



(12) FASCICULE DE BREVET

- (11) N° de publication : **MA 34205 B1** (51) Cl. internationale : **A61K 36/00; A61P 35/00; A61P 35/04**
- (43) Date de publication : **02.05.2013**

-
- (21) N° Dépôt : **34310**
- (22) Date de Dépôt : **28.10.2011**
- (71) Demandeur(s) : **UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH, Universite sidi Mohamed ben Abdellah, INPMA Commune Mezraoua, Taounate FES (MA)**
- (72) Inventeur(s) : **Amal ELHAMSAS EL YOUBI ; Dalila BOUSTA ; Abdeslam ENNABILI**
- (74) Mandataire : **DALILA BOUSTA**

-
- (54) Titre : **Elaboration d'un antioxydant/antiprolifératif naturel à base de macérât aqueux de Tetraena.gaetula (Emb & Maire) Beier & Thulin.**
- (57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE L'ÉLABORATION D'UN PHYTOMÉDICAMENT ANTIOXYDANT ET ANTIPROLIFÉRATIF NATUREL SOUS FORME D'UNE SOLUTION INJECTABLE À BASE D'UNE PLANTE MÉDICINALE, ENDÉMIQUE DU MAROC ET RÉCOLTÉE DANS LA RÉGION BOUDNIB DE LA PROVINCE D'ERRACHIDIA (SUD DU MAROC). CE PHYTOMÉDICAMENT EST OBTENU PAR MACÉRATION AQUEUSE À FROID DE TETRAENA GAETULA (ZYGOPHYLLUM GAELULUM). SÉLECTIONNÉE SOIGNEUSEMENT À LA BASE D'ENQUÊTES ETHNOPHARMACOLOGIQUES RÉALISÉES DANS QUATRE RÉGIONS DU MAROC (FÈS-BOULMANE, MEKNÈS-TAFILALT, MARRAKECH-TENSIFT-HAOUZ ET TANGER-TÉTOUAN). DANS UN PREMIER TEMPS, CE MACÉRÂT, DOSÉ À 300 MG/KG DE POIDS CORPOREL (P.C.) DE LA SOURIS SWISS, EST ÉVALUÉ PAR VOIE INTRAPÉRITONÉALE ; LE POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA PROLIFÉRATION CELLULAIRE ANARCHIQUE EST DE L'ORDRE DE 85% AVEC UN ARRÊT DU CYCLE CELLULAIRE AU STADE G0/GL ET UNE APPARITION D'UN PIC PRÉ-G0/G1 (14%) CORRESPONDANT AUX CELLULES EN PHASE D'APOPTOSE. DANS UN DEUXIÈME TEMPS. LE MACÉRÂT AQUEUX DE T GAETULA À 300 MG/KG A MONTRÉ UNE ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE DOSE-DÉPENDANTE AVEC UNE IC 50 DE L'ORDRE DE 0.8 MG/ML ET UNE ACTIVITÉ APOPTOTIQUE IMPORTANTE AVEC L'APPARITION DES CELLULES AU STADE PRÉCOCE D'APOPTOSE [PR-AP : 7%] ET UN STADE DE NÉCROSE [NEC : 3%] CETTE INVENTION APPORTE UNE ORIGINALITÉ EN

MATIÈRE DU CANCER, PAR L'ÉLABORATION DE MÉDICAMENT NATUREL À LA FOIS ANTIOXYDANT ET ANTIPROLIFÉRATIF, EN TANT QUE THÉRAPEUTIQUE COMPLÉMENTAIRE À LA MÉDICATION CHIMIOTHÉRAPIQUE EXISTANTE.

02 MAI 2013

Elaboration d'un antioxydant/antiprolifératif naturel à base de macérât aqueux de *Tetraena. gaetula* (Emb. & Maire) Beier & Thulin

Amal EL HAMSAS EL YOUBI, Dalila BOUSTA, Abdeslam ENNABILI

Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, Commune de Mezraoua

34 025 Maroc, Université sidi Mohammed ben Abdellah, Fès 30 000 Maroc.

ABREGÉ:

La présente invention concerne l'élaboration d'un **phytomédicament antioxydant** et **antiprolifératif naturel** sous forme d'une solution injectable à base d'une plante médicinale, endémique du Maroc et récoltée dans la région Boudnib de la province d'Errachidia (Sud du Maroc). Ce phytomédicament est obtenu par macération aqueuse à froid de *Tetraena gaetula* (*Zygophyllum gaetulum*), sélectionnée soigneusement à la base d'enquêtes ethnopharmacologiques réalisées dans quatre régions du Maroc (Fès-Boulmane, Meknès-Tafilalt, Marrakech-Tensift-Haouz et Tanger-Tétouan).

Dans un premier temps, ce macérât, dosé à 300 mg/kg de poids corporel (p.c.) de la souris swiss, est évalué par voie intrapéritonéale ; le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire anarchique est de l'ordre de **85%** avec un arrêt du cycle cellulaire au stade G0/G1 et une apparition d'un pic **pré-G0/G1 (14%)** correspondant aux cellules en phase d'apoptose.

Dans un deuxième temps, le macérât aqueux de *T. gaetula* à 300 mg/kg a montré une activité antioxydante dose-dépendante avec une IC 50 de l'ordre de **0.8 mg/ml** et une activité apoptotique importante avec l'apparition des cellules au stade précoce d'apoptose [Pr-AP : **7%**] et un stade de nécrose [Nec : **3%**]

Cette invention apporte une originalité en matière du cancer, par l'élaboration de médicament naturel à la fois antioxydant et antiprolifératif, en tant que thérapeutique complémentaire à la médication chimiothérapique existante.

La présente invention se rapporte au domaine de la santé et particulièrement à celui de la cancérologie. Elle apporte une originalité à l'existant en matière du cancer en élaborant un médicament antiprolifératif et antioxydant naturel, efficace et dénué de toxicité.

Etat de la technique antérieure

L'activité anticancéreuse et apoptotique de *T. gaetula* n'a jamais été étudiée antérieurement. Les investigations toxico-pharmacologiques au stade préclinique en général, et antiprolifératifs en particulier, de l'espèce sélectionnée dans cette invention n'ont jamais fait l'objet de travaux scientifiques. Néanmoins, cette espèce a été démontrée active pour d'autres effets biologiques. Certaines activités de l'extrait de *T. gaetula* ont été étudiées, telles des activités antidiabétique [5, 6], anti-diarrhéique et antispasmodique [7]. D'autres activités ont été mises en évidence, à savoir les effets anti-inflammatoire [8], antipyrétique [9], analgésique, immunomodulatrice et antidépresseur [10].

La constitution chimique du macérât de *T. gaetula* est caractérisée par la présence de saponines, type triterpénoïde, connus par leurs effets cytotoxiques et anticancéreux [11].

- Description détaillée de l'invention

Les activités antiproliférative et antioxydante de *T. gaetula*, étudiées dans le cadre de cette invention, concernent les investigations toxicologiques et pharmacologiques *in vivo* au stade préclinique. D'autres évaluations d'ordre phytochimique de l'extrait de *T. gaetula* ont été entreprises.

- Design expérimental

Exemple 1 : Récolte et identification de *Tetraena gaetula*

Cette espèce est récoltée ans la région de Boudnib (Errachidia, Sud du Maroc) durant la saison de végétation 2007. Un spécimen de la plante est déposé à l'herbier de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques, Mezraoua 34025 Maroc (exsiccata N° INP210).

DESCRIPTION

- Contexte:

Le cancer constitue à l'heure actuelle, la seconde cause de mortalité après les accidents cardiaques dans presque tous les coins du monde. Cette pathologie est caractérisée par une prolifération anarchique des cellules altérées au niveau de leurs matériels génétiques. Ces cellules se divisent de manière incontrôlée et ont la capacité d'envahir et de détruire les tissus environnants. Au Maroc et d'après les données de L'Institut National d'Oncologie de Rabat, 30.000 à 40.000 nouveaux cas atteints de cancer sont enregistrés chaque année, dont 7,2% sont imputés au cancer [1].

Plusieurs types de traitements contre le cancer sont actuellement en usage, y compris la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie (parfois associée à un des traitements précités). Parmi ces différentes approches thérapeutiques, la chimiothérapie demeure un traitement de première intention pour les étapes avancées. Il est cependant regrettable que la thérapie anticancéreuse utilisée jusqu'à nos jours manifeste sa cytotoxicité sur le tissu tumoral sans respecter les tissus sains. Ce manque de sélectivité est à l'origine d'une toxicité et d'effets secondaires souvent sévères. Par exemple, certains types de traitements chimiothérapeutiques, comme l'administration de la carmustine, la lomustine, l'Ara-C, le cyclophosphamide et la daunorubicine, entraînent une toxicité potentielle du foie. En plus, la résistance au traitement chimiothérapeutique constitue un autre problème fort inquiétant. Le problème qui se pose alors en cancérologie réside dans la découverte de drogues efficaces et peu ou pas toxiques.

Les substances d'origine végétale figurent parmi les anticancéreux majeurs ; il convient de citer la vinblastine et la vincristine isolées de *Catharanthus roseus*, le céleptium dérivé de l'ellipticine isolée d'*Ochrosia elliptica* [2], l'étoposide et le téniposide dérivés de la podophylodoxine isolée de *Podophyllum peltatum* [3] et le taxol de *Taxus brevifolia* [4]. Dans le même sens, les espèces appartenant à la famille des Zygophyllacées sont caractérisées par leurs vertus thérapeutiques et sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour guérir plusieurs pathologies. Par exemple, *T. gaetula*, espèce endémique du Maroc, est utilisée pour des indications thérapeutiques variées comme les affections gastro-intestinales, hépatiques et antidiabétiques.

Exemple 2 : Préparation du macérât de *T. gaetula*

La biomasse collectée de cette espèce est séchée à l'air libre. Après, elle a été broyée et réduite en poudre. Ensuite, une macération aqueuse de *T. gaetula* à 12% a été préparée dans du tampon phosphate salin (PBS, pH 7,4), suivi d'une agitation pendant 2 h. L'ensemble est gardé pendant une nuit à 4°C. La solution est centrifugée à 2700 g durant 15 min, et le surnageant est filtré. L'extrait obtenu après filtration est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Exemple 3 : Criblage phytochimique du macérât

Ces essais consistent à mettre en évidence la présence d'un certain nombre de groupes chimiques des extraits aqueux de *T. gaetula*, réputés pour leurs effets pharmacologiques étudiés. Les réactifs de caractérisation utilisés nous ont permis de mettre en évidence les groupes chimiques suivants : Les alcaloïdes (Dragendorff et de Mayer), noyau tropolone, saponines-triterpénoïdes (Liebermann Burchard), caroténoïdes-triterpènes (Carr et Price), coumarines, flavonoïdes (Cyanidine), tanins (chlorure ferrique), quinones (Borntraeger), anthraquinones, anthocyanes.

La révélation des composés chimiques dans le macérât aqueux de *T. gaetula* met en évidence l'absence de toutes les familles chimiques étudiées à l'exception d'alcaloïdes à noyau tropolone, de saponosides, de flavonoïdes et des traces d'alcaloïdes de type "base" (**Tableau1**).

Plante	Alcaloïdes		Coumarines		Alcaloïdes à noyau Tropolone	Quinones	Anthraquinones	Anthocyanes	Saponines Triterpénoïdes	Flavonoïdes	Caroténoïdes-Triterpènes
	Réactif de Mayer "Sels"	Réactif de dragendorff "bases"	CC M	Tubes							
<i>T. gaetula</i>	-	t	-	-	+	-	-	-	+++	++	-

Tableau 1 : Screening phytochimique du macérât aqueux de *T. gaetula*.

NB : la présence des composés chimiques est : (+++) importante, (++) modérée, (+) légère, t: trace.
 (-) absence

Exemple 4: Activité antioxydante

L'activité anti-oxydante du macérât est étudiée par le biais de la méthode du 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) [12, 13]. Les antioxydants de référence tels l'acide ascorbique et l'hydroxytoluène butylé (BHT), et les extraits testés sont ajoutés à la solution de DPPH à différentes concentrations. Ensuite, l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm, 30 min après l'ajout des extraits. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés en utilisant la formule suivante [14]:

$$\% \text{ d'inhibition} = \left\{ \frac{\text{Absorbance (témoin)} - \text{Absorbance (antioxydant)}}{\text{Absorbance (témoin)}} \right\} \times 100$$

Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, deux autres paramètres ont été calculés [15]:

- Concentration effective à 50 % (EC₅₀) : EC₅₀= IC₅₀/ masse DPPH en mg
- Pouvoir antiradicalaire (APR) : APR= 1/EC₅₀

Nous avons noté que le macérât de *T. gaetula* possède une activité antioxydante dose-dépendante (**Figure 1**). Le pouvoir antioxydant de *T. gaetula* est important avec une IC₅₀ de 0.8 mg/ml et un APR de 0.047 mg/ml (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Activité antioxydante du macérât aqueux de *T. gaetula*.

	IC ₅₀ (mg/ml)	EC ₅₀	APR
<i>T. gaetula</i>	0,855 ± 0.05	21.37 ± 0.002	0.047 ± 0.000
Acide ascorbique	0.055 ± 1.75	1.37 ± 0.1667	0.72 ± 0.002
Butylhydroxytoluene (BHT)	0.07 ± 1.05	1.75 ± 0.07	0.57 ± 0.01

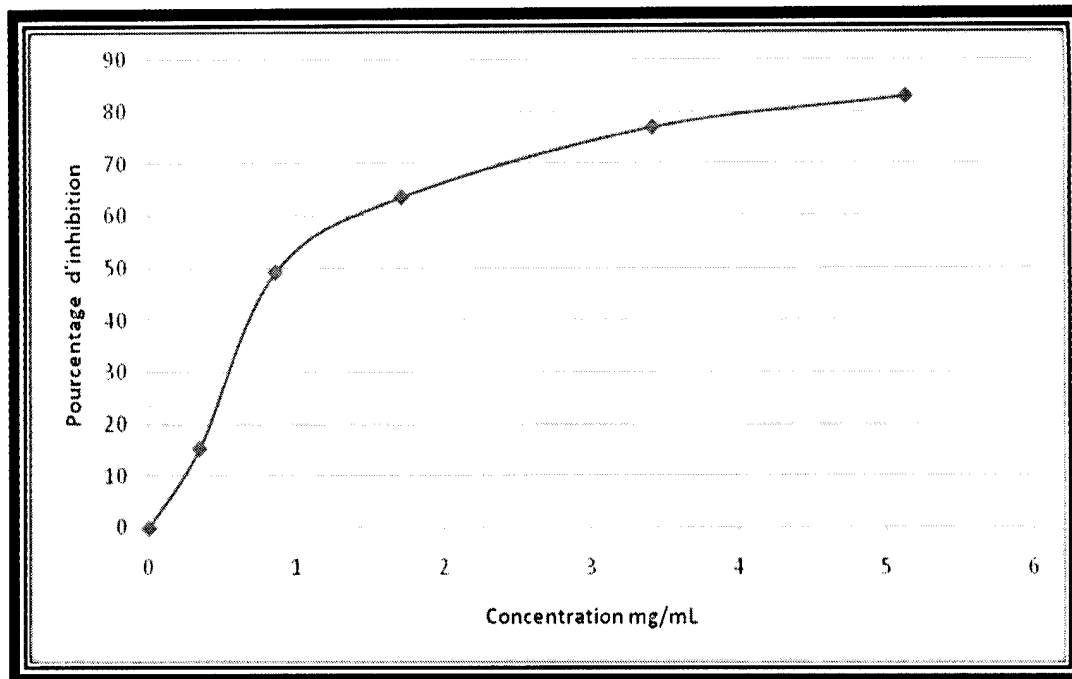


Figure 1: Activité antioxydante du macérât aqueux de *T. gaetula*, exprimée par l'inhibition de l'activité radicalaire du DPPH.

Exemple 5: Activité apoptotique

Vingt quatre heures après le traitement avec le macérât de *T. gaetula*, les animaux sont anesthésiés par voie intrapéritonéale "i.p" par du pentobarbital sodique à raison de 30 mg/kg p.c. Le sang est récupéré dans des tubes héparinés ; les hématies sont lysées par l'ajout du chlorure d'ammonium. Les cellules ajustées à $5 \cdot 10^6$ cellules/ml sont incubées avec $1 \mu\text{l}$ d'annexine V-FITC et $5 \mu\text{l}$ de l'iodure de propidium (IP) pendant 15 min à l'obscurité et au froid. Après l'incubation, $400 \mu\text{l}$ de tampon "binding" a été ajouté. Le pourcentage des cellules pré-apoptotiques, post-apoptotiques et nécrotiques est déterminé par l'analyse au Cytomètre en flux (CMF) (cytomètre en flux de type Epics-XL MC). L'acide butyrique (5 mg/kg p.c) a été utilisé comme substance de référence [16].

D'après cette étude, nous avons souligné une corrélation significative entre l'administration du macérât de *T. gaetula* et l'induction de la mort cellulaire en comparaison avec le lot témoin. Nous notons un stade précoce d'apoptose [Pr-AP : 7%] et un stade de nécrose [Nec : 3%] après l'administration de la dose 300 mg/kg (**Figure 2**).

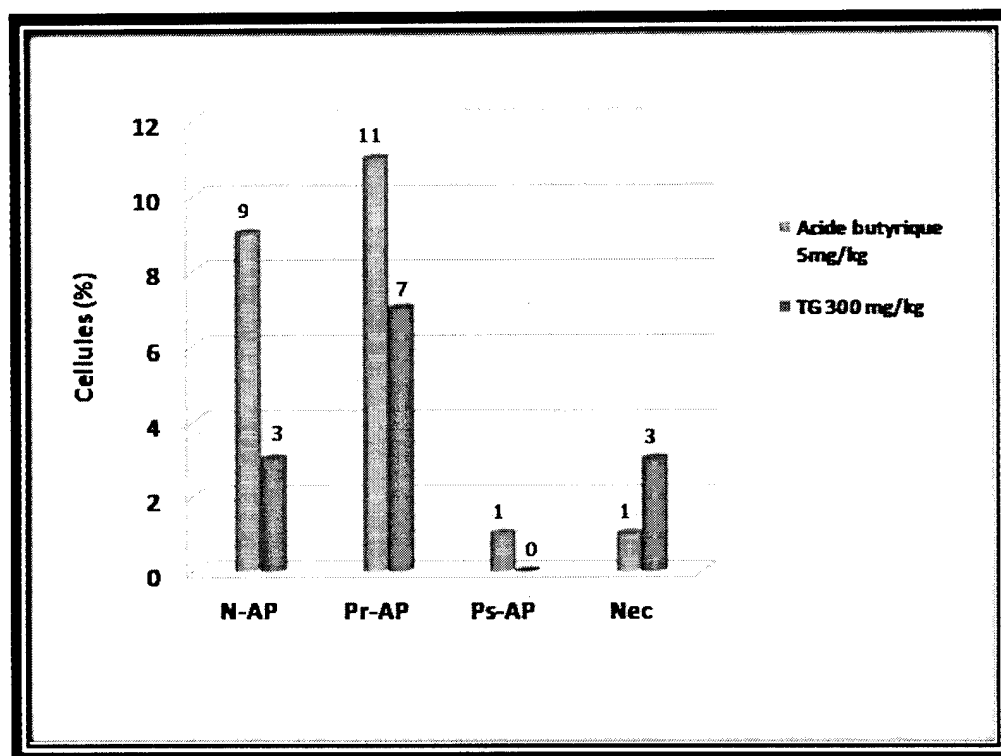


Figure 2: Effet du macérât aqueux de *T. gaetula* sur l’apoptose des cellules leucocytaires, détectée par un co-marquage à l’annexine V-FITC/IP. Les valeurs représentent les pourcentages cellulaires en phases d’apoptose et de nécrose. N-Ap: non apoptotiques, Pr-Ap: pro-apoptotiques, Ps-Ap: post-apoptotiques, Nec: nécrotiques.

Exemple 6: Cycle cellulaire

La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été étudiée par cytométrie en flux en utilisant le kit DNA Prep (Immunotech, France). Cette méthode consiste à marquer l’ADN par l’IP qui s’intercale entre les bases de l’ADN après la dégradation de l’ARN par l’ARNase. Cette technique révèle les différents stades de multiplication cellulaire: pré-G0/G1 :(<2N); G0/G1 : (=2N); S : (2<N<4), G2/M : (= 4N).

Au cours de cette étude, nous avons testé les effets de *T. gaetula* sur la prolifération cellulaire anarchique induite *in vivo* par l’utilisation de l’H₂O₂ [17]. En effet, les animaux ont été repartis en quatre lots de 5 animaux chacun. Chaque lot reçoit pendant quatre jours les traitements cités ci-dessous:

- Lot I : NaCl 0.9%,

- Lot II: H₂O₂ à la dose de 34 mg/kg (p.c),
- Lot III: macérât de *T. gaetula* ; trente minutes après, les animaux reçoivent un second traitement par l'H₂O₂.

Dans ce sens, l'administration du macérât de *T. gaetula* à 300 mg/kg p.c. provoque un arrêt du cycle cellulaire leucocytaire au stade G1 avec une induction d'apoptose au stade pré-G0/G1, correspondant aux cellules caractérisées par une quantité d'ADN (N<2) [pré-G0/G1 : 14 % ; G1 : 85%] en comparaison avec le lot traité à l'H₂O₂ [G1 : 57% ; S : 22% et G2/M : 21%] (Figures 3 et 4).

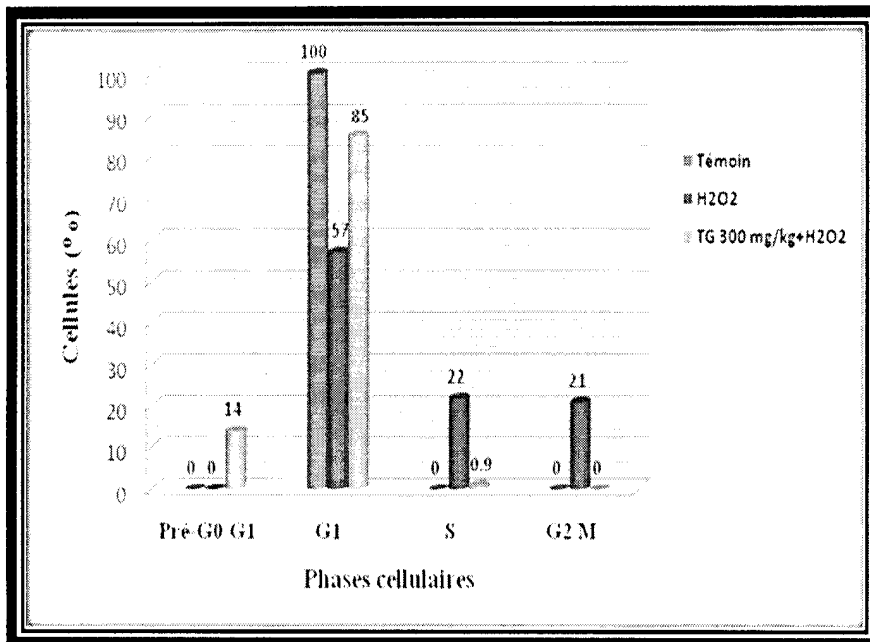


Figure 3 : Effet du macérât aqueux de *T. gaetula* sur le cycle cellulaire des leucocytes murins. Les valeurs représentent les pourcentages cellulaires à différentes phases du cycle cellulaire.

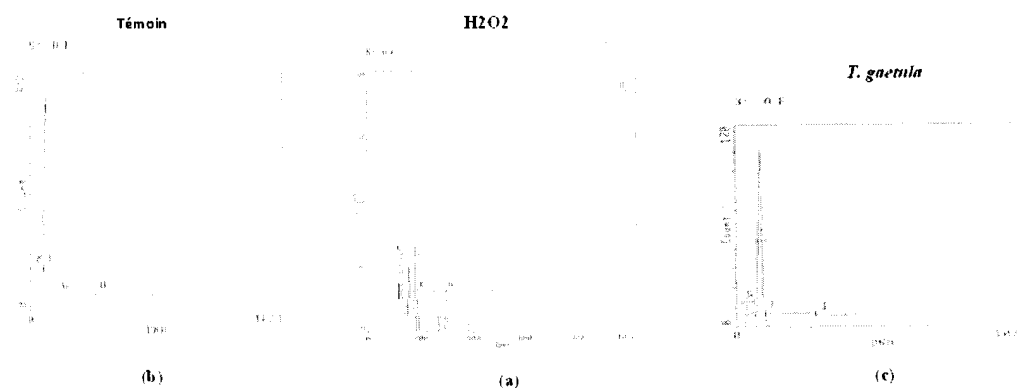


Figure 4 : Effet du macérât aqueux de *T. gaetula* (c) sur la quantité d'ADN des leucocytes murins, détectée par un marquage à l'IP en comparaison avec un lot traité à l'H2O2 (b) et un lot traité au NaCl 0.9% (a).

Exemple 7 : Etude toxicologique du macérât de *T. gaetula*

Cette invention ne montre aucun effet indésirable après un traitement unique et réitéré par voie i.p avec le macérât de *T. gaetula* (Tableau 3). Nous n’avons noté aucune modification au niveau :

- du comportement général de l’animal,
- de l’aspect morphologique du foie, de l’estomac et des reins,
- et des poids relatifs des organes en comparaison avec le lot des rats traités avec du NaCl 0.9%,

Tableau 3 : Effet du macérât aqueux de *T. gaetula* sur le poids relatif du foie, de la Rate, de l’estomac et du Rein. N=5 pour chaque groupe

Poids des organes	Foie	Rate	Estomac	Rein
Contrôle	54,122 ± 1,098	2,897 ± 0,458	20.039 ± 0,405	5,221 ± 0,266
Traité	53.822± 3.852	3.6165 ± 0,258	19.7± 3,764	5.229± 0,104

NB : résultats présentés en moyenne ± SEM

Selon la méthode décrite par Miller & Tainter [18], nous avons déterminé la dose létale 50% du macérât de *T. gaetula*. La DL₅₀ a été estimée graphiquement à **1.2 g/kg (Figure 5)**. Par conséquent, la dose 300 mg/kg représente la dose infratoxique.

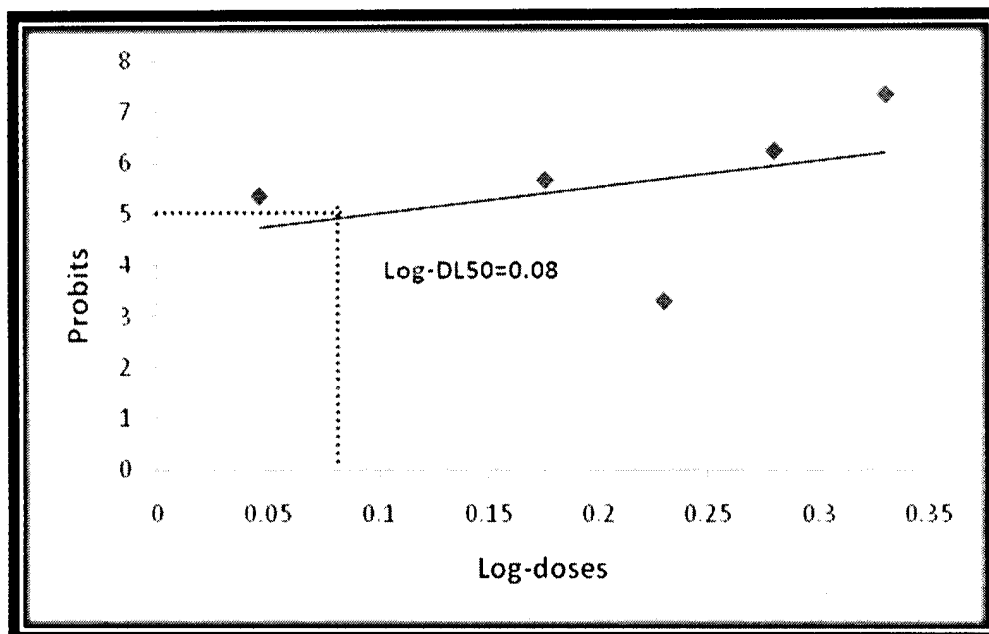


Figure 5: Log-doses en fonction de Probits pour calculer la DL50 de *T. gaetula* administrée par voie intrapéritonéale.

REVENDEICATIONS

1. Une enquête ethnopharmacologique a été menée dans quatre régions du Maroc, y compris les régions de Fès-Boulmane, de Meknès-Tafilalt, de Marrakech-Tansift-Haouz et de Tanger-Tétouan.
2. La plante utilisée, selon la revendication 1, dans le traitement du cancer représentent 49 % de l'ensemble des pathologies traitées par la médecine traditionnelle.
3. Selon les revendications 1 et 2, la famille des *Zygophyllaceae* est la plus utilisée dans les régions de l'étude, principalement celle de Meknès-Tafilalt.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que, l'espèce étudiée dans la présente invention est *Tetraena gaetula*.
5. Suivant les revendications 1 à 4, la partie aérienne de *Tetraena gaetula* est récoltée dans la région de Boudnib (Errachidia, Sud du Maroc), séchée et broyée.
6. Selon la revendication 5, l'extraction des principes actifs est effectuée par macération à froid, suivi d'une agitation pendant 2 h.
7. Le macérât gardé pendant une nuit à 4°C, selon la revendication 6, est centrifugé (2700 g durant 15 min) et filtré.
8. Le résidu sec selon les revendications 1 à 7, est récupéré avec un rendement de **18.943 %**.
9. Le macérât, selon la revendication 8, a subi ensuite un ensemble de tests phytochimiques.
10. Le pouvoir antioxydant du macérât, selon la revendication 8, est évalué.
11. Une gamme de concentrations du macérât, selon la revendication 8, est destinée pour des études toxicologiques.
12. Les différentes concentrations du macérât, selon la revendication 8, sont administrées aux souris "Swiss" par voie intra-péritonéale "i.p".
13. La dose administrée de chaque concentration de macérât, selon la revendication 8, est en fonction du poids corporel de l'animal p.c.

14. Après l'évaluation des doses toxiques et thérapeutiques, la dose 300 mg/kg, p.c. du macérât, selon les revendications de 1 à 13, est étudiée *in vivo* pour son activité antiproliférative.
15. Selon la revendication 14, l'activité antiproliférative a été évaluée par l'utilisation du kit Annexine V-FITC/IP (iodure de propidium).
16. Le pourcentage des cellules apoptotiques, selon la revendication 15, est déterminé par l'analyse au Cytomètre en Flux (CMF) (type Epics-XL MC).
17. Selon les revendications 14 à 16, le pourcentage apoptotique du macérât à la dose 300 mg/kg (p.c), est de l'ordre de 7% pour un stade précoce d'apoptose et 3% pour un stade de nécrose, après 24 h de l'administration du macérât.
18. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le suivi du cycle d'ADN des leucocytes après traitement avec le macérât est évalué.
19. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'effet anticancéreux, est traduit par l'arrêt de la prolifération anarchique des cellules endommagées dans des stades avancés du cycle cellulaire.
20. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été étudiée par cytométrie en flux en utilisant le kit DNA Prep (Immunotech, France).
21. Utilisation selon la revendication la revendication 20, caractérisée en ce que l'ADN est marqué par l'IP, qui s'intercale entre les bases de l'ADN après la dégradation de l'ARN par L'ARNase.
22. Utilisation selon la revendication 21 caractérisée en ce que, l'administration du peroxyde d'hydrogène «H₂O₂» à une dose de 34 mg/kg, p.c, induit une oxydation du matériel génétique "ADN" associée une prolifération incontrôlée du cycle cellulaire des sous-populations leucocytaires.
23. Utilisation selon la revendication 22 caractérisée en ce que le peroxyde d'hydrogène «H₂O₂ » est administré par voie "i.p" chez les animaux pendant 4 jours.
24. Utilisation selon les revendications 18 à 23, caractérisée en ce que le suivi des quantités d'ADN des leucocytes périphériques dans les différents stades G1, S et G2/M, a révélé des points d'arrêts différents au niveau du cycle

cellulaire en fonction de l'extrait étudié en comparaison avec le lot traité avec l'H₂O₂ *in vivo*.

25. Utilisation des revendications 18 à 24, caractérisées en ce qu'il y a apparition d'arrêt du cycle cellulaire leucocytaire au stade G1 (**85%**) avec une induction d'activité antiproliférative au stade pré-G0/G1 (**14%**).
26. Le macérât, objet de cette invention, a montré un pouvoir antioxydant et antiprolifératif important ainsi qu'une induction d'arrêt quasi-total de la prolifération cellulaire au stade G0/G1.
27. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les études de sécurité préclinique aiguë et répétée du macérât, objet de cette invention, ne montrent aucune modification significative des paramètres suivis [comportement général, aspect morphologique et poids relatif des organes (foie, estomac, Rein et Rate)], en comparaison avec les animaux témoins.
28. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le macérât a une couleur Marron foncée, un pH de **6.48**, et peut être conservé 15 jours à 4°C.
29. Le macérât, objet de l'invention, théoriquement peut être utilisé par voie intrapéritonéale ou intraveineuse chez un homme de 60 kg à une dose **180 mg** par jour au maximum pendant une durée (15 jours), sans risque pour la santé.

Références

- [1] Institut National d'Oncologie Rabat "INO" (www.lesoir-echos.com/2010/04/08/cancer-dix-mille-marocains-sans-soins).
- [2] S. Douk-Rasy, E. Multon, A. Kayser, G. Riou, Inhibition par les dérivés de l'ellipticine des réactions catalysées par les topoisomérases: inhibition préférentielle d'une topoisomérase II. C.R. Acad Sci. 296 (1983) 899-904.
- [3] S. Schraub et J.F. Surowka, Phytothérapie et cancer. Encycl. Méd. Nat. (Phytothérapie. Aromathérapie. D-9, 4p.
- [4] A.R. Hanauske, D. Degen, S.E. Hilsenbeck, M.C. Bissery, Effects of taxotere and taxol on in vitro formation of freshly explanted human tumor cells. Anticancer Drug 3 (1992) 121-124.
- [5] J.T. Jaouhari, H.B. Lazrek, A. Seddik, M. Jana, Hypoglycaemic response to *Zygophyllum gaetulum* extracts in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, J. Ethnopharm. 64 (1999) 211–217.
- [6] J.T. Jaouhari, H.B. Lazrek, A. Seddik, M. Jana, The hypoglycemic activity of *Zygophyllum gaetulum* extracts in alloxan-induced hyperglycemic rats, J. Ethnopharm. 69 (2000) 17–20.
- [7] M. Ait El Cadi, Y. Khabbal, K. Alaoui, M.A. Faouzi, E. Bruno, L. Mahraoui, Y. Cherrah, Activité antidiarrhéique de *Zygophyllum gaetulum*, Phytothérapie 6 (2008) 2–4.
- [8] Y. Khabbal, M. Ait-El-Cadi, K. Alaoui, M.A. Faouzi, Y. Cherrah, Activité anti-inflammatoire de *Zygophyllum gaetulum*, Phytothérapie 5 (2006) 227–229.
- [9] M. Larhsini, M. Markouk, J.T. Jaouhari, K. Bekkouche, H.B. Lazrek, M. Jana, The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants, Phytother. Res 16 (2002) 97–98.
- [10] A. EL Hamsas EL Youbi, D. Bousta, I. Ouahidi, L. Aarab, Criblage pharmacologique primaire d'une plante endémique originaire du Sud Marocain (*Tetraena gaetula* [Emb. & Maire] Beier&Thulin). C. R. Biologies 333 (2010) 736–743.
- [11] G. Gaidi, T. Miyamoto, A. Rustaiyan, V. Laurens, M.A. Lacaille-Dubois, Two new biologically active triterpene saponins from *Acanthophyllum squarrosum*, J. Nat. Products 63 (2000) 1497–1502.
- [12] W. Brand-William, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm. Wiss.Technol. 28 (1995) 25.
- [13] N. Cotelle, J.L. Bernier, J.P. Catteau, J. Pommery, J.C. Wallet, E.M. Gaydou, Antioxydant properties of hydroxy flavones. Free Radic. Biol. Med. 20 (1996) 35.
- [14] A. Yildirim, A. Mavi, A.A. Kara, Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. J. Agric. Food. Chem. 49 (2001) 4083-4089.

[15] D. Parakash, G. Upadhyay, N. Brahma, H-B. Singh, Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chemistry* 104 (2007) 783-790.

[16] Y. Zimra, L. Wasserman, L. Maron, M. Shaklai, A. Nudelman, A. Rephaeli, Butyric acid and pivaloyloxymethyl butyrate, AN-9, a novel butyric acid derivative, induce apoptosis in HL-60 cells. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 123 (1997) 152-160.

[17] A. Ito, H. Watanabe, M. Naito, Y. Naito, Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide. *Gann.* 72 (1981) 174-175.

[18] LC Miller, M.L. Tainter, Estimation of DL50 and Its Error by means of Logarithmic Probit Paper. *Proc.Soc.Exp. Biol. Med.* 57 (1944) 261-264.