer que nos extraits sont efficaces et conformes aux normes internationales, en comparaison avec ce qui est cité dans la littérature (ISO, 2003).

Le cœur isolé de lapin et perfusé selon la méthode de Langendorff nous a servi comme modèle expérimental afin de tester l'effet protecteur du safran dans trois protocoles : 1) Cœurs isolés et

traités avec la doxorubicine en comparaison avec des cœurs soumis à l'électrolyse, source de génération de RLO. 2) Cœurs isolés traités avec la doxorubicine suite à une ischémie globale suivie de reperfusion, l'administration du safran étant réalisé en pré et post ischémie. 3) Cœurs isolés soumis à une ischémie-reperfusion provenant de lapins traités avec la doxorubicine seule ou après administration de safran.

Avant de discuter nos résultats, il faut noter que nous avons recherché l'effet propre du safran sur la fonction cardiaque et il s'est avéré que les extraits ne sont pas dépourvus de toxicité. Ainsi, une dose de 0.1 mg/mL injectée dans la circulation coronaire diminue significativement la force contractile du cœur, alors qu'une dose de 1 mg/mL serait fatale. Nous avons par conséquent adopté la dose de 0.01 mg/mL pour nos protocoles sur cœur isolé du fait qu'à cette concentration et sur plus d'une heure de perfusion les paramètres cardiaques ne sont pas affectés; cependant à cette concentration le safran piège significativement les RLO générés par XXO ou électrolyse. De ce fait, une fenêtre thérapeutique intéressante a été exploitée. Il est à signaler qu'une dose unique de safran (0.01 mg/mL) a été utilisée dans les protocoles sur cœur isolé étant donné que des essais avec de plus basses doses encombreraient ces protocoles inutilement. Par contre, dans les expérimentations sur les cardiomyocytes en culture plusieurs doses de safran ont été utilisées ainsi que le safranal et la crocine.

En se référant à la littérature il existe peu de travaux concernant l'effet du safran sur le cœur isolé. Boskabady et al., (2008) ont utilisé le cœur isolé du cochon d'Inde, trouvant un effet inotrope négatif et une bradycardie pour des concentrations de safran allant de 1 à 5 mg/100mL. De plus, des extraits de safran à doses élevées (10 mg/kg) ont été administrés par voie intraveineuse chez le rat et ont provoqués une chute de la pression artérielle (Imenshahidi et al., 2010). Par ailleurs, Modaghegh et al., (2008) ont administré par voie orale à des volontaires des comprimés de safran (400 mg/jour pendant une semaine) sans obtenir de changements hématologiques et biochimiques cliniquement significatifs.

Les expériences effectuées sur cœur isolé nous ont permis de confirmer le rôle prépondérant joué par les RLO dans la cardiotoxicité de la DOX en comparant les paramètres cardiodynamiques, biochimiques et histopathologiques entre cœurs traités par DOX et ceux soumis à l'électrolyse,

source de RLO. Les extraits de safran ont été plus efficaces dans la protection des dommages provoqués par l'électrolyse que ceux provoqués par la DOX. Par ailleurs, les extraits de safran ont exhibé une forte protection quand ils sont administrés lors de la reperfusion post-ischémique. La DOX administrée suite à une ischémie globale exacerbe les dommages sans toutefois être fatale. Les extraits de safran administrés chez les lapins avant d'isoler le cœur, soit dans la solution qui le perfuse assure une protection, cependant celle-ci n'est optimale que lorsque le safran est administré à la reperfusion. En se basant sur les paramètres sus mentionnés, le safran agirait via ses propriétés antioxydantes.

Les travaux associant DOX, IR et safran que nous avons menés sur le cœur isolé de lapin sont uniques et originaux, il existe dans ce contexte une étude par Joukar et al., (2010) qui rapporte un effet protecteur du safran chez le cœur ischémique de rat. D'autres études ont rapporté un effet protecteur du safran sur la cardiotoxicité induite par l'isoprotérénol (Goyal et al., 2010; Sachdeva et al., 2012). Quant aux travaux de Ajami et al., (2010) les extraits de safran semblent aussi efficace dans la protection de la néphrotoxicité.

Le travail ex vivo a été complété par une étude sur les cardiomyocytes H9c2 en culture qui nous a permis de montrer l'effet protecteur des extraits de safran sur la viabilité cellulaire, la cytotoxicité, les voies de signalisations activées, la condensation de la chromatine, ainsi que l'implication du mPTP et des caspases dans des conditions d'ischémie/reperfusion et suite au traitement par la doxorubicine.

Nous nous sommes d'abord intéressés aux effets du safran et de la doxorubicine sur la viabilité des cardiomyocytes H9c2 soumis à une période d'ischémie/reperfusion simulée. Les résultats montrent une diminution significative de la viabilité cellulaire suite à DOX et IR. Par contre, le traitement par les extraits de safran (16 h, dose optimale 10 µg/mL) durant la reperfusion cause une augmentation de la viabilité cellulaire de 46% et une diminution du taux de LDH de 52%. De plus, le marquage avec le Hoechst 33258 montre une élévation de l'apoptose et de la condensation de la chromatine suite à DOX et IR qui est significativement inhibée avec le safran à la reperfusion. Ce qui suggère un rôle cardioprotecteur anti-apoptotique du safran sur les cellules H9c2. Par contre, le traitement par le safran avant la période d'IR a légèrement affecté la

viabilité cellulaire et le taux de LDH sans offrir un effet cardioprotecteur significatif. Ce qui suggère que l'effet prolifératif du safran sur les cardiomyocytes pourrait provenir de son action anti-oxydante contre les RLO générés par IR et DOX. Plus particulièrement, le safran pourrait avoir un rôle de piègeur de RLO à la reperfusion plutôt que protecteur avant l'ischémie. De plus, nous avons démontré que l'effet cardioprotecteur anti-apoptotique du safran provient spécifiquement de la crocine, son principal métabolite actif.

Pour étudier l'apoptose, il est important de confirmer les résultats par différentes méthodes. Nous avons utilisé le marquage au Hoechst, détecté les modifications de la perméabilité membranaire et étudié l'activité des caspases 3.

Nous avons montré que l'ischémie et le traitement par la doxorubicine pourraient induire l'altération de la perméabilité membranaire mitochondriale dans les cellules intactes. Ainsi, à la fin de la reperfusion, le potentiel de membrane s'effondre significativement. Nos résultats ont démontré que cette diminution est prévenue par le safran. Par conséquent, cette modification pourrait être interprétée comme une ouverture du mPTP et l'utilisation du safran à la reperfusion a prévenue l'ouverture de ces pores. Plusieurs études antérieures ont montré que l'IR peut induire l'apoptose, un dysfonctionnement mitochondrial, une fragmentation de l'ADN ainsi que l'activation des caspases avec une inhibition de la chaîne respiratoire et un relargage du cytochrome c. Ces modifications commencent lors de l'ischémie et s'accroissent pendant la reperfusion. Par conséquent le mPTP est impliqué dans les perturbations de la mitochondrie (Borutaite & Brown, 2003). D'autres études sur des myocytes ventriculaires ont montré un relargage du cytochrome c et une activation du phénomène de l'apoptose lors de l'IR qui peuvent être prévenus par l'utilisation des inhibiteurs du mPTP. Ceci suggère aussi une ouverture du mPTP pendant l'IR (Halestrap et al., 2004). Nos résultats suggèrent l'implication du mPTP dans l'induction des effets délétères dus à l'ischémie/reperfusion avec le traitement par la doxorubicine. En effet, nous avons montré que la DOX exacerbe les dommages de l'IR au niveau de la perte du potentiel de membrane mitochondriale et l'ouverture des mPTP. Le safran en contrepartie, permet de réguler ce phénomène et diminuer les dommages mitochondriaux. L'effet cardioprotecteur du safran contre les dommages de l'ischémie/reperfusion et de la doxorubicine

sur la mitochondrie est attribué à son rôle d'inhibiteur des mPTP et de piègeur de RLO dont la production excessive suite à IR et DOX entraîne l'ouverture des canaux mPTP.

Enfin, pour confirmer nos résultats, nous avons mis en évidence l'activité des caspases 3. En effet, les caspases 3 effectrices sont des cystéines protéases, activées lors d'altérations cellulaires et permettent l'exécution de l'apoptose en clivant spécifiquement un certain nombre de protéines intracellulaires essentielles. Les caspases participent à la fragmentation de l'ADN et du noyau, aux changements morphologiques, à l'activation des endonucléases et à la dégradation des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2). Il a été démontré que la voie d'activation des caspases effectrices a un rôle crucial dans la cardiotoxicité provoquée par les RLO suite à l'ischémie/reperfusion et la diminution de la fonction cardiaque (Yaoita et al., 1998). Ainsi, nos résultats mettent en évidence l'activité de la caspase 3 dans les cellules cardiaques ayant subi l'IR et un traitement par la DOX. La doxorubicine induit une augmentation supplémentaire significative de l'activité de la caspase 3 qui est déjà élevée suite à l'IR par rapport au control. Par ailleurs, nous avons démontré que dans les cellules traitées avec le safran, l'inactivation des caspases 3 permet de prévenir l'apoptose des cardiomyocytes. Ceci pourrait suggérer une protection par le safran contre les RLO produits par la DOX et la reperfusion qui déclenchent l'activation des caspases effectrices. Ceci laisse présager une éventuelle augmentation de l'expression de Bcl-2 (anti-apoptotique) et diminution de BAX et BAD (pro-apoptotique). Les résultats obtenus affirment donc le rôle protecteur anti-oxydant et anti-apoptotique des extraits de safran au niveau de l'inhibition des caspases 3.

Du point de vue signalisation cellulaire, il a été démontré que l'IR et la DOX induisent des dégâts myocardiques en activant les voies pro-apoptotiques de réponse au stress de la famille des MAPK comme P38 et JNK (c-Jun N-terminal kinases). Cependant, le tissu cardiaque essaye d'activer parallèlement les cascades anti-apoptotiques de la voie RISK comme PI3K/AKT et ERK 1/2 afin de promouvoir une protection au myocarde. C'est la balance entre les voies pro- et anti-apoptotiques qui détermine la mort ou la survie des cardiomyocytes qui va dicter le devenir du myocarde. Les stratégies thérapeutiques actuelles ont pour but d'activer de manière plus soutenue les voies de survie.

Nous avons montré que le safran a un fort pouvoir anti-oxydant et anti-apoptotique et avons déterminé les événements moléculaires responsables de ses effets cardioprotecteurs vis-à-vis des atteintes de la reperfusion et de la doxorubicine. Nous avons utilisé deux modèles, ex vivo et in vitro pour révéler les mécanismes de cardioprotection du safran. Plus particulièrement, son rôle sur les voies de signalisations pro-apoptotique (P38 MAPK) et anti-apoptotique (PI3K/AKT/mTOR et ERK 1/2). De plus, l'effet du safran sur les protéines contractiles, α -Actinine, MLC, Troponine C et Troponine T. Ces molécules ont un rôle essentiel pendant le processus de contraction-relaxation du cœur et régulent la formation de l'actine-myosine. Nos résultats montrent l'efficacité de la protection apportée par le safran contre les dommages cardiaques de l'IR et de la DOX. L'activation de la voie RISK serait cruciale pour cette cardioprotection. En effet, la phosphorylation de AKT et ERK 1/2 suite au traitement par le safran durant la reperfusion prouve l'implication de cette voie dans la survie des cœurs isolés (ex vivo) et des cardiomyocytes (in vitro). Une fois activée par PI3K, AKT phosphoryle à son tour les protéines pro-apoptotique BAD et BAX pour les inhiber et renforcer leur état inactif.

Nos résultats sont conformes avec plusieurs études de la littérature qui montrent le rôle cardioprotecteur de molécules comme les adénosines, opioïdes, bradykinines... suite à l'IR via l'activation de AKT et ERK 1/2 (Chiari et al., 2005; Hausenloy & Yellon, 2006). Nous avons pu observer que mTOR semble aussi impliquée dans la protection fournie par le safran à la reperfusion. mTor étant la cible de AKT, nous observons suite au traitement par le safran, la phosphorylation de mTOR et celle de ses cibles p70S6K et 4EBP1/eIF4E. La voie de survie mTOR/4EBP1/eIF4E, impliquée lors de l'initiation de la traduction, semble ainsi intervenir lors du conditionnement par le safran sur le modèle du cœur isolé perfusé de lapin et donc induire des modifications traductionnelles participant à la réponse adaptative à l'IR et la DOX. En effet, mTOR régule les phosphorylations et les fonctions de nombreuses protéines impliquées dans la traduction des ARNm (ARN messagers). mTOR induit d'une part la phosphorylation/activation de p70S6K. L'activation de p70S6K entraîne la phosphorylation de la protéine S6, capable d'activer la traduction d'ARNm codant pour des protéines ribosomales et d'autres facteurs de transcription, ce qui augmente la synthèse protéique. p70S6K peut également phosphoryler BAD et par suite inhiber son rôle pro-apoptotique (Shahbazian et al., 2006). D'autre part, mTOR peut également stimuler la traduction en phosphorylant directement le facteur d'initiation 4EBP1.

Cela entraîne une perte d'affinité de 4EBP1 pour eIF4E qui va ainsi pouvoir former un complexe avec d'autres partenaires requis pour l'initiation de la traduction. D'autre part, l'activation de P38 suite à IR et DOX laisse penser à une activation des protéines pro-apoptotiques (BAX et BAD) (Guo et al., 2013). Le safran inverse ce phénomène en inactivant P38 et en préservant les voies de survie AKT et ERK 1/2, ce qui favorise la prolifération cellulaire. En outre, la régulation des niveaux d'expression des protéines contractiles α -Actinine, MLC, Troponine C et Troponine T observées suite au traitement par le safran explique son rôle protecteur au niveau de la contraction et relaxation cardiaque.

Les résultats concernant la partie moléculaire sur les cœurs isolés de lapin et sur les cardiomyocytes H9c2 montrent que le safran active les mêmes voies de signalisation ex vivo et in vitro, ce qui confirme l'effet du safran sur ces voies de survie cellulaire. Enfin, nous suggérons que le stress oxydatif et la production de RLO par la reperfusion et la doxorubicine est un événement clé qui cause l'état de stress et l'apoptose des cellules cardiaques dans les deux modèles utilisés. Le safran, par son action anti-oxydante, pourrait avoir un effet de piègeur de RLO à la reperfusion en passant par l'activation des voies anti-apoptotique de cardioprotection pour maintenir la survie cardiaque.

En guise de fin, la plupart des recherches concernant le safran mettent en évidence son pouvoir antitumoral (Samarghandian & Borji, 2014; Bolhassani et al., 2014); nous avons montré l'autre face de la médaille, le safran à des doses modérées est un agent chimioprotecteur dans les cardiomyocytes. Cet effet de chimioprotection du safran est déjà connu mais n'a pas été développé (Abdullaev & Espinosa-Aguirre, 2004). Le même scénario a été décrit pour le curcumin une épice très proche du safran (Goel & Aggarwal, 2010). Le safran serait ainsi un agent qui pourrait constituer un traitement adjuvant en cancérothérapie.



Conclusion

Dans les conditions expérimentales que nous avons adoptées, nous pouvons conclure que:

1) Les extraits méthanol/eau préparés à partir des stigmates du safran cultivé au Liban possèdent une activité antioxydante manifeste due principalement à la crocine.

2) Perfusés dans la circulation coronaire du cœur isolé de lapin les extraits de safran

- s'avèrent toxiques à une dose supérieure à 100 µg/ml ; une dose optimale de 10 µg/mL a été ainsi optée.
- protègent le myocarde contre la toxicité de la doxorubicine ajoutée à la solution de perfusion et contre les radicaux libres de l'oxygène générés par électrolyse de cette solution.
- protègent le myocarde contre les dommages provoqués par la doxorubicine délivrée à la reperfusion suite à une ischémie globale de 30 min.



Ceci en améliorant le recouvrement de la fonction mécanique cardiaque, en diminuant les arythmies et en majorant le profil antioxydant du myocarde.

3) Chez les lapins traités pendant 21 jours avec des extraits de Safran par voie orale et la doxorubicine par voie ip, une protection efficace a été obtenue chez les cœurs qui ont été isolés par la suite et soumis à une ischémie globale suivie de reperfusion.

4) Les extraits de safran semblent inhiber l'apoptose induite par l'ischémie/ reperfusion et la doxorubicine en activant la voie de survie AKT/mTOR, en augmentant le niveau de Troponine T et en inhibant l'expression de p-P38 tel que montré par les analyses de Western blot.

5) La mort des cardiomyocytes induite par la doxorubicine et l'ischémie/reperfusion est un processus apoptotique.

6) La doxorubicine exacerbe les dommages de l'ischémie/reperfusion au niveau de la viabilité cellulaire, des voies de signalisations impliquant AKT/P70S6K et ERK 1/2, des protéines contractiles α -Actinine, Troponine C et MLC, de la condensation de la chromatine, du potentiel membranaire mitochondriale et des caspases.

7) La protection par le safran passe par l'augmentation de la viabilité des cardiomyocytes, la diminution de la cytotoxicité, l'activation des voies de signalisations de prolifération PI3K/AKT/P70S6K et ERK 1/2 MAPK, l'augmentation de l'expression des protéines contractiles α -Actinine, Troponine C et MLC, la diminution de la dégradation du noyau, la prévention de l'ouverture de pores mPTP et l'inhibition des caspases 3 effectrices.

8) Le traitement par les extraits de safran à la reperfusion contrebalance les dommages cardiaques de l'IR et de la DOX. L'effet cardioprotecteur du safran provient de son action anti-apoptotique et anti-oxydante sur les cardiomyocytes. Plus particulièrement, nous suggérons son rôle de piègeur de radicaux libres à la reperfusion plutôt que préventif avant l'ischémie, afin de diminuer les dommages causés par le stress oxydatif.



Perspectives

Comme suite logique aux travaux de cette thèse, il serait intéressant d'étudier l'effet de la doxorubicine et du safran en condition tumorale. Ceci pourrait être réalisable sur un modèle animal porteur de tumeur solide (une xénogreffe sous-cutanée de tumeur chez la souris peut être effectuée) ; ou une leucémie. Le but est de montrer que les extraits de safran possèdent une activité anti-tumorale qui s'ajoute à celle de la doxorubicine sur les cellules cancéreuses tout en préservant le myocarde de la cardiotoxicité de la doxorubicine. Les résultats seront évalués par rapport à la diminution du volume tumoral et le poids corporel. Au niveau cellulaire, on peut préconiser (idéalement) une inhibition de l'apoptose par les extraits de safran dans les cardiomyocytes soumis à la doxorubicine alors que ces mêmes extraits (selon la dose utilisée) seraient capables de déclencher l'apoptose des cellules tumorales.

Au niveau des cardiomyocytes H9c2, une première perspective serait de tenter de confirmer l'implication des voies de signalisation dans la sévérité accrue des lésions de l'IR et la DOX et la protection cardiaque offerte par les extraits bruts du safran ainsi que les composés actifs. Dans ce contexte, il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques pour confirmer le rôle cardioprotecteur de PI3K (inhibée par la wortmannine) et de mTOR (inhibée par la rapamycine). De plus, il semblerait aussi essentiel de tester les mêmes protocoles par western blot sur les niveaux d'expression de BAX, BAD et Bcl-2 qui apparaissent impliqués dans le phénomène de cardioprotection.

Par ailleurs, nous avons rapporté que la production de RLO par IR et DOX ensemble, pourrait être à l'origine de l'exacerbation des dommages cardiaques et que le traitement par le safran à la reperfusion pourrait, par son rôle antioxydant, piéger les RLO. Ainsi, il semblerait approprié, dans ce modèle de cardiomyocytes in vitro, d'évaluer le taux de RLO suite à IR, DOX et SAF. Ceci pourrait être effectué par un marquage fluorescent au dihydroéthidium.

De plus, une identification des cellules en apoptose pourrait être effectuée par cytométrie en flux. Le but étant de compléter l'étude de l'implication de l'apoptose dans la sensibilité accrue du myocarde à l'IR et la DOX et confirmer le rôle protecteur du safran dans la diminution du nombre des cardiomyocytes qui entrent en apoptose.

Références

- Abdullaev FI and Ferenkel GD. Effect of saffron on cell colony formation and cellular nucleic acid and protein synthesis. *Biofactors*. 3:201-204. 1992.
- Abdullaev FI and Frenkel GD. Saffron in Biological and Medical Research. Harwood Academic Publishers, USA. 103-114. 1999.
- Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detect Prev*. 28(6):426-32. 2004.
- Abdullaev FI. Saffron (*Crocus sativus* L.) and its possible role in the prevention of cancer. *Phytochemistry and Pharmacology II*. 8:70-82. 2001.
- Abdullaev FI, Riverón-Negrete L, Caballero-Ortega H, Manuel Hernández J, Pérez-López I, Pereda-Miranda R and Espinosa-Aguirre. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). *J Toxicol In Vitro*. 17(5-6):731-6. 2003.
- Abe K and Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and longterm potentiation. *Phytother Res*. 14:149-152. 2000.
- Abrishami MH. Saffron, From Yesterday Till Today. Amirkabir Publication, UK. 2004.
- Adly A. Oxidative Stress and Disease: An Updated Review. *Research Journal of Immunology*. 3:129-145. 2010.
- Ahmed LA and El-Maraghy SA. Nicorandil ameliorates mitochondrial dysfunction in doxorubicin induced heart failure in rats: Possible mechanism of cardioprotection. *Biochem Pharmacol*. 86(9):1301-10. 2013.
- Ajami M, Eghtesadi S, Pazoki-Toroudi H, Habibey R, Ebrahimi SA. Effect of crocus sativus on gentamicin induced nephrotoxicity. *Biol Res*. 43(1):83-90. 2010.
- Akhondzadeh Basti A, Moshiri E, Noorbala AA, Jamshidi AH, Abbasi SH and Akhondzadeh S. Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: a pilot double-blind randomized trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 31(2):439-42. 2007.
- Alfadda AA and Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*. 2012:936486. 2012.
- Algrech C. Le safran du Quercy. *Revue Quercy recherche*. (1-2-4): 20-27;9-16;18-26. 2001.
- American Cancer Society. The History of Cancer. 2009.
- Amin A, Hamza AA, Bajbouj K, Ashraf SS and Daoud S. Saffron: a potential candidate for a novel anticancer drug against hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2;54(3):857-67. 2011.
- Anversa P, Kajstura J and Olivetti G. Myocytes death in heart failure. *Curr Opin Cardiol*. 11(3):245-51. 1996.

Argaud L, and Ovize M. Myocardial metabolism abnormalities during ischemia and reperfusion. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 2000; 93(1): 87-90.

Aung HH, Wang CZ, Ni M, Fishbein A, Mehendale SR, Xie JT, Shoyama CY and Yuan CS. Crocin from *Crocus sativus* possesses significant anti-proliferation effects on human colorectal cancer cells. *Exp Oncol.* 29(3):175-80. 2007.

Baines CP. The Cardiac Mitochondrion: Nexus of Stress. *Annual Review of Physiology.* 72:61-80. 2010.

Baines, CP, Zhang J, Wang GW, Zheng YT, Xiu JX, Cardwell EM, Bolli R and Ping P. Mitochondrial PKC epsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ Res.* 90(4):390-7. 2002.

Basic Res Cardiol. 78:593-600. 1983.

Basker D. Saffron chemistry. *Medicinal and Aromatic Plants: Industrial Profiles.* 8:45-52. 1999.

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

Bell RM and Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol.* 35(2):185-93. 2003.

Bennasroune A, Gardin A, Aunis D, Cremel G, and Hubert P. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 50, 23-38. 2004.

Betti G and Schmidt M. Valorisation of Saffron. *Proceedings of the Second International Symposium on Saffron Biology and Technology. Acta Horticulturae No. 739. International Society for Horticultural Science.* 2007.

Bhalla V, Willis S and Maisel AS. B-Type Natriuretic Peptide: The Level and the Drug Partners in the Diagnosis and Management of Congestive Heart Failure. *Congestive Heart Failure.* 10: 3-27. 2004.

Bian Y, Sun M, Silver M, Ho K, Marchionni M, Caggiano A, Stone J, Amende I, Hampton T, Morgan J and Yan X. Neuregulin-1 attenuated doxorubicin-induced decrease in cardiac troponins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H1974-H1983. 2009.

Billingham ME, Masson JW, Bristow MR and Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep.* 62:865-972. 1978.

Bishayee A, Thoppil RJ, Waghray A, Kruse JA, Novotny NA, Darvesh AS. Dietary phytochemicals in the chemoprevention and treatment of hepatocellular carcinoma: in vivo evidence, molecular targets, and clinical relevance. *Curr Cancer Drug Targets.* 1;12(9):1191-232. 2012.

Blankenship RE and Hartman H. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem Sci.* 23(3):94-7. 1998.

Blume-Jensen P and Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature.* 411:355-365. 2001.

Bolhassani A, Khavari A, Bathaie SZ. Saffron and natural carotenoids: Biochemical activities and anti-tumor effects. *Biochim Biophys Acta.* 1845(1):20-30. 2014.

Bolli R and Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 79(2):609-34. 1999.

Bonita R and Pradhan R. Cardiovascular toxicities of cancer chemotherapy. *Semin Oncol.* 40:156-67. 2013.

Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 92:1295-302. 2000.

Borutaite V and Brown GC. Mitochondria in apoptosis of ischemic heart. *FEBS Lett.* 24;541(1-3):15. 2003.

Boskabady MH, Shafei MN, Shakiba A and Sefidi HS. Effect of aqueous-ethanol extract from *Crocus sativus* (saffron) on guinea-pig isolated heart. *Phytother Res.* 22(3):330-4. 2008.

Boskabady MH, Shafei MN, Shakiba A, Sefidi HS. Effect of aqueous-ethanol extract from *Crocus sativus* (saffron) on guinea-pig isolated heart. *Phytother Res.* 22(3):330-4. 2008.

Boucher F, Coudray C and Tirard V. Oral selenium supplementation in rats reduces cardiac toxicity of adriamycin during ischemia and reperfusion. *Nutrition.* 11(5):708-11. 1995.

Bozcali E, Dedeoglu DB and Karpuz V. Cardioprotective effects of zofenopril, enalapril and valsartan against ischaemia/reperfusion injury as well as doxorubicin cardiotoxicity. *Acta Cardiologica* 67(1): 87-96. 2012.

Briehl MM, Baker AF, Siemankowski LM and Morreale J. Modulation of antioxidant defenses during apoptosis. *Oncol Res.* 9:281-5. 1997.

Bullard AJ, Govewalla P and Yellon DM. Erythropoietin protects the myocardium against reperfusion injury in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol.* 100(5):397-403. 2005.

Burnette WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112(2):195-203. 1981.

Campos FC, Panis C, de Rossi T, Victorino VJ, Cecchini A and Cecchini R. Aspects related to oxidative stress-mediated toxicity of doxorubicin during chemotherapy treatment. *Applied Cancer Research.* 32(1). 2012.

Cao Z and Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol.* 489:39-48. 2004.

Carocho M and Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 51:15-25. 2013.

Carrière A, Galinier A, Fernandez Y, Carmona MC, Pénicaud L and Casteilla L. Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie *Médecine Sciences* 22:47-53. 2006

Carver J, Schuster S, and Glick J. Doxorubicin cardiotoxicity in the elderly: Old drugs and new opportunities. *Journal Of Clinical Oncology.* 26(19):3159-3165. 2008.

- Chahine R, Oliva L, Huet M and Nadeau R. Electrolysis induced nitro blue tetrazolium reduction in rat heart. *Experimental Toxicologic Pathology*. 49:91-95. 1997.
- Chan KY, Xiang P, Zhou L, Li K, Ng PC, Wang CC, Zhang L, Deng HY, Pong NH, Zhao H, Chan WY and Sung RY. Thrombopoietin protects against doxorubicin induced cardiomyopathy, improves cardiac function and reversely alters specific signalling networks. *Eur J Heart Fail*. 13(4):366-76. 2011.
- Chatterjee K, Zhang J, Hombo N and Karliner J. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology*. 115(2): 155-62. 2010
- Chen SX and Schopfer P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur J Biochem*. 260(3):726-35. 1999.
- Chen Z, Chua CC, Ho YS, Hamdy RC and Chua BH. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280(5):H2313-20. 2001.
- Chiari PC, Bienengraeber MW and Pagel PS. Isoflurane protects against myocardial infarction during early reperfusion by activation of phosphatidylinositol-3-kinase signal transduction: evidence for anesthetic-induced postconditioning in rabbits. *Anesthesiology*. 102(1):102-109. 2005.
- Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T and Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochromes C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio. *Cancer Res*. 62:4592-8. 2002.
- Chou HC, Chen YW and Lee TR. Proteomics study of oxidative stress and Src kinase inhibition in H9C2 cardiomyocytes: a cell model of heart ischemia-reperfusion injury and treatment. *Free Radical Biology and Medicine*. 49:96-108. 2010.
- Cohen MV, Baines CP and Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol*. 62:79-109. 2000.
- Collins L, Zhu T, Guo J, Xiao ZJ and Chen CY. Phellinus linteus sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *British Journal of Cancer*. 95:282-288. 2006.
- Crivellari D, Bonetti M, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rudenstam CM and Thurlimann B. Burdens and benefits of adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil and tamoxifen for elderly patients with breast cancer: the International Breast Cancer Study Group Trial VII. *J Clin Oncol*. 18: 1412-22. 2000.
- Cummings J, Willmott N and Smyth J. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer*. 27:532-5. 1991.
- Cvitkovic-Bertheault F and Rouessé J. Forty years of progress in chemotherapy. *Soins*. 635:16-20. 1999.
- D'Alessandro AM, Mancini A, Lizzi AR, De Simone A, Marroccella CE, Gravina GL, Tatone C and Festuccia C. Crocus sativus stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer. *Nutr Cancer*. 65(6):930-42. 2013.
- DalleDonne I, Milzani A, Contini G and Bernardini R. Colombo Interaction of cardiac α -actinin and actin in the presence of doxorubicin *Experimental and Molecular Pathology*. 56(3):229-238. 1992.

Dalloz F, Maingon P, Cottin Y, Briot F, Horiot JC and Rochette L. Effects of combined irradiation and doxorubicin treatment on cardiac function and antioxidant defenses in the rat. *Free Radic Biol Med*. 26:785-800. 1999.

Daugaardb G, Lassenb U, Biec P, Pedersenb EB, Jensend KT, Abildgaard U, Hessea B and Kjaera A. Natriuretic peptides in the monitoring of anthracycline induced reduction in left ventricular ejection fraction. *The European Journal of Heart Failure*. 7:87-93. 2005.

De Angelis A, Piegari E and Cappetta D. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration. *Circulation*. 121:276-92. 2010.

Depley E, Hatem SN, Andrieu N, De Vaumas C, Henaff M and Rucker-Martin C. Doxorubicin induces slow ceramide accumulation and late apoptosis in cultured adult rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 43:398-407. 1999.

Deshmukh L, Rode S, Wagh P, Thakur P and Bandawane D. Oxidative stress and antioxidants in focus: a review. *Inventi Impact: Molecular Pharmacology*. 2013.

Diamandopoulos GT. Cancer: an historical perspective. Harvard Medical School, USA. *Anticancer Res*. 16:1595-602. 1996.

Dickey JS, Gonzalez Y, Aryal B, Mog S, Nakamura AJ, Redon CE, Baxa U, Rosen E, Cheng G, Zielonka J, Parekh P, Mason KP, Joseph J, Kalyanaraman B, Bonner W, Herman E, Shacter E and Rao VA. Mitotempol and dexrazoxane exhibit cardioprotective and chemotherapeutic effects through specific protein oxidation and autophagy in a syngeneic breast tumor preclinical model. *PLoS One*. 5(8):70575. 2013.

Doroshov JH. Doxorubicin-induced cardiac toxicity. *N Engl J Med*. 324:843-5. 1991.

Dorr R. Chemoprotectants for cancer chemotherapy. *Semin Oncol*. 18:48-58. 1991.

Douglas M and Perry N. Growing Saffron-The Words Most Expensive Spice. *Crop and Food Research*. Publication No. 20. 2003.

Doyle JJ, Neugut AI, Jacobson JS and Hershman DL. Chemotherapy and cardiotoxicity in older breast cancer patients: a population-based study. *J Clin Oncol*. 23:8597-8605. 2005.

Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*. 82(1): 47-95. 2002.

Du Y and Lou H. Catechin and proanthocyanidin B4 from grape seeds prevent doxorubicin-induced toxicity in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol*. 591(1-3): 96-101. 2008

Dumoulin MJ, Chahine R, Mateescu MA and Nadeau R. Comparative antioxidant effects of Ceruloplasmin, SOD and albumin. *Arzneim-Forsch Drug Res*. 46:855-61. 1996.

Dupont J. Dimensions culturelles et culturelles du safran en France. *Empan*. 41:34-38. 2001.

Dziegiel P, Surowiak P, Rabczyński J, Zabel M. Effect of melatonin on cytotoxic effects of daunorubicin on myocardium and on transplantable Morris hepatoma in rats. *Pol J Pathol*. 53(4):201-4. 2002.

Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, Wuskell JP and Loew LM. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*. 53:785-794. 1988.

Elahi MM, Kong YX and Matata BM. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2(5):259-69. 2009.

El-Demerdash E, Ali AA, Sayed-Ahmed MM and Osman AM. New aspects in probucol cardioprotection against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 52(5):411-6. 2003.

Eltzschig HK and Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 17(11):1391-401. 2011.

Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M and Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett*. 100:23-30. 1996.

Esmaeili N, Ebrahimzadeh H, Abdi K and Safarian S. Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. *Pharmacogn Mag*. 7(25):74-80. 2011.

Ewer M. Troponin I Provides Insight Into Cardiotoxicity and the Anthracycline-Trastuzumab Interaction. *Journal of Clinical Oncology*. 28: 3901-3909. 2010.

Farbstein D, Kozak-Blickstein A and Levy AP. Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. *Molecules*. 15(11):8098-8110. 2010.

Fatehi M, Rashidabady T and Fatehi-Hassanabad Z. Effects of *Crocus sativus* petals extract on rat blood pressure and on response induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileum. *J Ethnopharmacology*. 84:199-203. 2003.

Faulkner JA. Terminology for contractions of muscles during shortening, while isometric, and during lengthening. *Journal of applied physiology*. 95 (2): 455-459. 2003.

Favier A. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*. 108-13. 2003.

Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem*. 267:277-94. 2000.

Fiedor J and Burda K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*. 27;6(2):466-88. 2014.

Floyd JD, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC and Perry MC. Cardiotoxicity of cancer therapy. *J Clin Oncol*. 23:7685. 2005.

Fumoleau P, Roché H, Kerbrat P, Bonnetterre J, Fargeot P and Namer M. Cardiac toxicity in operable breast cancer patients after adjuvant chemotherapy with epirubicin : 7-year analysis in 3577 patients of French Adjuvant Study Group trials. *Br Cancer Res Treat*. 76 (1):640. 2002.

Fumoleau P, Roche H, Kerbrat P, Bonnetterre J, Romestaing P, Fargeot P, Namer M, Monnier A, Montcuquet P, Goudier J and Luporsi E. Long term cardiac toxicity after adjuvant epirubicin based chemotherapy in early breast cancer. *Ann Oncol*. 17:85-92. 2006.

Gallois L, Fiallo M, Laigle A, Priebe W and Gamier-Suillerot A. The overall partitioning of anthracyclines into phosphatidyl-containing model membranes depends neither on the drug charge nor the presence of the anionic phospholipids. *Eur J Biochem*. 241:879-87. 1996.

Gao WD, Liu Y and Marban E. Selective effects of oxygen free radicals on excitation-contraction coupling in ventricular muscle. Implications for the mechanism of stunned myocardium. *Circulation*. 94(10):2597-604. 1996.

Garcia-Dorado D and Piper HM. Postconditioning: reperfusion of "reperfusion injury" after hibernation. *Cardiovasc Res*. 69(1):1-3. 2006.

Georgiev V, Ananga A and Tsoleva V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*. 21;6(1):391-415. 2014.

Ghadroost B, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Hajisoltani R, Bandegi AR, Motamedi F, Haghighi S, Sameni HR and Pahlvan S. Protective effects of saffron extract and its active constituent crocin against oxidative stress and spatial learning and memory deficits induced by chronic stress in rats. *Eur J Pharmacol*. 30;667(1-3):222-9. 2011.

Gharanei M, Hussain A, Janneh O and Maddock HL. Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 268(2): 149-56. 2013.

Gharanei M, Hussain A, Janneh O and Maddock HL. Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15;268(2):149-56. 2013.

Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, Minotti G, Sarvazyan N, Sawyer DB. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside. *J Clin Oncol*. 26:3777-3784. 2008.

Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. 115: 500-08. 2005.

Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr Cancer*. 62(7):919-30. 2010.

Gohari AR, Saeidnia S, and Mahmoodabadi MK. An overview on saffron, phytochemicals, and medicinal properties. *Pharmacogn Rev*. 7(13): 61-66. 2013.

Gomez L, Paillard M and Thibault H. Inhibition of GSK3 β by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*. 117(21):2761-2768. 2008.

González-Salazar A, Molina-Jijón E and Correa F. Curcumin protects from cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Cardiovascular Toxicology*, 11(4):357-64. 2011.

Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc. Pharmacol Ther*, 16, 233-8. 2011.

Goyal SN, Arora S, Sharma AK, Joshi S, Ray R, Bhatia J, Kumari S, Arya DS. Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histo-pathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Phytomedicine*. 17(3-4):227-32. 2010.

Gratia S, Kay L and Michellan S. Cardiac phosphoproteome reveals cell signaling events involved in doxorubicin cardiotoxicity. *Journal of Proteomics*, 75(15): 4705-16. 2012.

- Gratia S, Kay L, Michelland S, Sève M, Schlattner U and Tokarska-Schlattner M. Cardiac phosphoproteome reveals cell signaling events involved in doxorubicin cardiotoxicity. *J Proteomics*. 3;75(15):4705-16. 2012.
- Grenier MA and Lipshultz SE. Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Semin Oncol*. 25:72-85. 1998.
- Griffiths EJ and Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 307(1):93-8. 1995.
- Guglin M, Aljayeh M, Saiyad S, Rias A and Anne B. Curtis Introducing a new entity: chemotherapy-induced arrhythmia. *Europace*. 11:1579. 2009.
- Guo R, Lin J, Xu W, Shen N, Mo L, Zhang C and Feng J. Hydrogen sulfide attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibition of the p38 MAPK pathway in H9c2 cells. *Int J Mol Med*. 31(3):644-50. 2013.
- Guo R, Xu W, Lin J, Mo L, Hua X, Chen P, Wu K, Zheng D and Feng J. Activation of the p38 MAPK/NF- κ B pathway contributes to doxorubicin-induced inflammation and cytotoxicity in H9c2 cardiac cells. *Molecular Medicine Reports*. 82(6):1668-1680. 2013.
- Gurevitch J, Frolkis I and Yuhas Y. Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 28:247-252. 1996.
- Gutheil WG, Reed G, Ray A, Anant S and Dhar A. Crocetin: an agent derived from saffron for prevention and therapy for cancer. *Curr Pharm Biotechnol*. 13(1):173-9. 2012.
- Hagar JM and Kloner RA. Reperfusion arrhythmias: experimental and clinical aspects. *Age Reperfusion* 2:1-5.1995
- Hagar JM, Matthews R and Kloner RA. Quantitative two-dimensional echocardiographic assessment of regional wall motion during transient ischemia and reperfusion in the rat. *J Am Soc Echocardiogr*. 8(2):162-74. 1995.
- Halestrap A, Clarke S and Javadov S. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion, a target for cardioprotection. *Cardiovascular Research* .61:372- 385. 2004.
- Halestrap AP, Clarke SJ and Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim Biophys Acta*. 1767(8):1007-31. 2007.
- Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol*. 75(3):637-44. 2013.
- Hamanaka RB and Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. 35(9):505-13. 2010.
- Hamidpour R, Hamidpour S, Hamidpour M, Shahlari M. From the Selection of Traditional Applications to the Novel Phytotherapy for the Prevention and Treatment of Serious Diseases. *J Tradit Complement Med*. 3(4):221-226. 2013.
- Hamm CW. New serum markers for acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 331:607-8. 1994.
- Hanada M, Feng J, and Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*. 1697(1-2):3-16. 2004.

Hande KR. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta.* 1400:173-184. 1998.

Hanna J, Chahine R, Aftimos G, Mounayar A, Nader M and Esseily F. Protective effects of taurine against free radicals damage in the rat myocardium. *Expl Toxic Pathol.* 56:189-94. 2004.

Harada H, Andersen JS, Mann M, Terada N and Korsmeyer SJ. p70S6 kinase signals cell survival as well as growth, inactivating the pro-apoptotic molecule BAD. *Proc Natl Acad Sci.* 98(17):9666-70. 2001.

Hardina R, Gersl V and Klimtova I. Anthracycline induced cardiotoxicity. *Acta Medica.* 43:75-82. 2000.
Hausenloy DJ and Yellon DM. Cardioprotective growth factors. *Cardiovasc Res.* 83(2): 179-94. 2009.

Hausenloy DJ and Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* 15;61(3):448-60. 2004.

Hausenloy DJ and Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res.* 15;61(3):448-60. 2004.

Hausenloy DJ and Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev.* 12(3-4):217-34. 2007.

Hausenloy DJ and Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 35(4):339-41. 2003.

Hausenloy DJ, Duchon MR and Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 60(3):617-25. 2003.

Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM and Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(2):H971-6. 2005.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 70: 240-253. 2006.

Heinrich M, Frei Haller B, Leonti M. A Perspective on Natural Products Research and Ethnopharmacology in Mexico: The Eagle and the Serpent on the Prickly Pear Cactus. *J Nat Prod.* 2014.

Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR and Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* 56 (4), 978-85. 1975.

Hill T. *The Contemporary Encyclopedia of Herbs and Spices: Seasonings for the Global Kitchen* (1st ed.). Wiley, ISBN. 2004.

Hortobágyi GN. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview. *Drugs.* 54(4):1-7. 1997.

Hosono Y, Osada S, Nawa M, Takahashi T, Yamaguchi K, Kawaguchi Y and Yoshida K. Combination Therapy of 5-Fluorouracil with Rapamycin for Hormone Receptor-negative Human Breast Cancer. *Anticancer Research.* 30:2625-2630. 2010.

Hosseinzadeh H and Younesi H. Petal and stigma extracts of *Crocus sativus* L. have antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice. *BMC Pharmacol.* 2:7. 2002.

Hosseinzadeh H, Modaghegh MH and Saffari Z. *Crocus sativus* L. (Saffron) extract and its active constituents (crocin and safranal) on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 6(3):343-50. 2009.

Hosseinzadeh H, Shariaty V, Sameni A, Vahabzadeh M. Acute and sub-acute toxicity of crocin, a constituent of *Crocus sativus* L. (saffron), in mice and rats. *Pharmacologyonline*. 2: 943-951. 2010.

Hosseinzadeh H, Talebzadeh F and Fitoterapia. Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. 76(7-8):722-4. 2005.

Howes RM. The free radical fantasy: a panoply of paradoxes. *Ann NY Acad Sci*. 1067: 22-6. 2006.

Hsiu-Chuan Y, Oberley TD, Vichitbandha S, Ye-Shih HO and StClair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest*. 98:1253-1260. 1996.

Huang C, Zhang X and Ramil JM. Juvenile exposure to anthracyclines impairs cardiac progenitor cell function and revascularization resulting in greater susceptibility to stress-induced myocardial injury in adult mice. *Circulation*. 121:675-83. 2010.

Imenshahidi M, Hosseinzadeh H and Javadvpour Y. Hypotensive effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and its constituents, safranal and crocin, in normotensive and hypertensive rats. *Phytother Res*. 24(7):990-4. 2010

Imenshahidi M, Hosseinzadeh H, Javadvpour Y. Hypotensive effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and its constituents, safranal and crocin, in normotensive and hypertensive rats. *Phytother Res*. 24(7):990-4. 2010.

Institut Jules Bordet. *The History of Cancer*. 2005.

Isaacs RJ, Davies S1, Wells NJ and Harris A. Topoisomerase II α and β as therapy targets in breast cancer. *Anti-Cancer Drugs*. 6:195-211. 1995.

ISO/TS. Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 1: Specification. 3632-1. 2003.

Ivanova D, Bakalova R, Lazarova D, Gadjeva V and Zhelev Z. The Impact of Reactive Oxygen Species on Anticancer Therapeutic Strategies. *Adv Clin Exp Med*. 22(6):899-908. 2013.

Javadov S, Karmazyn M and Escobales N. Mitochondrial permeability transition pore opening as a promising therapeutic target in cardiac diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 330(3):670-8. 2009.

Jeyakumar A, DiPenta J, Snow S, Rayson D, Thompson K, Theriault C and Younis T. Routine cardiac evaluation in patients with early-stage breast cancer before adjuvant chemotherapy. *Clin Breast Cancer*. 12(1):4-9. 2012.

Jomova K and Valko M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur J Med Chem*. 70:102-10. 2013.

Jones RL. Utility of dexrazoxane for the reduction of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 6(10):1311-7. 2008.

Joukar S, Ghasemipour-Afshar E and Sheibani M. Protective effects of saffron (*Crocus sativus*) against lethal ventricular arrhythmias induced by heart reperfusion in rat: a potential anti-arrhythmic agent. *Pharmaceutical Biology*. 51(7):836-43. 2013.

Joukar S, Ghasemipour-Afshar E, Sheibani M, Naghsh N and Bashiri A. Protective effects of saffron (*Crocus sativus*) against lethal ventricular arrhythmias induced by heart reperfusion in rat: a potential anti-arrhythmic agent. *Pharm Biol.* 51(7):836-43. 2013.

Joukar S, Najafipour H, Khaksari M, Sepehri G, Shahrokhi N, Dabiri S, Gholamhoseinian A, Hasanzadeh S. The effect of saffron consumption on biochemical and histopathological heart indices of rats with myocardial infarction. *Cardiovasc Toxicol.* 10(1):66-71. 2010.

Judson I, Verweij J, Gelderblom H, Hartmann JT, Schöffski P and Blay JY. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15(4): 415-23. 2014.

Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, et al. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 113(11):1535-1549. 2004.

Kafi M, Rashed MH, Koocheki A and Mollafilabi A. Saffron (*Crocus sativus* L.), Production and Processing. Center of Excellence for Special Crop, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad. 2002.

Kaklamani VG and Gradishar WJ. Epirubicin versus doxorubicin: which is the anthracycline of choice for the treatment of breast cancer. *Clin Breast Cancer;* 4(1):S26. 2003.

Kamalipour M and Roozbeh A. Cardiovascular effects of saffron: an evidence-based review. *J Tehran Heart Cent.* 6(2):59-61. 2011.

Kang YJ, Chen Y and Epstein PN. Surexpression of doxorubicin cardiotoxicity by over-expression of catalase in the heart of transgenic mice. *J Biol Chem.* 271:12610-6. 1996.

Karagiannis T, Lin A, Ververis K, Chang L, Tang M, Okabe J and El Osta A. Trichostatin A accentuates doxorubicin induced hypertrophy in cardiac myocytes. *Aging.* 2(10):659-68. 2010.

Karimi E, Oskoueian E, Hendra R and Jaafar HZ. Evaluation of *Crocus sativus* L. stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules.* 6:15(9):6244-56. 2010.

Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS and Jeejeebhoy KN. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 31(6):1352-6. 1998.

Kerr JF, Winterford CM and Harmon BV. Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 73(8):2013-2026. 1994.

Khurana S, Piche M, Hollingsworth A, Venkataraman K and Tai TC. Oxidative stress and cardiovascular health: therapeutic potential of polyphenols. *Can J Physiol Pharmacol.* 91(3):198-212. 2013.

Kilgore KS, Friedrichs GS and Johnson CR. Protective effects of the SOD mimetic SC-52608 against ischemia/reperfusion damage in the rabbit isolated heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 26(8):995-1006. 1994.

Kim KH, Oudit GY and Backx PH. Erythropoietin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 324(1):160-9. 2008.

Kimes BW and Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res.* 98:367-381. 1976.

Kloner RA and Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications. *Circulation.* 104(24):2981-9. 2001.

Kloner RA, Ganote CE and Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 54:1496-508. 1974.

Koocheki A. Indigenous knowledge in agriculture with particular reference to saffron production in Iran. *Acta Hort.* 650:175-182. 2004.

Krause KH. Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases. *Jpn J Infect Dis.* 57:S28-29. 2004.

Krischer JP, Epstein S, Cuthbertson DD, Goorin AM, Epstein ML and Lipshultz SE. Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer : The Pediatric Oncology Group experience. *J Clin Oncol.* 15:1544-52. 1997.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* 3:614-620. 1997.

Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Bast R, Gansler T, Holland J and Frei E. *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th edition American Cancer Society, BC Decker, Hamilton. 2003.

Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M and Swierczek-Zieba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules.* 20;19(1):78-101. 2013.

Kusuoka H, Futaki S, Koretsune Y, Kitabatake A, Suga H and Kamada T. Alterations of intracellular calcium homeostasis and myocardial energetics in acute adriamycin-induced heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol.* 18:437-44. 1991.

Ladilov YV, Siegmund B, Balser C and Piper HM. Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res.* 80(1):69-75. 1997.

Lal S, Mahajan A, Ning Chen W and Chowbay B. Pharmacogenetics of Target Genes Across Doxorubicin Disposition Pathway: A review. Bentham Science Publishers Ltd. *Current Drug Metabolism.* 11(1):115-128. 2010.

Lancet. Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group. 355(9217):1757-70. 2000.

Lanza GA, Careri G, and Crea F. Mechanisms of coronary artery spasm. *Circulation.* 124(16):1774-82. 2011.

Lawrie TA, Rabbie R, Thoma C and Morrison J. Pegylated liposomal doxorubicin for first-line treatment of epithelial ovarian cancer. The Cochrane Gynaecological Cancer Group, Royal United Hospital, Education Centre, Bath, UK. *Cochrane Database Syst Rev.* 10:CD010482. 2013.

Le Nard M and De Hertogh AA. Bulb growth and development and flowering. In *The Physiology of Flower Bulbs.* Amsterdam. The Netherlands. Elsevier. 29-44. 1993.

Lebrecht D, Setzer B, Ketelsen UP, Haberstroh J and Walker UA. Time dependent and tissue-specific accumulation of mtDNA and respiratory chain defects in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Circulation*. 108:2423-9. 2003.

Lech K, Witowska-Jarosz J and Jarosz M. Saffron yellow: characterization of carotenoids by high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometric detection. *J Mass Spectrom*. 44(12):1661-7. 2009.

Lecours S, Chahine R, Rochette L and Nadeau R. Production of oxygen free radicals during electrolysis in rat heart. *Free Radicals Biol Med*. 24:573-579. 1998.

Lee BE, Toledo AH, Anaya-Prado R, Roach RR and Toledo-Pereyra LH. Allopurinol, xanthine oxidase, and cardiac ischemia. *J Investig Med*. 57(8):902-9. 2009.

Lee P, Sata M, Lefer DJ, Factor SM, Walsh K, and Kitsis RN. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284, H456-63. 2003.

Lee V, Randhawa AK and Singal PK. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am J Physiol*. 261(4):H989-H995. 1991.

Lefrak E, Piřha J, Rosenheim S and Gottlieb J. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. 32(2):302-314. 2006.

Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE and Hoppel CL. Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280(6): H2770-8. 2001.

Li T and Singal PK. Adriamycin induced early changes in myocardial antioxydant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation*. 102:2105-10. 2000.

Liang Q and Molkentin D. Redefining the roles of p38 and JNK signaling in cardiac hypertrophy: Dichotomy between cultured myocytes and animal models. *J Mol Cell Cardiol*. 35:1385-1394. 2003.

Lips DJ, Bueno OF, Wilkins BJ, Purcell NH, Kaiser RA, Lorenz JN, Voisin L, Saba-El- Leil MK, Meloche S, Pouysségur J, Pagès G, De Windt LJ, Doevendans PA and Molkentin JD. MEK1-ERK2 signaling pathway protects myocardium from ischemic injury in vivo. *Circulation*. 109(16):1938-41. 2004.

Lipshultz SE, Giantris AL, Lipsitz SR, Kimball Dalton V, Asselin BL and Barr RD. Doxorubicin administration by continuous infusion is not cardioprotective: the Dana-Farber 9101 acute lymphoblastic leukemia protocol. *J Clin Oncol*. 20(6):1677-82. 2002.

Lipshultz SE, Lipsitz SR and Sallan SE. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 23:2629. 2005.

Lipshultz SE, Colan SD, Gelber RD, Perez-Atayde AP, Sallan SE and Sanders SP. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med*. 324:808-15. 1991.

Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE and Sanders SP. Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *N Engl J Med*. 332:1738-43. 1995.

Liu J, Mao W, Ding B and Liang C. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295:H1956-H1965. 2008.

Lodish H, Berk A and Zipursky SL. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000.

Logue SE, Gustafsson AB, Samali A and Gottlieb RA. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J Mol Cell Cardiol*. 38:21-33. 2005.

Lubgan D, Marczak A, Walczak M, Distel L and Józwiak Z. Pharmacological mechanisms of Doxorubicin activity (DOX) - current state of knowledge. *Przegl Lek*. 63(9):782-8. 2006.

Lou Q, Li W and Efimov IR. Multiparametric optical mapping of the Langendorff-perfused rabbit heart. *J Vis Exp*. 13:(55). 2011.

Maddock HL, Mocanu MM and Yellon DM. Adenosine A(3) receptor activation protects the myocardium from reperfusion/reoxygenation injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 283(4):H1307-13. 2002.

Magro M, Springeling T, van Geuns RJ and Zijlstra F. Myocardial 'no-reflow' prevention. *Curr Vasc Pharmacol*. 11(2):263-77. 2013.

Marina-Garcia J and Goldenthal MJ. Heart mitochondria signaling pathways: appraisal of an emerging field. *J Mol Med*. 82: 565-78. 2004.

Maruyama S, Shibata R, Ohashi K, Ohashi T, Daida H, Walsh K, Murohara T and Ouchi N. Adiponectin ameliorates doxorubicin induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 1286(37):32790-800. 2011.

Matsui T, Tao J, del Monte F, Lee KH, Li L, Picard M, Force TL, Franke TF, Hajjar RJ and Rosenzweig A. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation*. 104(3):330-5. 2001.

Mauri L, Rogers C and Baim DS. Devices for distal protection during percutaneous coronary revascularization. *Circulation*. 113:2651-6. 2006.

McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ, Jones M and Levitsky S. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 286(5):H1923-35. 2004.

Mehdizadeh R, Parizadeh MR and Khooei AR. Cardioprotective effect of saffron extract and safranal in isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats. *The Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(1): 56-63. 2013.

Mehri S, Abnous K, Mousavi SH, Shariaty VM, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 32(2):227-35. 2012.

Mehta BM, Borkhatriya VN and Boghra VR. Saffron : the colouring and flavouring agent in dairy and food industry. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 24(4):1038-1049. 2002.

Meyer G, Andre L, Tanguy S, Boissiere J, Farah C, Lopez-Lauri F, Gayrard S, Richard S, Boucher F, Cazorla O, Obert P and Reboul C. Simulated urban carbon monoxide air pollution exacerbates rat heart ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 298: H1445-53. 2010.

- Michel MC, Li Y and Heusch G. Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 363(3): 245-66. 2001.
- Minamino T. Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury: basic and translational research. *Circ J.* 76(5):1074-82. 2012.
- Minotti G, Cairo G and Monti E. Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *FASEB J.* 13:199-212. 1999.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 56:185-229. 2004.
- Modaghegh MH, Shahabian M, Esmaili HA, Rajbai O, Hosseinzadeh H. Safety evaluation of saffron (*Crocus sativus*) tablets in healthy volunteers. *Phytomedicine.* 15(12):1032-7. 2008.
- Modaghegha M, Shahabiana M, Esmailib H, Rajbaic O, Hosseinzadehd H. Safety evaluation of saffron (*Crocus sativus*) tablets in healthy volunteers. *Phytomedicine.* 15:1032-1037. 2008.
- Moghaddasi M. Saffron chemicals and medicine usage. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4(6):427-430. 2010.
- Mohamadpour AH, Ayati Z, Parizadeh MR, Rajbai O and Hosseinzadeh H. Safety Evaluation of Crocin (a constituent of saffron) Tablets in Healthy Volunteers. *Iran J Basic Med Sci.* 16(1):39-46. 2013.
- Molina RV, Valero M, Navarro Y, Guardiola JL and Garcia-Luis A. Temperature effects on flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.) *Sci Hort.* 103: 361-379. 2005.
- Monsuez JJ, Charniot JC, Vignat N and Artigou JY. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *Int J Cardiol.* 144:3-15. 2010.
- Montaigne D, Hurt C and Nevier R. Mitochondria Death/Survival Signaling Pathways in Cardiotoxicity Induced by Anthracyclines and Anticancer-Targeted Therapies. *Biochemistry Research International.* 2012.
- Montaigne D, Marechal X and Baccouch R. Stabilization of mitochondrial membrane potential prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in isolated rat heart. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 244(3): 300-7. 2010.
- Moshiri M, Vahabzadeh M, Hosseinzadeh H. Clinical Applications of Saffron (*Crocus sativus*) and its Constituents: A Review. *Drug Res (Stuttg).* 2014.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63. 1983.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Bátkai S, Kashiwaya Y, Haskó G, Liaudet L, Szabó C and Pacher P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 296(5):H1466-83. 2009.
- Murphy JO, Sacchini VS and Minerva Chir. New innovative techniques in radiotherapy for breast cancer. *68(2):139-54.* 2013.
- Nair SC, Pannikar B and Pannikar KR. Antitumor activity of saffron (*Crocus sativus* L.). *Cancer Lett.* 57:109-114. 1991.

Negbi M. Saffron Cultivation: Past, Present and Future Prospects. In: Saffron (*Crocus sativus* L.). Harwood Academic Publisher, USA. 1-18. 1999.

Negoro S, Oh H, Tone E, Kunisada K, Fujio Y, Walsh K, Kishimoto T and Yamauchi-Takahara K. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circulation*. 103(4):555-61. 2001.

Nemati H, Boskabady MH, Ahmadzadeh and Vortakolaei H. Stimulatory effects of *Crocus sativus* (Saffron) on β_2 adrenoreceptors of guinea pig tracheal chains. *Phytomedicine*. 15(10):38-45. 2008.

Niccoli G, Marino M, Spaziani C and Crea F. Prevention and treatment of no-reflow. *Acute Card Care* 12(3):81-91. 2010.

Nicholson DW. ICE/CED3-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nat Biotechnol*. 14:297-301. 1996.

Nielsen D, Maare C and Skovsgaard T. Cellular resistance to anthracyclines. *Gen Pharmacol*. 27:251-5. 1996.

Nousiainen T, Jantunen E, Vanninen E and Hartikainen J. Early decline in left ventricular ejection fraction predicts doxorubicin cardiotoxicity in lymphoma patients. *Br J Cancer*. 86:1697. 2002.

Obrenovich ME, Li Y, Parvathaneni K, Yendluri BB, Palacios HH, Leszek J and Aliev G. Antioxidants in health, disease and aging. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 10(2):192-207. 2011.

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ and Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 52(6):1213-25. 2012.

Oliveira PJ, Bjork JA, Santos MS, Leino RL, Froberg MK and Moreno AJ. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 200:159-68. 2004.

Olli A, Antti S, Kari P, et al. Acute Doxorubicin Cardiotoxicity Involves Cardiomyocyte Apoptosis. *Cancer Res*. 60:1789-1792. 2000.

Olson RD and Mushlin PS. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *FASEB J*. 4:3076–86. 1990.

OMS, 2013. Organisation mondiale de la santé. www.who.int

Ortiz J, Marín-Arroyo MR, Noriega-Domínguez MJ, Navarro M and Arozarena I. Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from Ecuador. *J Food Sci*. 78(7):C985-93. 2013.

Pacher P, Beckman JS, and Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*. 87(1):315-424. 2007.

Pacher P, Liaudet L, Bai P, Mabley JG, Kaminski PM, Virág L, Deb A, Szabó E, Ungvári Z, Wolin MS, Groves JT and Szabó C. Potent metallo-porphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. *Circulation*. 107(6):896-904. 2003.

Padilha M, Henriques M, Guardado MJ, Miranda C, Melo G and Alves P. Neoadjuvant radiotherapy and hormonotherapy in locally advanced breast cancer: state of the art. 25(6):422-6. 2013.

Palmer BS, Hadziahmetovic M, Veci T and Angelos MG. Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation*, 62(1):97-106. 2004.

Pasdois P, Beauvoit B, Tariosse L, Vinassa B, Bonoron-Adele S and Dos Santos P. Effect of diazoxide on flavoprotein oxidation and reactive oxygen species generation during ischemia-reperfusion: a study on Langendorff-perfused rat hearts using optic fibers. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(5):H2088-97. 2008.

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

Perik PJ, De Vries EG, Boomsma F, van der Graaf WT, Sleijfer DT and Veldhuisen DJ. Use of natriuretic peptides for detecting cardiac dysfunction in long-term disease-free breast cancer survivors. *Anticancer Res*. 25(5):3651-7. 2005.

Perron NR and Brumaghim JL. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*. 53(2):75-100. 2009.

Petrosillo G, Ruggiero FM and Di Venosa N. Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J*. 17(6):714-6. 2003.

Pfister S, Meyer P, Steck A and Pfander H. Isolation and Structure Elucidation of Carotenoid-Glycosyl Esters in Gardenia Fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* Linne). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(9):2612-2615. 1996.

Pfizer Laboratories Div Pfizer. Doxorubicin hydrochloride for injection, USP.

Pham-Huy LA, He H, and Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants, in disease and health. *Int J Biomed Sci*. 4(2):89-96. 2008.

Piccinini F. Effets protecteurs de la trimétazidine dur la cardiotoxicité de la doxorubicine. *Concours Med*. 109:3479-83. 1987.

Pierlot G. Le safran. *Chim Ind*. 14(6):1-12. 1925.

Ping P, Zhang J, Cao X, Li RC, Kong D, Tang XL, Qiu Y, Manchikalapudi S, Auchampach JA, Black RG and Bolli R. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol*. 276(5):H1468-81. 1999.

Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia- reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 75:S644-48. 2003.

Pitsikas N, Boultsadakis A, Georgiadou G, Tarantilis PA and Sakellaridis N. Effects of the active constituents of *Crocus sativus* L., crocins, in an animal model of anxiety. *Phytomedicine*. 15(12):1135-9. 2008.

Polovich M, White JM and Kelleher LO. Chemotherapy and biotherapy guidelines and recommendations for practice (2nd. ed.) Pittsburgh, PA: Oncology Nursing Society. 2005.

Poma A, Fontecchio G, Carlucci G and Chichiricò G. Anti-inflammatory properties of drugs from saffron crocus. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 11(1):37-51. 2012.

Pouillart P. Chemotherapy and hormonotherapy of breast cancers. *Médecine oncologique Institut Curie, Paris. Rev Prat.* 48(1):60-6. 1998.

Qi Y, Chen L, Zhang L, Liu WB, Chen XY and Yang XG. Crocin prevents retinal ischaemia/reperfusion injury-induced apoptosis in retinal ganglion cells through the PI3K/AKT signalling pathway. *Exp Eye Res.* 107:44-51. 2013.

Quideau SP, Deffieux D, Douat-Casassus CL and Pouységu L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition.* 50 (3): 586. 2011.

Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS and Baker JE. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol.* 100(3):187-97. 2005.

Rahman A, Yusuf S, and Ewer M. Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *Int J Nanomedicine.* 2(4):567-583. 2007.

Ramond A, Sartorius E and Mousseau M. Erythropoietin pretreatment protects against acute chemotherapy toxicity in isolated rat hearts. *Experimental Biology and Medicine.* 233(1):76-83. 2008.

Razavi BM, Hosseinzadeh H and Movassaghi AR. Protective effect of crocin on diazinon induced cardio.toxicity in rats in subchronic exposure. *Chemico-Biological Interactions,* 203(3):547-55. 2013.

Razavi BM, Hosseinzadeh H and Movassaghi AR. Protective effect of crocin on diazinon induced cardiotoxicity in rats in subchronic exposure. *Chemico-Biological Interactions,* 25; 203(3):547-55. 2013.

Remme WJ and Swedberg K. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J.* 22:1527-60. 2001.

Reynolds JE, Li J and Eastman A. Detection of apoptosis by flow cytometry of cells simultaneously stained for intracellular pH (CarboxySNARF-1) and membrane permeability. 25:349-357. *Cytometry.* 1996.

Roberts MJ, Young IS and Trouton TG. Transient release of lipid peroxides after coronary artery balloon angioplasty. *Lancet.* 336:143-5. 1990.

Robinson DR, Wu YM, and Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 19:5548-5557. 2000.

Roché H. Evolving strategies over time for treatment of breast cancer. *Bull Cancer.* 100(9):857-863. 2013.

Rodel W and Petrzika M. Analysis of the volatile components of Saffron. *J. High Resolution Chromatogr.* 14(11):771-774. 1991.

Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Hofstaetter B, Piper HM and Soler-Soler J. Role of sarcoplasmic reticulum in mitochondrial permeability transition and cardiomyocyte death during reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297(4):H1281-9. 2009.

Rumsey WL, Abbott B, Bertelsen D, Mallamaci M, Hagan K, Nelson D and Erecinska M. Adaptation to hypoxia alters energy metabolism in rat heart. *Am J Physiol* 276:H71-80. 1999.

Ryberg M, Nielsen D, Cortese G, Nielsen G, Skovsgaard T and Andersen PK. New insight into epirubicin cardiac toxicity: competing risks analysis of 1097 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 100:1058. 2008.

Ryberg M, Nielsion D and Skovsgaard T. Epirubicin cardiotoxicity an analysis of 469 patients with metastatic brest cancer. *J Clin Oncol.* 16:3502-8. 1998.

Sachdeva J, Tanwar V and Golechha M. *Crocus sativus* L. (saffron) attenuates isoproterenol-induced myocardial injury via preserving cardiac functions and strengthening antioxidant defense system. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(6): 557-64. 2012.

Sachdeva J, Tanwar V, Golechha M, Siddiqui KM, Nag TC, Ray R, Kumari S and Arya DS. *Crocus sativus* L. (saffron) attenuates isoproterenol-induced myocardial injury via preserving cardiac functions and strengthening antioxidant defense system. *Exp Toxicol Pathol.* 64(6):557-64. 2012.

Sachdeva J, Tanwar V, Golechha M, Siddiqui KM, Nag TC, Ray R, Kumari S, Arya DS. *Crocus sativus* L. (saffron) attenuates isoproterenol-induced myocardial injury via preserving cardiac functions and strengthening antioxidant defense system. *Exp Toxicol Pathol.* 64(6):557-64. 2012.

Saladin K. *Anatomy and Physiology: The Unity of Form and Function*. New York: McGraw Hill. 2012.

Samarghandian S and Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients. *Pharmacognosy Res.* 6(2):99-107. 2014.

Samarghandian S, Borji A. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L) and its ingredients. *Pharmacognosy Res.* 6(2):99-107. 2014.

Sampathu SR, Shivashankar S and Lewis YS. Saffron (*Crocus sativus* Linn.) cultivation, processing, chemistry and standardization. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 20(2):123-157. 1984.

Sardão VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveir CR and Wallace KB. Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide-characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biol.* 8:11-27. 2007.

Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J Nutr.* 137:2171-84. 2007.

Schjott J, Brurok H, Jynge P and Bjerve KS. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid diet supplement on tolerance to the cardiotoxicity of epirubicin and to ischaemia reperfusion in the isolated rat heart. *Pharmacology and Toxicology.* 79(2):65-72. 1996.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103:211-225. 2000.

Schmidt M, Betti G and Hensel A. Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr.* 157:315-9. 2007.

Schwartz BG and Kloner RA. Coronary no reflow. *J Mol Cell Cardiol.* 52:873-82. 2012.

Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z and Pak E. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *J Pharm Sci.* 22(1):102-6. 2009.

Serrano-Díaz J, Sánchez AM, Maggi L, Martínez-Tomé M, García-Diz L, Murcia MA and Alonso GL. Increasing the applications of *Crocus sativus* flowers as natural antioxidants. *J Food Sci.* 77(11):C1162-8. 2012.

Seshadri G, Sy JC, Brown M, Dikalov S, Yang SC, Murthy N and Davis ME. The delivery of superoxide dismutase encapsulated in polyketal microparticles to rat myocardium and protection from myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomaterials.* 31(6):1372-9. 2010.

Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, Hershey JW, Blenis J, Pende M and Sonenberg N. The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *Embo J.* 25(12):2781-91. 2006.

Shen WH, Chen Z, Shi S, Chen H, Zhu W, Penner A, Bu G, Li W, Boyle DW, Rubart M, Field LJ, Abraham R, Liechty EA and Shou W. Cardiac restricted overexpression of kinase-dead mammalian target of rapamycin (mTOR) mutant impairs the mTOR-mediated signaling and cardiac function. *J Biol Chem.* 283(20):13842-9. 2008.

Shikov AN, Pozharitskaya ON, Makarov VG, Wagner H, Verpoorte R, Heinrich M. Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *J Ethnopharmacol.* S0378-8741(14)00282-7. 2014.

Singal PK and Iliskovic N. Doxorubicin induced cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 339:900-05. 1998.

Singal PK, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Thomas TP and Li T. Combination therapy with probucol prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 27(4):1055-63. 1995.

Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T and Martin M. Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med.* The Breast Cancer International Research Group. 365(14):1273-1283. 2011.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1):76-85. 1985.

Solaini G and Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischemia and reperfusion. *Biochem J.* 390(2):377-94. 2005.

Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *CR Biol.* 327:649-62. 2004.

Souchard JP, Arnal JF and Rochette L. Les radicaux libres et le stress oxydatif radicalaire. *Biologie et Pathologie du Coeur et des Vaisseaux Flammarion.* 245-57. 2002.

Spallarossa P, Garibaldi S, Altieri P, Fabbi P, Manca V, Nasti S, Rossettin P, Ghigliotti G, Ballestrero A, Patrone F, Barsotti A, Brunelli C. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 37(4):837-46. 2004.

Spinto P, Seidman C and McKenna W. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *Massachusetts Medical Society. New England Journal of Medicine* 336:775-785. 1997.

Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan TC, Heller G and Murphy ML. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA.* 266:1672-6. 1991.

Stěrba M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V and Simůnek T. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*. 18(8):899-929. 2013.

Stoddard MF, Seeger J, Liddell NE, Hadley TJ, Sullivan DM and Kupersmith J. Prolongation of isovolumetric relaxation time as assessed by Doppler echocardiography predicts Doxorubicin-induced systolic dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol*. 20:62-9. 1992.

Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*. 1(2):1-4. 2009.

Swain S, Whaley FS and Ewer MS. Congestive heart failure in patients with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 97:2869-79. 2003.

Swain SM, Whaley FS, Gerber MC, Weisberg S, York M and Spicer D. Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 15:1318-1332. 1997.

Szuławska A and Czyz M. Molecular mechanisms of anthracyclines action. *Postepy Hig Med Dosw*. 60:78-100. 2006.

Tacar O, Sriamornsak P and Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 65(2):157-70. 2013.

Tait JF. Imaging of apoptosis. *J Nucl Med*. 49:1573-1576. 2008.

Takacs IE, Matkovics B and Varga SI. Study of the myocardial antioxidant defense in various species. *Pharmacological Research*. 25:177-78. 1992.

Takano-Ishikawa Y and Yamaki K. Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*. 13: 310-317. 2006.

Takashi I, Satoko M, Kyoko T, Yasushi F, Stephen WS and Junichi A. Beneficial effect of taurine treatment against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Advances in experimental medicine and biology*. 643:65-74. 2009.

Takemura G and Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*. 49(5):330-52. 2007.

Takimoto E, Champion HC, Li M, Ren S, Rodriguez ER and Tavazzi B. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodelling from chronic pressure load. *J Clin Invest*. 115:1221-31. 2005.

Tannock I, Hill R, Bristow R and Harrington L. The basic science of oncology, 4 ed. New York: McGraw-Hill Health Professions Division. 2004.

Tarantilis PA, Tsoupra G and Polissiou MG. Determination of saffron (*Crocus sativus* L.) components in crude plant extract using high-performance liquid chromatography-UV-visible photodiode-array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 699:107-118. 1995.

Tassigny A, Berdeaux A, Souktani R, Henry P and Ghaleh B. The volume-sensitive chloride channel inhibitors prevent both contractile dysfunction and apoptosis induced by doxorubicin through PI3kinase, Akt and Erk 1/2. *European Journal of Heart Failure*. 10:39-46. 2008.

Tavakkol-Afshari J, Brook A and Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. *Food Chem Toxicol*. 46(11):3443-7. 2008.

Tebbi CK, London WB, Friedman D, Villaluna D, De Alarcon PA and Constine LS. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 25:493-500. 2007.

Teiten MH, Gaascht F, Dicato M, Diederich M. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochem Pharmacol*. 1;86(9):1239-47. 2013.

Teuffel O, Leibundgut K, Lehrnbecher T, Alonzo TA, Beyene J and Sung L. Anthracyclines during induction therapy in acute myeloid leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Br J Haematol*. 161(2):192-203. 2013.

Thakker GD, Frangogiannis N, Bujak M, Zymek P, Gaubatz J, Reddy A, Taffet G, Michael L, Entman M and Ballantyne C. Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(5):H2504-14. 2006.

Thannickal VJ and Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279:L1005-1028. 2000.

Theodoulou M and Hudis C. Cardiac profiles of liposomal anthracyclines : greater cardiac safety versus conventional doxorubicin? *Cancer*. 100:2052-63. 2004.

Therond P. Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). *Ann Pharm Fr*. 64(6):383-9. 2006.

To H, Ohdo S, Shin M, Uchimar H, Yukawa E, Higuchi S, Fujimura A and Kobayashi E. Dosing time dependency of doxorubicin-induced cardiotoxicity and bone marrow toxicity in rats. *J Pharm Pharmacol*. 55(6):803-10. 2003.

Tohda C, Kuboyama T. New perspective in pharmacology brought by studying traditional medicine. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 143(2):73-7. 2014.

Tomás S, Martin S, Olga P, Michaela A, Radomír H and Vladimír G. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological reports*. 61(1):154-71. 2009.

Török B, Röth E, Mezey B, Szabados S and Simor T. Epicardial ECG signals following global myocardial ischaemia.

Tsang A, Hausenloy DJ and Yellon DM. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(1):H2-7. 2005.

Tsimidou M and Biliaderis CG. Kinetic studies of Saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration. *J Agric Food Chem*. 45(8):2890-2898. 1997.

- Uchiyama T, Engelman RM, Maulik N and Das DK. Role of Akt signaling in mitochondrial survival pathway triggered by hypoxic preconditioning. *Circulation*. 109(24):3042-9. 2004.
- Valero V, Perez E and Dieras V. Doxorubicin and taxane combination regimens for metastatic breast cancer : focus on cardiac effects. *Semin Oncol*. 28(12):15-23. 2001.
- Van Dalen EC, Van der Pal HJ, Caron HN and Kremer LC. Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. (4):CD005008. 2009.
- Van der Pal HJ, Van Dalen EC and Hauptmann M. Cardiac function in 5-year survivors of childhood cancer: a long-term follow-up study. *Arch Intern Med*. 170:1247. 2010.
- Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA and Kalyanaraman B. Endothelial nitric oxide synthase dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry*. 36:11293-7. 1997.
- Venditti P, Balestrieri M, De Leo T, and Di Meo S. Free radical involvement in doxorubicin-induced electrophysiological alterations in rat papillary muscle fibers. *Cardiovasc Res*. 38(3):695-702. 1998.
- Ventura-Clapier R and Lombès A. Mitochondries et pathologies. In : P Lacolley. *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux*. J Libbey Eurotext Ed, Paris. pp 241-252. 2007.
- Vincent DT, Ibrahim YF, Espey MG and Suzuki YJ. The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. *Cancer Chemother Pharmacol*. 72(6):1157-68. 2013.
- Volkova M and Russell R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Curr Cardiol Rev*. 7(4):214-20. 2011.
- Wahlqvist ML. Antioxidant relevance to human health. *Asia Pac J Clin Nutr*. 22(2):171-6. 2013.
- Wallace KB, Hausner E, Herman E, Holt GD, MacGregor JT, Metz AL, Murphy E, Rosenblum IY, Sistare FD and York MJ. Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity. *Toxicol Pathol*. 32:106-121. 2004.
- Weinberger V, Minář L and Brančíková D. *Ceska Gynekol*. Modern surgical and biological therapy of breast cancer. 77(6):513-20. 2012.
- Weinstein D M, Mihm M J and Bauer J A. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 294:396-401. 2000.
- Weinstein DM, Mihm MJ and Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol*. 294:396-401. 2000.
- Whelan RS, Kaplinskiy V and Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*. 72:19-44. 2010.
- Winterbourn CC and Kettle AJ. Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome. *Antioxid Redox Signal*. 18(6):642-60. 2013.
- Winterhalter P and Straubinger M. Saffron-renewed interest in an ancient spice. *Food Rev Int*. 16(1):39-59. 2000.

Wojtacki J, Lewicka-Nowak E and Lesniewski-Kmak K. Anthracycline induced cardiotoxicity: clinical course, risks factors, pathogenesis, detection and prevention: review of the literature. *Med Sci Monit.* 6:411-20. 2000.

Wold L, Aberle N and Ren J. Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Detection and Prevention* 29:294-299. 2005.

Xiang P, Deng HY, Li K, Huang GY, Chen Y, Tu L, Ng PC, Pong NH, Zhao H, Zhang L and Sung R. Dexrazoxane protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy: upregulation of Akt and Erk phosphorylation in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol.* 63:343-349. 2009.

Yaoita H, Ogawa K and Maehara K. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation.* 97: 276-281. 1998.

Yeh E and Bickforf CL. Cardiovascular complications of cancer therapy. *J Am Coll Cardiol.* 53:2231-47. 2009.

Yeh E, Tong A, Lenihan D, Yusuf S, Swafford J, Champion C, Durand JB, GibbsH, Zafarmand A and Ewer M. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy. Diagnosis, Pathogenesis, and Management. *Circulation.* 109:3122-3131. 2004.

Yellon DM and Baxter GF. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med.* 9(8):245-9. 1999.

Yellon DM and Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 357(11):1121-35. 2007.

Yen HC, Oberley TD, Vichitbandhas S, Ho YS and Clair DK. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *J Clin Invest.* 98:1253-60. 1996.

Yu SY, Liu L, Li P and Li J. Rapamycin inhibits the mTOR/p70S6K pathway and attenuates cardiac fibrosis in adriamycin-induced dilated cardiomyopathy. *Thorac Cardiovasc Surg.* 61(3):223-8. 2013.

Zambetti M, Moliterni A, Materazzo C, Stefanelli M, Cipriani S and Valagussa P. Long-term cardiac sequelae in operable breast cancer patients given adjuvant chemotherapy with or without doxorubicin and breast irradiation. *J Clin Oncol.* 19:37-43. 2001.

Zhang D, Contu R, Latronico MV, Zhang J, Rizzi R, Catalucci D, Miyamoto S, Huang K, Ceci M, Gu Y, Dalton ND, Peterson KL, Guan KL, Brown JH, Chen J, Sonenberg N and Condorelli G. MTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice. *J Clin Invest.* 120(8):2805-16. 2010.

Zhang S, Liu X and Bawa-Khalfe T. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 18:1639. 2012.

Zhang Y, Kang Y-M, Tian C, Zeng Y and Jia L-X. Overexpression of Nrdp1 in the Heart Exacerbates Doxorubicin-Induced Cardiac Dysfunction in Mice. *PLoS ONE* 6(6):e21104. 2011.

Zhou S, Starkov A, Forberg MK, Leino RL and Wallace KB. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin. *Cancer.* 61:771-7. 2001.

Zucchi R and Danesi R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents.* 3:151-71. 2003.

Zweier JL and Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 70(2):181-90. 2006.

Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*. 263(3):1353-7. 1988.

Annexe

Liste des publications en rapport avec les travaux de la thèse

N Chahine, M Nader, L Duca, L Martiny, R Chahine. Protective effect of saffron against doxorubicin toxicity in H9c2 cardiomyocytes (in process).

N Chahine, H Makhoulf, L Duca, L Martiny, R Chahine. Cardioprotective effect of saffron extracts against acute doxorubicin toxicity in isolated rabbit hearts submitted to ischemia-reperfusion injury. *Journal of Physiology and Biochemistry* (in revision).

N Chahine, J Hanna, H Makhoulf, L Duca, L Martiny, R Chahine. Protective effect of saffron extract against doxorubicin cardiotoxicity in isolated rabbit heart. *Pharmaceutical Biology* 2013, 51(12): 1564-71.

Liste des publications à partir d'autres travaux

N Karaki, C Sebaaly, **N Chahine**, T Faour, A Zinchenko, S Rachid and H Kanaan. The antioxidant and anticoagulant activities of polysaccharides isolated from the brown algae *Dictyopteris polypodioides* growing on the Lebanese coast. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2013, 3(02): 043-051.

F Yassine, S Awada, S Zein, E Krivoruschko, **N Chahine**, Hussein Kanaan. The influence of seasons on the composition and antioxidant activity of polysaccharides of brown algae (*Padina pavonica*) from the Lebanese coast. *Journal of Phytotherapy and Pharmacology* 2012, 1(6): 19-33.

C Sebaaly, N Karaki, **N Chahine**, A Evidente, A yassine, J Habib and H Kanaan. Polysaccharides of the red algae “Pterocladia” growing on the Lebanese coast: Isolation, structural features with antioxidant and anticoagulant activities. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2012, 2(10): 01-010.

Liste des communications en rapport avec les travaux de la thèse

N Chahine, J Hanna, H Makhoulf, L Duca, L Martiny, R Chahine. Protective effect of saffron extract against oxidative damage induced by doxorubicin compared to electrolysis in isolated rabbit heart. 20th LAAS international science conference. Advanced reasearch for better tomorrow Lebanese Association for the advancement of science. Doctoral school of sciences and technology, Lebanese university. 27-29 mars 2014, Beyrouth, Liban.

N Chahine, A Scandolera, L Duca, L Martiny, R Chahine. Saffron, a powerful antioxidant, alleviates doxorubicin toxicity in H9c2 cardiomyocytes. 12th International Conference on Oxidative Stress, Redox States & Antioxidants, International Society of Antioxidants, ISANH Antioxidants. 3 et 4 juillet 2013, Paris, France.

N Chahine, L Duca, L Martiny, R Chahine. Protective effect of saffron extracts against doxorubicin cardiotoxicity. Printemps de la cardiologie, recherche fondamentale et clinique. Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire et de la Société Française de Cardiologie. 18 et 19 avril 2013, Marseille, France.

N Chahine, J Hanna, H Makhoulf, L Duca, L Martiny, R Chahine. Protective effect of saffron extract against oxidative damage induced by doxorubicin compared to electrolysis in isolated rabbit heart. 19th LAAS international science conference. Lebanese Association for the advancement of science. Lebanese American University, 5 et 6 Avril 2013, Beyrouth, Liban.

N Chahine, H Makhoulf, J Habib, F Najjar, R Chahine. Antioxidant activity of saffron *Crocus sativus* L. grown in Lebanon. Annual One day meeting on medicinal chemistry (Med Chem 2012). From rapid dissociation to irreversible inhibition- Optimisation of Drug target. 30 Novembre 2012, Liège, Belgique.

N Chahine, M Salameh, J Hanna, H Makhoulf, L Duca, L Martiny, R Chahine. Doxorubicin cardiotoxicity in isolated rabbit heart submitted to ischemia-reperfusion. 26èmes Journées Franco-belges de Pharmacochimie (JFB 2012), De la conception à la réalisation en pharmacochimie. 24 et 25 mai 2012, Orléans, France.

N Chahine, M Salem, J Hanna, H Makhlouf, L Martiny, R Chahine. Protective effects of aqueous saffron extracts on ischemia/reperfusion inducing oxidative damage in isolated rabbit heart. Annual meeting on medicinal chemistry (MedChem 2011), Emerging Targets and Treatments : Opportunities and Challenges for Drug Design. 25 November 2011, Het Pand, Ghent, Belgique.

Liste des communications à partir d'autres travaux

M Ghabcha, **N Chahine**, H Makhlouf, M Diab, R Chahine. Effect of Saffron on Jurkat T-leukemia cells. 20th LAAS international science conference. Advanced reasearch for better tomorrow Lebanese Association for the advancement of science. Doctoral school of sciences and technology, Lebanese university. 27-29 mars 2014, Beyrouth, Liban.

N Chahine, J Hanna, L Aouezova-Farah, A Chalfoun-Mounayar, R Chahine. Protective effects of taurine against oxidative damage in ischemic reperfused isolated rabbit heart. 47e Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique "Drug discovery and selection". Du 6 au 8 juillet 2011, ENS Lyon, France.

Résumé

Effet protecteur du safran contre la cardiotoxicité de la doxorubicine en condition ischémique

La doxorubicine (DOX) est un médicament très efficace utilisé en chimiothérapie pour traiter de nombreuses tumeurs. Cependant, son utilisation clinique est limitée par des effets secondaires cardiotoxiques sévères causés par une augmentation de production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) et de l'apoptose. De surcroît, une chimiothérapie pourrait être indiquée dans le cadre d'une ischémie cardiaque sous-jacente. Dans cette thèse, nous avons donc examiné au niveau du cœur isolé de lapin et des cardiomyocytes en culture; d'une part, la cardiotoxicité de la DOX en association avec une ischémie/reperfusion (IR) myocardique et d'autre part, la cardioprotection assurée dans ces conditions par un antioxydant naturel puissant, le safran (SAF). D'après les études cardiodynamiques, anatomopathologiques et biochimiques sur des cœurs isolés; il apparaît que le SAF protège significativement le cœur de la toxicité aiguë et chronique de la DOX lors de la reperfusion. De plus, le SAF inhibe l'apoptose induite par IR et DOX en activant la voie de survie AKT/mTOR, en augmentant le niveau de Troponine T et en inhibant l'expression de p-P38. Les études *in vitro* suggèrent que le SAF a un effet protecteur contre les lésions cardiaques de l'IR et de la DOX par réduction de l'apoptose et des RLO. Le SAF active les voies de survie AKT/P70S6K et ERK; augmente l'expression des protéines contractiles; inhibe les pores de transition mitochondrial et diminue l'activité des caspases 3. En outre, l'effet protecteur du SAF serait attribué à la crocine, son métabolite actif principal. Pris ensemble, nos données indiquent que la DOX exacerbe les lésions myocardiques de l'IR. Le traitement par le SAF à la reperfusion pourrait exercer des effets cardioprotecteurs contre la toxicité induite par la DOX via son activité antioxydante. Ainsi, nos travaux sur le safran se révèlent fort intéressants dans le développement d'une stratégie thérapeutique antioxydante potentielle afin de limiter la toxicité cardiaque de la DOX, ouvrant la voie à de futurs essais cliniques.

Mots clés: Antioxydants, stress oxydatif, anthracycline, ischémie, cardiotoxicité.

Abstract

Protective effect of saffron against doxorubicin cardiotoxicity in ischemic conditions

Doxorubicin (DOX) is a highly active chemotherapeutic drug used to treat many tumors. However, its clinical use is limited by severe cardiotoxic side effects. Previous studies have shown that DOX-induced cardiotoxicity is mainly mediated through increased oxidative stress and apoptosis. In addition, DOX could be indicated in the context of a myocardial ischemia. In this thesis we investigated, in isolated rabbit heart and cultured cardiomyocytes, the cardiotoxic effects of DOX in conditions of ischemia/reperfusion (IR). We also studied whether saffron (SAF), a natural compound that showed potent antioxidant activity, could exert cardioprotection against DOX and IR toxicity. According to cardiodynamic, pathological and biochemical studies on isolated hearts, it appears that SAF protect the heart significantly from the acute and chronic toxicity of DOX during reperfusion. Furthermore, SAF inhibited IR and DOX-induced apoptosis by activating the AKT/mTOR survival pathway, increasing Troponine T and inhibiting p-P38 expression. *In vitro* studies suggested that SAF has a protective effect against IR and DOX-induced cardiac apoptosis through scavenging free radicals and reducing oxidative stress. SAF cardioprotection is mediated by activating AKT/P70S6K and ERK survival pathways; increasing contractile proteins expression; inhibiting mitochondrial permeability transition pore and decreasing caspase 3 activity. In addition, protective activities of SAF belong to crocin, its major active metabolite. Taken together, our findings indicate that DOX exacerbates IR myocardial injury. The SAF treatment at reperfusion could exert cardioprotective effects against DOX induced toxicity by its antioxidant activity. Thereby, saffron offers a potential novel antioxidant therapeutic strategy to counteract doxorubicin cardiotoxicity, paving the way for future clinical trials.

Key words: Antioxidant, oxidative stress, anthracycline, ischemia, cardiotoxicity.

Discipline

Physiopathologie

Unité de recherche

Laboratoire Stress Oxydatif et Antioxydants SOA
Faculté de médecine et École doctorale EDST
Université Libanaise
Campus Rafic Hariri
Hadath, Beirut, Liban

UMR CNRS / URCA 7369
Matrice Extracellulaire et Dynamique Cellulaire MEDyC
Laboratoire SiRMA, UFR Sciences Exactes et Naturelles
Université de Reims Champagne-Ardenne
Campus Moulin de la Housse, 51687 Reims, France