

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة جيجل  
Université de Jijel

Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire  
Facultés des sciences de la nature et de la vie



قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

## Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Pharmacologie Expérimentale

### Thème

---

Etude de l'effet de la propolis sur la toxicité hépatique et cardiaque du méthotrexate

---

#### Membres de jury :

Présidente : Mme AZZOUZ Wassila  
Examinatrice : Mme BOUHAFS Leila  
Encadreur : Mme ROUIBAH Hassiba

#### Présentée et soutenu par :

HAMMOUDI Ilheme  
KHEN Nour Elhouda  
LOUZRI Wassila

Année Universitaire 2015-2016

Numéro d'ordre (bibliothèque) :



***Remerciements***

*Nous remercions dieu tout puissant de nous avoir donné paix et santé  
pour achever ce travail.*

*Nous remercions vivement M<sup>eme</sup>.ROIBAH HASSIBA ;qui nous a encadré,nous a aidé  
et nous a suivie dans la réalisation de ce mémoire.*

*Aux membres de jury d'avoir accepter d'évaluer ce travail.*

*Mem BOUHAFS Leila ,Mme AZZOUZ Wassila*

*Nous remercions également :*

*Les ignéieurs de laboratoire de l'université de jijel*

*Pour leur patience et leur aide.*

*Nous remercions aussi toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation  
de notre mémoire, en espérant qu'il sera bénéfique pour nos collègues de  
futurs promotions .*

# **Sommaire**

<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>i</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>ii</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>iv</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>

## **Recherche bibliographique**

### **Chapitre I :Méthotrexate**

I-1- Historique et définition .....	3
I-2-Pharmacocinétique du méthotrexate .....	3
I -2-1-Absorption .....	3
I -2-2-Distribution.....	3
I -2-3-Métabolisme .....	4
I - 2-4-Élimination .....	4
I -3-Mécanisme d'action du méthotrexate .....	4
I -3-1-Action anti-métabolique .....	4
I -3-2-Action anti-inflammatoire .....	6
I -3-3-Action immuno-suppressive.....	7
I - 4-Effets indésirables du méthotrédxate .....	7

### **Chapitre II : Toxicité hépatique du méthotrexate**

II-1- Anatomie et physiologie du foie .....	9
II-2-Mécanisme de l'hépatotoxicité du méthotrédxate .....	10
II-2-1-Principales lésions hépatiques du méthotrexate.....	10
II-3-Stress oxydatif.....	12
II-3-1-Stress oxydatif dans le foie.....	12
II-3-2-Stress oxydatif induit par le méthotrexate .....	13
II-4-Marqueurs hépatiques .....	13
II-4-1-Transaminases.....	13
II-4-2-Phosphatase alcaline .....	14
II-4-3-Gamma-glutamyl-transférase.....	14
II-4-4-Bilirubine totale.....	14

## Chapitre III : Propolis

III-1-Les polyphénols .....	15
III-2-La propolis comme source des polyphénols.....	15
III-2-1-Définition et étymologie de la propolis .....	15
III-2-2-Composition de la propolis .....	16
III-2-3-Origine de la propolis .....	16
III-2-4-Propriétés physico-chimiques .....	16
III-2-5-Propriétés pharmacologiques et biologiques .....	17
III-2-5-1-Activité antioxydant et anti radicalaire.....	17
III-2-5-2-Activité anti-inflammatoire .....	18
III-2-5-3-Activité antimicrobienne .....	18
III-2-5-4-Autres propriétés.....	18

## Partie pratique

<b>VI- Matériel et méthodes .....</b>	<b>19</b>
Partie 1 : Etude phytochimique de la propolis .....	19
1- Récolte de la propolis .....	19
2- Préparation de l'extrait éthanolique de la propolis.....	19
3-Dosage des polyphénols totaux .....	20
4-Dosage des flavonoïdes totaux .....	20
5- Etude du pouvoir anti –radicalaire .....	21
Partie 2-Etude de l'effet antioxydant de l'EEP <i>in vivo</i> .....	21
1-Animaux et conditions d'hébergement.....	21
2-T raitement des animaux .....	22
3-Prélèvement du sang.....	22
4-Sacrifice des animaux et prélèvement des organes (foie et cœur) .....	22
5-Dosage des paramètres sériques .....	23
6-Dosage des marqueurs du stress oxydatif .....	23
7-Dosage des protéines.....	26
8-Traitement des résultats.....	26
<b>V-Résultats et interprétation.....</b>	<b>27</b>

Partie 1 - Etude phytochimique .....	27
1-Rendement d'extraction .....	27
2-Teneur en polyphénol et en flavonoïdes.....	27
2-1-Teneur en polyphénols .....	27
2-2-Teneur en flavonoïdes .....	28
3-Effet anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis.....	28
Parti 2 - Etude <i>in vivo</i> del'effet antioxydant de l'EEP .....	29
1-Paramètres sériques .....	29
2-Dosage des marqueurs du stress oxydatif .....	31
2-1-Tissu hépatique.....	31
2-2-Tissu cardiaque .....	34
<b>IV-Discussion</b> .....	38
1-Etude phytochimique.....	38
2-Evaluation de l'effet hépatoprotecteur et cardioprotecteur de la propolis contre la toxicité induite par le MTX .....	39
2-1- Evaluation des paramètres sériques.....	39
2-2- Evaluation des marqueures du stress oxydatif .....	
<b>Conclusion</b> .....	44
<b>Références bibliographiques</b> .....	45
<b>Annexes</b>	

## Liste des tableaux

N°	Titre	Page
<b>Tableau1:</b>	Rendement d'extraction des extraits éthanolique de la propolis de deux régions .....	27
<b>Tableau2:</b>	Teneur en polyphénols dans les deux échantillons de propolis en mg EAG/g de propolis.....	27
<b>Tableau3:</b>	Teneur en flavonoïdes dans les deux échantillons de propolis en mg EQ/g de propolis.....	28
<b>Tableau4 :</b>	Variations des taux des paramètres sériques des rats traités par des doses répétées de MTX (20 mg/kg) seules, en association avec l'EEP (100 mg/kg) ou avec la quercétine (10 mg/kg) .....	29

## Liste des figures

N°	Titre	page
<b>Figure 1</b>	:Mode d'action du MTX après pénétration cellulaire .....	5
<b>Figure 2</b>	:Concentration extracellulaire de l'adénosine suite à l'administration de MTX .....	7
<b>Figure 3</b>	:Mécanisme du stress oxydatif induit par divers facteurs sur les maladies du foie ....	12
<b>Figure 4</b>	:Principe de dosage de MDA .....	23
<b>Figure 5</b>	:Principe de dosage de glutathion .....	24
<b>Figure 6</b>	:Evaluation de l'activité anti-radicalaire d'EEP à différentes concentration vis-à-vis le radical libre DPPH .....	28
<b>Figure 7</b>	: Variations des taux du MDA cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule,en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr),ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr	31
<b>Figure 8</b>	:Evolution des taux de GSH cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule,en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr),ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr .....	32
<b>Figure 9</b>	: Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule,en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr),ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) .....	33
<b>Figure 10</b>	:Variations de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule,en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr),ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr .....	34
<b>Figure 11</b>	:Variations des taux du MDA cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule,en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr),ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr	35
<b>Figure 12</b>	:Variations des taux de GSH cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule,en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr),ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr	35
<b>Figure 13</b>	:Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule,en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr),ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr .....	36
<b>Figure 14</b>	:Variations de l'activité enzymatique de la GST cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule,en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr),ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr .....	37

## Liste des abréviations

- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **AICARTF** : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide transformylase
- **AICAR** : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide
- **ALAT** : Alanine-amino-transferase
- **AlCl<sub>3</sub>** : Trichlorure d'aluminium
- **AMP** : Adénosine monophosphate
- **ARN** : Acide ribonucléique
- **ASAT** : Aspartate-amino-transferase
- **CAPE** : Ester phényléthylique de l'acide caféique
- **CAT** :Catalase
- **CDNB** : 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène
- **CPK** : Créatine phosphokinase
- **DAMP** :Acide 2,4-diamino-N<sup>10</sup>-méthylptéroïque
- **DHFR** : Dihydrofolate reductase
- **DPPH** : 2, 2-diphénylpicrylhydrazyl
- **DTNB** :Acide 5 ,5' dithiodis -2-nitrobenzoïque
- **EEP** : Extrait éthanolique de la propolis
- **FPGS** :Folyl-polyglutamate synthétase
- **GAR** : Glycinamide ribonucléotide
- **GARTF** : Glycinamide ribonucléotide transformylase
- **GOT** : Glutamate-oxaloacétate transaminase
- **GSH** : Glutathion
- **GST** : Glutathion S-transférase
- **γ-GT** : Gamma-glutamyl-transférase
- **HTP**: Hypertension portale
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** :Peroxyde d'hydrogène
- **ICAM-1** : InterCellular Adhesion Molecule-1
- **IL** : Interleukine
- **IL-1ra** : Interleukin-1 receptor antagonist
- **ITO** : Etoilées
- **LDH** : Lactate déshydrogénase

- **MDA** : Malondialdéhyde
- **MTX** : Méthotrexate
- **NADPH** : Nicotinamide-adénosine di phosphate d'hydrogène
- **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde
- **7 OH- MTX** :7- hydroxyméthotrexate
- **OH·** :Radical hydroxyl
- **P 450** :Cytochrome P 450
- **PAL** : Phosphatase alcaline
- **PT** :Protéines totales
- **NADP** : Nicotinamide adénosine diphosphate
- **ROS** : Reactive oxygen species
- **TBA** :Acide thiobarbiturique
- **TBARS** : Thiobarbituric acid reactive substances
- **TCA** :Acide trichloroacétique
- **TGP** : Transaminase glutamopyruvique
- **TNF -α**: Tumor Necrosis Factor α
- **TNB** : Thionitrobenzoïque
- **VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine

# **Introduction**

### Introduction

Le méthotrexate (MTX) est un médicament polyvalent qui a été cliniquement appliqué dans une large gamme de maladies, y compris, la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et les maladies néoplasiques. Malgré cette ancienneté et toute l'expérience acquise, de nombreux points d'interrogations persistent sur son utilisation optimale; sa stratégie d'utilisation diffère sensiblement d'un pays à l'autre, ainsi que sa tolérance et son efficacité à long terme et surtout sa toxicité (Moghadam *et al.*, 2015).

Les applications thérapeutiques du MTX sont généralement limitées vu sa toxicité sévère à plusieurs niveaux, système nerveux, rein, cœur et essentiellement au niveau du foie. Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les mécanismes de la toxicité induite par le méthotrexate. En effet, la plupart des études mettent en jeu le rôle du stress oxydatif dans ce processus qui est induit par la formation des radicaux libres. Cela aboutit à la perturbation de l'homéostasie oxydante et la perte du dysfonctionnement mitochondrial qui contribuent cliniquement à l'apparition des effets secondaires toxiques du méthotrexate (vardi *et al.*, 2010; Deavall *et al.*, 2012).

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 antioxydantes intéressantes (Kurek-Górecka *et al.*, 2013; Georgiev *et al.*, 2014).

La propolis ou colle d'abeille est un mélange complexe de plusieurs composés organiques et inorganiques, utilisé par l'abeille comme colle, enduit et antibiotique. Il a été démontré qu'elle est très riche en possibilités thérapeutiques et exprime un spectre large d'activités biologiques; effet antibactérien, anti-inflammatoire, anticancerigène, hépatoprotecteur, antivirale, spasmolytique, et antioxydant (Liu *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, cette étude est inscrite dont l'objectif vise d'une part, à étudier l'effet hépatotoxique et cardiotoxique du MTX et d'autre part, à évaluer l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis contre cette toxicité induite *in vivo*.

Notre stratégie expérimentale a été basée sur :

- ✓ L'étude phytochimique de deux échantillons de la propolis et l'évaluation de l'effet de l'origine géographique sur sa composition chimique et son activité anti radicalaire.
- ✓ L'évaluation de la toxicité hépatique et cardiaque du méthotrexate.
- ✓ L'évaluation de l'effet préventif bénéfique de la propolis sur le foie et le cœur.

# **Recherche bibliographique**

# **Chapitre I**

## ***Méthotrexate***

## I-1- Historique et Définition

Le méthotrexate (MTX), dérivé de l'aminoptérine ou [acide N-[4-[(2,4-diamino-6-ptéridinyl)méthyl]méthylamino]benzoyl]-L-glutamique], est un agent de la classe des antimétabolites (Waltham *et al.*, 1988; Laharie *et al.*, 2008). Il a été développé dans les années 1940 comme un antagoniste spécifique de l'acide folique puis commercialisé en 1955 (Chan et Cronstein, 2002 ; Laharie *et al.*, 2008). En effet le MTX est un médicament cytotoxique efficace largement utilisé à des doses élevées dans la chimiothérapie de plusieurs types de cancer, y compris les ostéosarcomes, les leucémies, et les lymphomes non hodgkiniens (Balloy *et al.*, 2007 ; Gaïes *et al.*, 2010). Il est également indiqué à des doses plus faibles dans le traitement de certaines maladies inflammatoires chroniques telles le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et la maladie de Crohn (Erdogan *et al.*, 2015).

## I -2-Pharmacocinétique du méthotrexate

### I -2-1-Absorption

L'absorption du MTX administré par voie orale semble dépendre de la dose. Cette absorption est quasi complète pour des doses faibles (< 20 mg par semaine) (Lebrun-Vignes *et al.*, 1999 ; Beylot-Barry et Le Maitre, 2011).

Le MTX est absorbé dans le jéjunum proximal (au niveau digestif) avec un pic de concentration plasmatique maximal d'une à deux heures après l'ingestion (Laharie *et al.*, 2008). Il est complètement absorbé à la suite de l'administration parentérale et après l'injection intramusculaire (la biodisponibilité est d'environ 90%) (Lebrun-Vignes *et al.*, 1999).

### I -2-2-Distribution

Le MTX est une petite molécule qui circule majoritairement sous forme liée aux protéines plasmatiques principalement l'albumine (50-80%) ou libre (Reutenauera *et al.*, 2009). Il se concentre particulièrement dans les organes suivants : rein, rate, foie, vésicule biliaire, peau ainsi que dans les liquides d'épanchement pleural et d'ascite (Shapiro *et al.*, 1975). Son volume de distribution est évalué à 0,76l/kg avec une diffusion principalement dans l'espace extracellulaire mais avec la capacité de pénétrer les membranes cellulaires et, à haute dose, la barrière hémato-méningée (Reutenauera *et al.*, 2009).

**I -2-3-Métabolisme**

Le MTX subit un métabolisme hépatique et intracellulaire notamment dans les cellules néoplasiques et les hépatocytes. Dans la cellule, le MTX fixe un ou plusieurs résidus glutamate sous l'influence de la folyl-polyglutamate synthétase (FPGS), afin d'obtenir des polyglutamates qui peuvent être reconvertis en MTX grâce à des enzymes hydrolases (Jolivet *et al.*, 1987 ;Tian et Cronstein, 2007).Une petite quantité du médicament (3-12%) est métabolisée en 7-hydroxyméthotrexate (7 OH- MTX) au niveau du foie (Cutolo *et al.*, 2001).

Le MTX est également métabolisé en acide 2,4-diamino-N10-méthylptéroïque (DAMPA), non toxique, représente moins de 5 % du médicament excrété dans les urines (Donehower *et al.*, 1979 ;Howell, 1980;Wolfrom *et al.*, 1990). Le DAMPA est formé par hydrolyse du MTX par des carboxypeptidases bactériennes après sécrétion biliaire du MTX dans le tractus gastro-intestinal (McGuire *et al.*, 2000).

**I - 2-4-Élimination**

L'excrétion du MTX se fait essentiellement par voie rénale. Durant les premières vingt quatre heures suivant l'ingestion de MTX ,60-90 % de sa dose est éliminée dans les urines sans que la molécule n'ait été métabolisée. Cette élimination implique essentiellement une filtration glomérulaire et partiellement une sécrétion tubulaire proximale (Carpentier *et al.*, 1999).

La sécrétion biliaire du MTX est très faible mais elle est un peu plus élevée chez les insuffisants rénaux (Laharie *et al.*, 2008). La vitesse de la clairance du MTX varie grandement et diminue généralement aux doses élevées. Le retard de la clairance du médicament a été identifié comme l'un des principaux facteurs responsables de la toxicité du MTX (Creaven *et al.*, 1973). Le MTX est caractérisé par une demi-vie initiale de 1.5 à 3.5 heures et une demi-vie terminale de 8 à 15 heures (Balloyet *et al.*, 2007).

**I -3-Mécanisme d'action du méthotrexate**

Le MTX est un médicament qui possède trois actions principales : action anti-métabolique, anti-inflammatoire et immunosuppressive (Cutolo *et al.*, 2001 ;Balloy *et al.*, 2007).

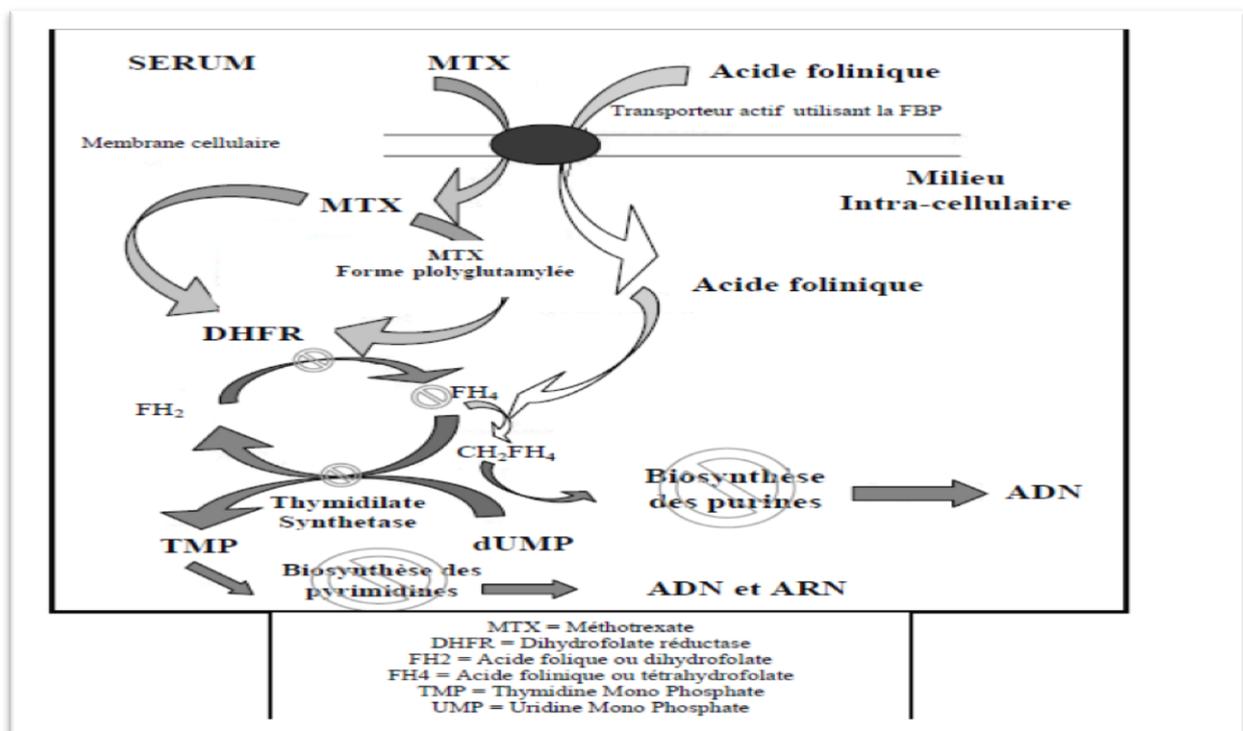
**I -3-1-Action anti-métabolique**

Elle représente son action capitale, généralement exercée après l'administration de MTX à fortes doses afin de lutter contre les néoplasies (Cutolo *et al.*, 2001 ;Laharie *et al.*, 2008).

Le MTX est un cytostatique de la famille des antifolates, qui pénètre dans la cellule via une protéine trans-membranaire spécifique utilisée normalement dans le transport des folates réduits provoquant une inhibition compétitive de la dihydrofolate reductase (DHFR), enzyme clé du métabolisme des folates qui permet de catalyser la conversion du dihydrofolate en tétrahydrofolate ou la forme active du folate (Jolivet *et al.*, 1987 ; Reutenauera *et al.*, 2009 ; Beylot-Barry et Le Maitre, 2011 ; Fekry *et al.*, 2016).

Dès son entrée dans la cellule, le MTX et ses dérivés polyglutaminés se lient avec une grande affinité à l'enzyme DHFR ce qui entraîne l'inhibition de cette dernière (Jolivet *et al.*, 1987). Cette étape est suivie par l'inhibition d'autres enzymes : la thymidylate synthétase, la 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) et la glycinamide ribonucléotide (GAR) transformylase (AICARTF, GARTF) par conséquent il y'a eu un déficit en bases puriques et pyrimidiques aboutissant à un défaut de synthèse de l'ADN et d'ARN (Waltham *et al.*, 1988 ; Laharie *et al.*, 2008 ; Reutenauera *et al.*, 2009).

L'action antimétabolique de MTX est exercée principalement sur la multiplication des cellules en phase S (cellules à prolifération rapide : cellules cancéreuses, cellules normales de l'épithélium digestif et de la moelle osseuse) (Lebrun-Vignes *et al.*, 1999 ; Gervaise, 2003).



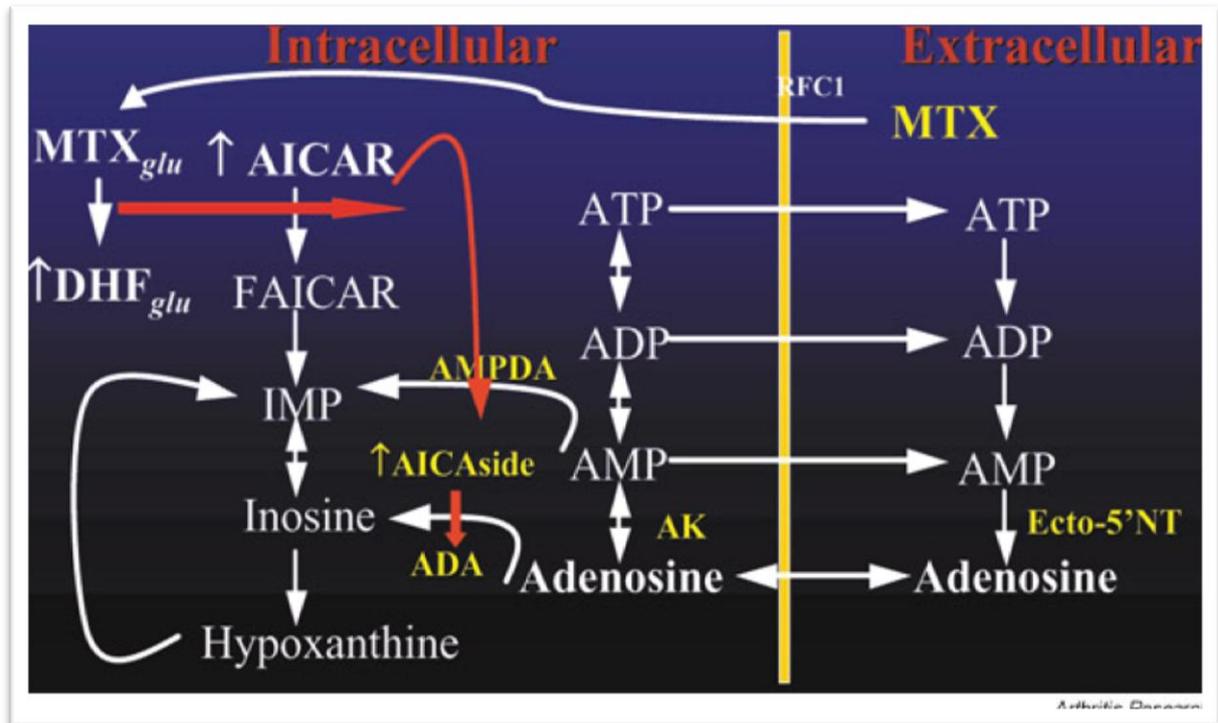
**Figure 1 :** Mode d'action du MTX après pénétration cellulaire (Coralie, 2010).

**I -3-2-Action anti-inflammatoire**

Dans ce cas les effets du MTX semblent essentiellement liés à une inhibition de l'AICAR transformylase, ce qui induit une accumulation intracellulaire d'AICAR (Chan et Cronstein, 2002). L'inhibition de cette enzyme par le MTX et ses métabolites (les polyglutamates) conduit à l'accumulation d'AICAR dans le milieu intracellulaire. L'accumulation d'AICAR et ses métabolites (AICA Riboside) ont un effet inhibiteur direct sur au moins deux enzymes clés, l'adénosine désaminase et l'AMP désaminase provoquant l'augmentation de la concentration de l'adénosine et de nucléotides d'adénine par voie intracellulaire, cette accumulation d'AICAR est associée à une élévation de la concentration de l'adénosine dans l'espace extracellulaire par l'existence d'ecto-5'-nucléotidase, une enzyme qui catalyse la déphosphorylation de l'AMP à l'adénosine (un médiateur endogène puissant) qui exerce des effets anti-inflammatoires en agissant sur Chan et Cronstein, 2002 ; Cronstein, 2005):

- ✓ **Les polynucléaires neutrophiles** : l'inhibition de l'adhésion aux cellules épithéliales (inhibition de l'expression des molécules d'adhésion intracellulaire telles que la molécule 1 d'adhérence (ICAM-1) et de la production de leucotriène B4 et de TNF $\alpha$ ) (Cutolo *et al.*, 2001 ; Chan et Cronstein, 2002).
- ✓ **Les monocytes (macrophages)** : inhibition de l'expression de TNF, IL-1, IL-6 et IL-8 et l'augmentation de la production d'IL-10, IL-4, IL-12 et de l'IL-1ra (Cutolo *et al.*, 2001 ; Laharie *et al.*, 2008).

Ces événements sont à l'origine d'une diminution de chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et des monocytes (Laharie *et al.*, 2008).



**Figure 2 :** Concentration extracellulaire de l'adénosine suite à l'administration de MTX.

**MTX :** methotrexate; **MTX<sub>Glu</sub> :** polyglutamatemethotrexate; **AICAR :** carboxamidoribonucleotideaminoimidazole; **AMPDA :** AMPdésaminase; **AICAside :** carboxamidoribonucleosideaminoimidazole; **ADA :** l'adénosine désaminase; **Ecto-5'NT :** ecto-5'-nucléotidase (Chan et Cronstein, 2002).

### I -3-3-Action immunosuppressive

Les effets de MTX sur la fonction des lymphocytes T, soit *in vivo* ou *in vitro*, ont été démontrés par plusieurs études. En effet les chercheurs ont montré que le MTX diminue la prolifération des lymphocytes T activées durant la phase S/G2 du cycle cellulaire (phase de division). Et provoque l'apoptose des cellules T (Genestier *et al.*, 1998 ;Cutolo *et al.*, 2001 ;Chan et Cronstein, 2002 ).

Les autres lymphocytes résidents (comme les lymphocytes naïfs) ne sont pas concernés par cette action (Murphy *et al.*, 2008).

### I - 4-Effets indésirables du méthotrédaxate

#### I - 4-1-Toxicité hématologique

La toxicité hématologique est une complication grave couramment observée pour des doses élevées de MTX (Gaies *et al.*, 2012). Il s'agit d'une thrombopénie puis d'une leuconéutropénie à

progression rapide. Cette toxicité peut être aussi à l'origine d'une anémie mégaloblastique et d'une pancytopenie (Reutenauera *et al.*, 2009 ;Gaies *et al.*, 2012).

**I -4-2-Toxicité hépatique**

L'apparition d'une cytolyse hépatique est fréquemment observée, elle est transitoire et réversible en une à deux semaines. Le risque d'une fibrose hépatique et d'une cirrhose est ainsi augmenté lors du traitement par le MTX (Laharie*et al.*, 2008 ;Beylot-Barry et Le Maitre, 2011).

**I -4-3-Toxicité pulmonaire**

Des pneumopathies immunoallergiques pouvant évoluer vers la fibrose pulmonaire peuvent être observées et nécessite une corticothérapie. La Pneumopathie est l'une des effets secondaires les plus graves, mais rares lorsque le MTX est à faibles doses (Reutenauera *et al.*, 2009 ; Gaies *et al.*, 2012).

**I -4-4-Toxicité neurologique**

Le MTX interfère avec des réactions de transméthylation qui sont cruciales pour la formation de protéines, de lipides et de myéline. Des complications neurologiques en découlent, soit aiguës, subaiguës ou neurotoxicité chronique à l'origine d'une détérioration neurologique et cognitive progressive (Reutenauera *et al.*, 2009 ; Gaies *et al.*, 2012).

**I -4-5-Toxicité cutanéomuqueuse**

La toxicité cutanéomuqueuse responsable d'une éruption cutanée, d'un érythème des extrémités et d'une chute de cheveux. Elle peut également entraîner une photosensibilité et des ulcérations cutanées et muqueuses. De rares cas de dermatoses bulleuses et de vascularites ont été rapportés (Gaies *et al.*, 2012).

**I -4-6-Toxicité rénale**

Elle se manifeste par une augmentation de la créatinine pouvant évoluer vers une insuffisance rénale irréversible. Ce phénomène est du à une nécrose tubulaire et à la précipitation du MTX et de ses métabolites sous forme de cristaux en cas d'administration de fortes doses (Reutenauera *et al.*, 2009 ;Gaies *et al.*, 2012).

**I -4-7-Autres toxicités**

Elles sont, anaphylactique, ophtalmologique et surtout digestifs (douleurs abdominales, nausées) (Reutenauera *et al.*, 2009 ;Beylot-Barry et Le Maitre, 2011).

## **Chapitre II**

### ***Toxicité hépatique du méthotrexate***

## II-1- Anatomie et physiologie du foie

### II-1-1- Anatomie descriptive du foie

Le foie représente l'organe interne le plus volumineux du corps humain, son poids est de 1400 à 1500 g. Il occupe la région de l'hypocondre droit, s'étendant du 5ème espace intercostal vers le bas, dans l'alignement du centre de la clavicule, jusqu'au rebord costal droit. Il a trois faces : face supérieure ou diaphragmatique, face inférieure ou viscérale : elle est parcourue par trois sillons qui dessinent grossièrement la lettre H et face postérieure. Cet organe est formé de deux lobes principaux, le droit et le gauche, ainsi que de deux petits lobes, à savoir, le lobe caudé à la face postérieure, et le lobe carré à la face inférieure, et chaque lobe se subdivise lui-même en un grand nombre d'unités fonctionnelles appelées lobules. Ces lobules sont formés de cellules hépatiques, les hépatocytes (Frank ,1992 ; Casting et Smail, 1999; Shaffer et Myers ,1999).

On y distingue dans le foie deux types de cellules :

- ✓ **Les cellules parenchymateuses:** les hépatocytes (représentent 60 % de la masse cellulaire) (David, 2000).
- ✓ **Les cellules sinusoidales :** elles sont composées de cellules endothéliales, cellules de Kupffer, cellules étoilées du foie également dénommées cellules de Ito ou cellules périsinusoïdales et lymphocytes associés du foie (Malik *et al.*, 2002).

### II-1-2-Physiologie du foie

Les principales fonctions assurées par le foie sont :

- **La fonction vasculaire :** le foie étant le principal réservoir sanguin de l'organisme. De plus, il permet la collecte de composants alimentaires, qui sont conduits au foie à partir du tractus digestif via la veine porte.
- **La fonction métabolique:** le foie étant impliqué dans le métabolisme de la plupart des xénobiotiques et dans la biosynthèse, le stockage, la transformation et la dégradation de composés organiques (Frank ,1992 ;Guyton, 1995).
- **La fonction biliaire :** La bile est une solution aqueuse, iso-osmotique par rapport au plasma, contenant moins de 5 % de solides. Elle est élaborée initialement dans les hépatocytes, conditionne l'absorption intestinale des lipides, des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles, assure l'homéostasie du cholestérol et l'élimination de différents produits de

dégradation, comme ceux de l'hémoglobine, sous forme de bilirubine. La bile est la voie d'excrétion principale des métabolites toxiques (Shaffer et Myers ,1999;Poupon *et al.*, 2004 ).

## **II-2-Mécanisme de l'hépatotoxicité du méthotrexate**

Le MTX est stocké sous forme des polyglutamates intracellulaire (Vardiet *al.*, 2010).L'administration de ce médicament à long terme induit une accumulation de ses métabolites dans le parenchyme hépatique.Le MTX et ses métabolites pourraient induire une inhibition chronique du métabolisme des folates. Donc, l'hépatotoxicité est en raison de l'appauvrissement de l'acide folique au niveau hépatique, conduisant à un blocage de la synthèse d'acides aminés et d'acides nucléiques, cela pourrait conduire à des dommages des organites et des membranes plasmiques dans les cellules de parenchyme hépatique interférant avec leur fonction et permettant une fuite d'enzymes qui conduit à une nécrose des hépatocytes (Laharie *et al.*, 2008 ;Tag, 2015 ; Çakır *et al.*, 2015).

### **II-2-1- Principales lésions hépatiques du méthotrexate**

Le foie est le site principal des biotransformations des xénobiotiques; toute affection hépatique peut induire des modifications de métabolisme ce qui conduit à l'apparition de la toxicité (Viala, 2007).Les lésions hépatiques les plus fréquentes observées suite à l'administration de MTX sont : la cytolysse hépatique, la stéatose, la fibrose hépatique et la cirrhose (Laharie *et al.*, 2008).

#### **✓ Cytolyse :**

La cytolysse hépatique est une maladie de foie définie par une atteinte de la membrane hépatocytaire, qui peut être une destruction de la membrane ou une modification de la perméabilité membranaire.Cette anomalie est observée lors du traitement avec le MTX que ce soit pour des traitements courts à des doses élevées et cytotoxiques ou pour des traitements d'entretien à de plus faibles doses. Elle est désignée par une augmentation des transaminases sériques (ASAT et ALAT).La cytolysse disparaît généralement à l'arrêt du traitement, mais la disparition peut prendre plusieurs semaines. La supplémentation en folates diminue la fréquence des cytolyses sans modifier l'efficacité du traitement, même chez les malades consommant de l'alcool (Laharie *et al.*, 2008 ;Pariente, 2013 ).

**✓ Stéatose**

La stéatose hépatique est caractérisée par la présence d'un excès de lipides (plus de 5%). L'accumulation de lipides dans le foie peut conduire au blocage de la libération des triglycérides hépatiques dans le plasma.

Le MTX pourrait aussi être un facteur de risque de stéatohépatite métabolique. Des lésions histologiques de stéatopathie métabolique sont souvent observées lorsque les malades ont une ponction biopsie hépatique (Frank, 1992 ; Laharie *et al.*, 2008).

**✓ Fibrose**

La fibrose hépatique est définie par l'accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le parenchyme hépatique, elle peut être aussi décrite par l'encapsulation ou le remplacement du tissu lésé par une réponse « de cicatrisation collagénique ». Les constituants de la matrice extracellulaire déposés en excès au niveau des espaces intercellulaires, cela due à un déséquilibre entre la synthèse, le dépôt et la dégradation de ses constituants (Rosenbaum, 1994 ; Spahr *et al.*, 2003 ; Sawadogo *et al.*, 2007 ; Schuppan et Afdhal, 2008 ).

Le premier cas de fibrose hépatique lors d'un traitement par MTX pour le psoriasis est observé en 1964. La prévalence de la fibrose significative varie de 0 à 33 %. Dans l'exemple du psoriasis, des travaux anciens ont montré que la prévalence de la fibrose hépatique variait de 25 à 50% alors que plus récemment celle-ci était estimée de 0 à 4% (Laharie *et al.*, 2008).

**✓ Cirrhose**

La cirrhose est le stade majeur du développement de la fibrose hépatique induit par la plupart des maladies chroniques du foie. Elle est définie par l'existence d'un trouble architectural diffus du parenchyme hépatique caractérisé par le développement histologique des nodules de régénération entourés par des bandes fibreuses. Les complications de la cirrhose sont potentiellement graves : hémorragie par rupture de varices œsophagiennes, hypertension portale (HTP), infections du liquide d'ascite, syndrome hépatorénal et carcinome hépatocellulaire (Sawadogo *et al.*, 2007 ; Schuppan et Afdhal, 2008 ; Von Moos et Müllhaupt, 2015).

Il a été publié que 26 % des malades traités par le MTX avaient une cirrhose à long terme. Il est important de noter que, dans les études publiées après 1990, quelle que soit l'indication du

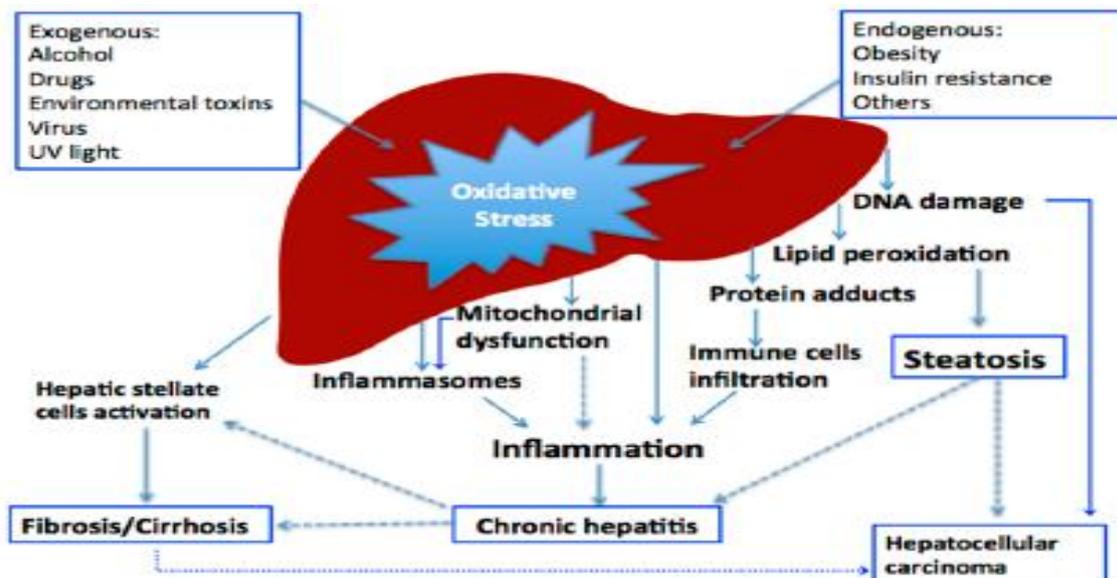
traitement, la prévalence de la cirrhose sous MTX est la plus faible, comprise entre 0 et 6 % (Laharie *et al.*, 2008).

## II- 3-Stress oxydatif

Le stress oxydatif a été définie comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, ce qui entraîne une augmentation globale des niveaux cellulaires d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces produits proviennent soit de sources exogènes (tel que: l'alcool et certains médicaments) ou de sources endogènes (telque: le cytochrome hépatique P 450) (Vuppalanchi *et al.*, 2011;Yang *et al.*, 2016 ).

### II-3-1- Stress oxydatif dans le foie

Le stress oxydatif est une caractéristique importante dans la physiopathologie des maladies hépatiques aiguë et chronique, telles que les lésions d'ischémie reperfusion, les modèles cholestatiques de maladie du foie, les maladies du foie alcoolique et la stéatohépatite non alcoolique (Vuppalanchi *et al.*, 2011 ;Li *et al.*,2015).



**Figure 3 :** Mécanisme général du stress oxydatif induit par divers facteurs et maladies du foie

(Li *et al.*, 2015).

Les cellules parenchymateuses sont des cellules primaires soumises à un stress oxydatif induit par une blessure dans le foie. Au niveau des hépatocytes ; la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, les microsomes et les peroxysomes peuvent produire des ROS. La régénération de ces espèces réactives provoque des dommages dans les cellules de Kupffer, les cellules étoilées du foie et les cellules endothéliales.

Une variété de cytokines comme le TNF- $\alpha$  peut être produit dans les cellules de Kupffer suite au stress oxydatif, ce qui pourrait augmenter l'inflammation et l'apoptose. En ce qui concerne les cellules étoilées hépatiques, la synthèse de collagène et la prolifération de ces cellules est déclenchée par la peroxydation lipidique provoquée par le stress oxydatif (Cichoż-Lach et Michalak, 2014; Li *et al.*, 2015).

### II-3-2-Stress oxydatif induit par le méthotrexate

La toxicité du MTX au niveau du foie semble se rapporter à la production des ROS, cela provoque des dommages au niveau des mitochondries et des membranes cytoplasmiques et induit des lésions tissulaires oxydatives. Ces anomalies représentent le résultat d'une augmentation de la peroxydation lipidique dans les tissus du foie (induit la libération de la MDA : malondialdéhyde) et une diminution des taux d'enzymes anti oxydantes telque le glutathion cellulaire (Tag, 2015 ; Moghadam *et al.*, 2015 ; Çakır *et al.*, 2015). Ainsi, le MTX provoque l'inhibition du nicotinamide adénosine diphosphate (NADP) déshydrogénases –dépendantes cytosolique et l'enzyme malique (NADP), Ce qui suggère que ce médicament pourrait diminuer la disponibilité de NADPH (nicotinamide-adénosine di phosphate d'hydrogène) dans les cellules. Dans les conditions normales, le NADPH est utilisé par l'enzyme glutathion réductase pour maintenir l'état réduit de glutathion cellulaire (GSH), un important antioxydant cytosolique (Vardi *et al.*, 2010; Moghadam *et al.*, 2015).

### II-4-Marqueurs hépatiques

#### II-4-1-Transaminases

- ✓ **ALAT (Alanine-amino-transferase) :** l'ALAT est une enzyme essentiellement trouvée dans le foie (où elle est exclusivement cytoplasmique), mais elle se rencontre aussi, par ordre de concentration décroissante, dans les reins, le cœur, les muscles squelettiques, le pancréas, la rate, les poumons et le sérum. L'activité de l'ALAT est la plus fréquemment dosée comme marqueur d'hépatotoxicité. Ce test est beaucoup plus spécifique d'une lésion hépatique.

L'atteinte hépatocytaire provoque la libération de ces enzymes dans le compartiment extracellulaire (Amacher, 2002; Ozer *et al.*, 2008 ; Jaunin-Stalder *et al.*, 2009 ).

✓ **ASAT (aspartate-amino-transférase)** : cette enzyme est retrouvée essentiellement dans le compartiment mitochondrial, moins spécifique que l'ALAT pour le foie, Le rapport ASAT/ALAT peut donc aider à déterminer une probabilité sur l'existence d'une atteinte hépatique (Amacher, 2002;Jaunin-Stalder *et al.*, 2009).

**II-4-2-Phosphatase alcaline (PA)** : le PA se trouve majoritairement dans le foie et les os. L'élévation de ce biomarqueur traduit une atteinte cholestatique par libération d'enzyme du tissu hépatocytaire vers le compartiment plasmatique.Elle est physiologiquement élevée pendant la grossesse et chez les enfants (Ozer *et al.*, 2008;Jaunin-Stalder *et al.*, 2009 ).

**II-4-3-Gamma-glutamyl-transférase ( $\gamma$ -GT)** :le $\gamma$ -GT est un marqueur hautement sensible de l'atteinte hépatobiliaire avec une spécificité modérée. Il se trouve dans les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires (Ozer *et al.*, 2008 ; Jaunin-Stalder *et al.*, 2009).

**II-4-4-Bilirubine totale** :la bilirubinetotale, est un marqueur de l'atteinte cholestatique. Elle se partage en bilirubine directe (conjuguée) et indirecte (non conjuguée). Une élévation plus importante de la bilirubine indirecte par rapport à la bilirubine directe témoigne d'une hémolyse. La bilirubine directe est un indicateur de la fonction hépatique d'élimination (Ozer *et al.*, 2008 ; Jaunin-Stalder *et al.*, 2009).

## **Chapitre III**

### ***Propolis***

### III-1-Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires végétaux, caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones (groupe phénol), lui-même porteur d'un ou plusieurs fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004 ; Murtala *et al.*, 2014 ). Ils peuvent aller de molécules simples comme les acides phénols à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 dalton comme les tanins. les polyphénols sont principalement synthétisés à partir des hydrate de carbone via la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate, celle de l'acide shikimique conduisant après transamination et désamination aux acides cinnamiques et leurs dérivés et celle de l'acétate conduisant aux polycétoesters ou polyacétates (malonate) (Chira *et al.*, 2008) .

Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols, avec plus de 5000 composés différents identifiés dans le règne végétal. Ces molécules sont caractérisés par une structure commune en C<sub>6</sub> –C<sub>3</sub> – C<sub>6</sub>, dans laquelle deux cycles benzéniques sont réunis par une chaîne de trois carbones (Chira *et al.*, 2008 ; Massau, 2012 ). En fonction de la nature des différents substituants présents sur les cycles des molécule ainsi que sur la base du nombre et de la structure chimique des carbones constitutifs les flavonoïdes sont classés en différentes catégories dont les plus importantes sont les flavanones, les flavonols, les flavones, les flavanols, les isoflavones et les anthocyanes (Ghedira, 2005 ; Chira *et al.*, 2008 ; Kanti et Syed, 2009).

### III-2-La propolis comme source des polyphénols

#### III-2-1-Définition et étymologie de la propolis

La propolis ou colle d'abeille est une substance naturelle résineuse recueillie par les abeilles d'espèce *Apis mellifera L* à partir de sources botaniques, essentiellement sur les bourgeons d'arbres, mais aussi sur les jeunes branches, et les pétioles des feuilles (Ghedira *et al.*, 2009 ;Wang *et al.*, 2016 ). Les abeilles l'utilisent à l'entrée de leurs ruche pour en protéger l'accé,c'est ce qui indique son étymologie Greque « pro » signifiant devant et « polis » signifiant cité (devant la cité) (Ghedira *et al.*, 2009). Son étymologie viendrait aussi du verbe latin propolire qui signifié « enduire ». En effet l'abeille enduit l'intérieur de son habitat de cette résine pour se protéger contre les bactéries, les parasites et les virus, sceller des trous dans les alvéoles des abeilles, boucher les ouvertures, lisser les parois interne et désinfecter la ruche (Castaldo et Capasso, 2002 ; de Mendonça *et al.*, 2015 ;Wang *et al.*, 2016).

### III-2-2-Composition de la propolis

La composition de la propolis varie en fonction de leur origine botanique, géographique et la saison de collection (Nadine *et al.*, 2014 ; De Mendonça *et al.*, 2015 ). De manière générale, elle est constituée de 50% de résine et baume, de 30% de cire, de 10% d'huiles essentielles et aromatiques, de 5% de pollen, et de 5% de substances organiques et minérales. Parmi ces derniers il y aura beaucoup de flavonoïdes et autres dérivés phénoliques ainsi que leurs esters, des dérivés aromatiques volatiles, des minéraux telles que : fer, calcium, zinc, cuivre et manganèse et des vitamines (B1, B2, B6, C et E) (Cardinault *et al.*, 2012 ; Wang *et al.*, 2016).

### III-2-3-Origine de la propolis

L'origine botanique de la propolis peut influencer la saveur, la couleur, l'arome et la composition chimique (Wang *et al.*, 2016). Plusieurs recherches ont montré que la propolis pouvait avoir deux origines :

- ✓ **Origine interne:** la propolis est un résidu issu de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe situé entre le jabot et l'intestin moyen appelé le gésier à pollen (Hegazi, 1997).
- ✓ **Origine externe :** Les plantes, essentiellement les arbres représentent la source principale du produit de base de la propolis. Parmi les principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis on peut citer : pin, bouleau, aulne et le peuplier (qui semble l'espèce la plus importante). Les abeilles rapportent le produit de base à la ruche, et le modifient en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement) (Massau, 2012 ; Murtala *et al.*, 2014 ; Nurby *et al.*, 2014).

### III-2-4-Propriétés physico-chimiques

La consistance de la propolis varie en fonction de la température, elle est dure et friable à 15°C, molle et malléable à 30°C, collante ou gluante entre 30 et 60°C, jusqu'à fondre en moyenne vers 60-70°C ou plus. Sa couleur varie selon sa provenance, elle peut être jaune claire, brune très foncée presque noire, verte, rouge...etc. De saveur âcre et parfois amères, d'odeur agréable et douceâtre mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille ...etc.). Son point de fusion se situe autour de 70°C et sa densité est de 1.2 (soit supérieur à celle de l'eau). La propolis est insoluble dans l'eau à froid, elle est en revanche, Partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme...etc (Donnadiou, 2008 ; Nurby *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2016).

### III-2-5-Propriétés pharmacologiques et biologiques

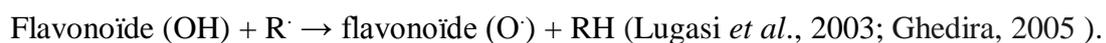
La propolis est utilisée par l'homme sur le plan médical depuis des millénaires en raison de ses activités à large spectre qui peuvent être utilisées dans la médecine complémentaire et alternative. Malgré des différences de composition entre les propolis, un certain nombre de propriétés pharmacologiques et/ou d'effets santé commun font consensus (Cardinault *et al.*, 2012 ; de Mendonça *et al.*, 2015).

#### III-2-5-1-Activité antioxydant et anti radicalaire

Des extraits enrichis en flavonoïdes et en polyphénols issus de la propolis présentent des propriétés anti-oxydantes par inhibition de la lipoperoxydation de l'acide linoléique. L'activité antiradicalaire est mise en évidence vis -a- vis du radical DPPH. C'est la fraction la plus concentrée en flavonoïdes qui piège le mieux le radical libre DPPH. *In vivo*, la propolis réduit significativement la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumon, cerveau) et module l'expression des enzymes anti oxydantes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) (Ghedira *et al.*, 2009 ; Cardinault *et al.*, 2012 ; de Mendonça *et al.*, 2015). En effet les polyphénols essentiellement les flavonoïdes exercent leur activité antioxydant à travers :

##### 1-Piégeage des radicaux libres

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles (OH·), anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) et radicaux peroxylipidiques, selon la réaction suivante :



##### 2-Interaction avec les ions métalliques

Les flavonoïdes sont également capables de chélater les ions métalliques (largués à partir de leurs protéines de fixation ou de transport) qui peuvent renforcer ces effets délétères par la Production des radicaux hydroxyles (OH·) (Lugasi *et al.*, 2003; Ghedira, 2005 ).

##### 3-Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase, de la phospholipase A2 et des enzymes de l'inflammation : la cyclooxygénase et la lipooxygénase (Ghedira, 2005).

### III-2-5-2-Activité anti-inflammatoire

Plusieurs études ont montrés que la propolis possède une activité anti-inflammatoire significative, à travers plusieurs mécanismes d'actions : inhibition de l'activation de certaines molécules du système immunitaire (IL-6), inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation, modification de métabolisme de l'acide arachidonique, et l'inhibition de l'activation et la différenciation des macrophages mononucléaire (Ghedira., 2005 ; Ghedira *et al.*, 2009).

### III-2-5-3-Activité antimicrobienne

L'activité bactéricide de la propolis est la plus largement documentée. Cette activité à large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram+ et Gram-. parmi les bactéries inhibées : des Bacilles (*Cereus* et *subtilis*), *Staphylococcus* (*aureus* et *mutans*), des *Pseudomonas*, des *Proteus*, des *Clostridium*, *Escherichia coli* et *faecalis*, *Candida albicans*...etc (Ghedira *et al.*, 2009 ; Oliveira *et al.*, 2010).

Les différentes études mécanistiques suggèrent que la propolis pourrait inhiber la croissance bactérienne par blocage de la division cellulaire, par une désorganisation du cytoplasme, par une inhibition de la synthèse protéique ou par une inhibition du processus d'adhésion (Cardinault *et al.*, 2012).

### III-2-5-4-Autres propriétés

La propolis exerce une activité fongicide contre les germes appartenant au genre *Candida*, mais aussi contre les champignons de type *Aspergillus* et *Mycrosporium* ainsi que contre les levures (Cardinault *et al.*, 2012).

Les études ont montré que la propolis et/ou ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus : myxovirus, poliovirus, coronavirus, rotavirus, adénovirus (Cardinault *et al.*, 2012). De plus, la propolis est active contre le virus de la grippe et améliore les symptômes grippaux chez la souris. L'ester phényléthylique de l'acide caféique (CAPE) est un des plus puissants agents anti-intégrase du VIH (Ghedira *et al.*, 2009).

Selon certains études, la propolis serait efficace contre la plupart des parasites répandus essentiellement dans les pays tropicaux et subtropicaux, tels que : les trichomonas, les trypanosoma, la leishmania ou *Giardia lamblia* (Cardinault *et al.*, 2012).



# ***Partie pratique***

# **Matériel et méthodes**

## **IV -Matériel et méthodes**

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie, département de biologie moléculaire et cellulaire, faculté des sciences de l'université de Jijel, durant une période de deux mois et demi. Il concerne l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) contre la toxicité hépatique et cardiaque induite par le méthotrexate sur les rats wistar albinos.

### **Partie 1 : Etude phytochimique de la propolis**

#### **1- Récolte de la propolis**

Les échantillons de la propolis sont récoltés au mois mars et d'avril (2016), ils sont fournis par des apicultures de deux régions (Texenna, Kaous), la récolte est effective par un grattage et raclage des cadres et des parois de la ruche. Avant l'utilisation, les échantillons de la propolis ont été maintenus à température ambiante dans l'obscurité.

#### **2- Préparation de l'extrait éthanolique de la propolis**

L'EEP est obtenu par extraction selon la méthode de Bruneton (1995). Pour cela, les échantillons de la propolis coupés en petits morceaux sont soumis à une extraction par macération dans l'éthanol 95% (20 g de la propolis pour 100 ml d'éthanol) sous agitation et à l'abri de la lumière. Suite à la filtration des macéras sur papier filtre wattman, l'évaporation des filtrats obtenus à 60 °C est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Evaporateur E100 ,Hei dolph). Juste après l'évaporation, les résidus obtenus de chaque échantillon sont pesés pour calculer le rendement d'extraction, selon la formule suivante :

**Rendement d'extraction en (%) =  $(E_1/E_0)$**

**Avec :**

$E_1$  : masse de l'extrait obtenu(g)

$E_0$  : masse de la prise d'essai (g)

En fin, les résidus sont récupérés dans l'éthanol 95% afin d'obtenir l'EEP. Les deux extraits obtenus sont conservés à l'abri de la lumière et à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

### **3-Dosage des polyphénols totaux**

L'évaluation des polyphénols totaux est réalisée selon la méthode colorimétrique de Folin – Ciocalteu décrite par Singleton et Rossi en 1965, qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ), et acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 735nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait.

Brièvement, 500  $\mu$ l de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à  $1/10^{6me}$  dans l'eau) sont ajoutés à 100  $\mu$ l d'extrait dilués (1/10000). Le mélange obtenu est laissé 5 min à température ambiante, puis 400  $\mu$ l de la solution de carbonate de sodium (75 g/l) sont ajoutés. Après incubation à 20°C pendant 30 minutes, l'absorbance est lue à 735nm grâce à un spectrophotomètre (Jasco V-630) UV-Visible contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

La quantification des polyphénols est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (0-400  $\mu$ g/ml) dans les mêmes conditions que les extraits (Annexe 1, figure 1).

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec d'extrait (mg EAG/g extrait).

### **4-Dosage des flavonoïdes totaux**

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) décrite par Bahorun *et al.*, en 1996. La réaction est basée sur la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones des flavonoïdes, ce qui donne une coloration jaune dont l'intensité est quantifiée à 430 nm.

1ml d'extrait dilué est mélangé avec 1ml de la solution d' $AlCl_3$  à 2% (préparé dans le méthanol). Après un repos de 10min, l'absorbance est lue à 430 nm.

La quantification des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage réalisé avec la quercétine (0-200  $\mu$ g/ml) dans les mêmes conditions que les extraits (Annexe 1, figure 2).

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de la quercétine par gramme de poids sec d'extrait (mg EAG/g extrait).

## **5- Etude du pouvoir anti –radicalaire**

L'activité anti-radicalaire des extraits de la propolis a été évaluée in vitro, par le test au DPPH°. Le DPPH° (2,2 diphenyl 1picryl hydrazyl) de couleur violette, vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2 diphenyl 1picryl hydrazine. La solution de DPPH° est préparée à l'avance à 10<sup>-4</sup> M dans le méthanol (au moins 3 à 4h) car la solubilisation est difficile et ne se conserve pas plus de 48h à l'obscurité.

À 0,25 ml de l'extrait de kaous à différents concentrations (50, 100, 200,400 µg/ml), 0,75ml de la solution méthanolique de DPPH° est additionné. Après agitation et incubation pendant 30 mn à température ambiante et à l'abri de la lumière, la diminution de la DO est lue à 517nm contre un blanc méthanol.

Le mélange contenant 0,25ml de méthanol et 0,75 ml de DPPH° est considéré comme contrôle négative. La quercétine est utilisée comme témoin pour la comparaison de l'effet scavenger avec l'extrait.

L'activité anti-radicalaire est exprimée en pourcentage de réduction du DPPH° en utilisant la formule suivante :

$$I = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

Dont :

**I** : Pourcentage d'inhibition.

**A<sub>B</sub>** : Absorbance du contrôle négatif.

**A<sub>A</sub>** : Absorbance de l'échantillon.

## **Partie 2-Etude de l'effet antioxydant de l'EEP *in vivo***

### **1-Animaux et conditions d'hébergement**

L'étude a été réalisée sur des rats de souche *Wistar albinos* (Institut Pasteur d'Alger) pesant environs de 195-240 g. Les animaux sont placés en cages avec un accès libre à la nourriture et à l'eau et maintenus dans une animalerie à température constante (22°C), hygrométrie de 60% et un cycle de lumière/obscurité de 12/12heures.

## **2-Traitement des animaux**

Notre travail est consacré à l'étude *in vivo* de l'effet protecteur de l'EEP contre la toxicité induite par le MTX .Pour la réalisation de cette étude *in vivo* nous avons choisi la propolis de Kaous.

Le méthotrexate (cytotrex 2.5 mg, comprimé) est utilisée non pour son action anticancéreuse mais pour son effet hépatotoxique.

Le traitement des animaux a été effectué comme suit :

- ✓ **Premier lot (témoin)** : les rats reçoivent 1ml d'eau distillée par voie orale une fois par jour pendant 15 jours.
- ✓ **Deuxième lot (MTX)** : les rats reçoivent 1ml d'eau distillée par voie orale une fois par jour pendant 7 jours, puis une dose répétée du MTX 20 mg/kg pendant 8 jours par voie orale.
- ✓ **Troisième lot (EEP+MTX)** : les rats reçoivent une dose de 100 mg/kg de la propolis par voie orale pendant 7 jours, puis une dose répétée du MTX 20 mg /kg pendant 8 jours par voie orale.
- ✓ **Quatrième lot (Quercétine +MTX)** : les rats reçoivent une dose journalière de 10 mg/kg de la quercétine par voie orale pendant 7 jours, puis une dose répétée du MTX 20 mg /kg pendant 8 jours par voie orale.

## **3-Prélèvement du sang**

Le sang est prélevé, avec un capillaire dans des tubes héparinés, par ponction de la veine du sinus –orbital au niveau de l'œil des rats. Le sang est centrifugé à 3300 rpm pendant 15 min, le plasma est aliquoté puis congelé à -20°C pour l'analyse des paramètres biochimiques. Juste avant l'emploi le surnageant doit être décongelé à la température ambiante.

## **4-Sacrifice des animaux et prélèvement des organes (foie et cœur)**

Après 8 jours de l'administration de MTX les rats sont euthanasiés par inhalation des vapeurs du chloroforme, la paroi abdominale est ouverte, le diaphragme est incisé le cœur, et le foie sont prélevés, plongés, lavés dans le NaCl 0.9 % et congelés à – 20°C pour réaliser les dosages tissulaires.

## 5-Dosage des paramètres sériques

La mesure des activités plasmatiques des enzymes pour le diagnostic de l'atteinte hépatique et cardiaque, à savoir le lactate déshydrogénase (LDH), la créatine phosphokinase (CPK), les transaminases (TGO, TGP), la bilirubine, la phosphatase alcaline, et les protéines totales a été effectuée en utilisant des kits SPINREACT sur automate (ARCHITECT ABBOTT), le dosage est effectué selon les instructions du fabricant.

## 6-Dosage des marqueurs du stress oxydatif

### 6-1-Préparation de la fraction cytosolique

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par Iqbal *et al.*, (2003) .Pour cela, 0,5 g du foie et du cœur sont coupés et homogénéisés par un Potter en verre dans 3 volume de la solution de tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1M, pH 7, 4) contenant KCL (1,17M) .Après découpage en morceaux fins et homogénéisation, l'homogénat est centrifugé à 4000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C à l'aide d'une centrifugeuse SIGMA 3-16PK pour séparer les débris cellulaires , le surnageant obtenu est centrifugé à 10000 rpm à 4 °C pendant 30 mn. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source d'enzymes.

### 6-2-Dosage du malondialdéhyde (MDA) cytosolique ou test TBARS

Le dosage de MDA est réalisé selon la méthode décrite par Okhawa *et al.*, (1979). cette méthode utilise l'acide thiobarbiturique (TBA). En effet, la détection du MDA présent dans les échantillons biologiques se base sur la réaction au cours de laquelle, 2 molécules de TBA réagissent avec une molécule de MDA ce qui entraîne la formation d'un complexe coloré en rose susceptible d'un dosage spectrophotométrique.

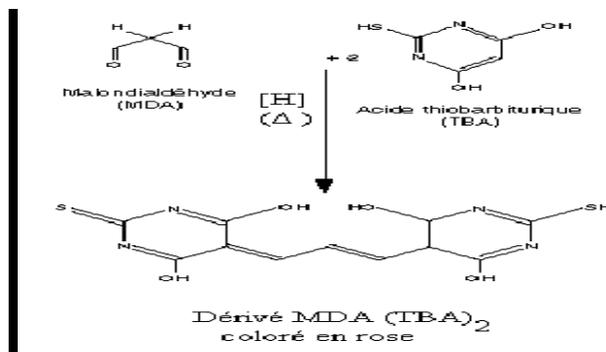


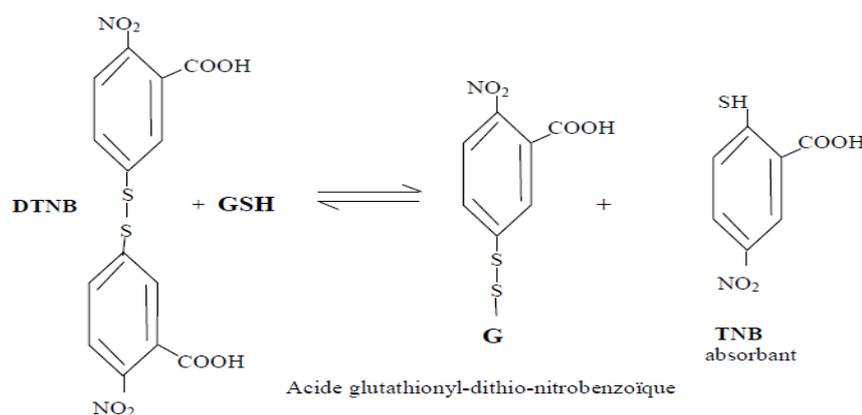
Figure 4 : Principe de dosage de MDA.

Pour ce dosage, 0.5 ml de TCA (20%) et 1 ml de TBA (0.67%) sont ajoutés à 0.5 ml d'homogénat. Le mélange est porté au bain-marie à 100°C afin de favoriser la réaction du MDA avec le TBA. Après 15 minutes, Les échantillons sont refroidis pendant 5 minutes, ensuite 4 ml de n-butanol sont ajoutées. Le mélange est centrifugé à 3000 rpm pour une durée de 15 minutes à l'aide d'une centrifugeuse ILETTICH –EBA 20, la DO est lue sur le surnageant à 532 nm.

Le taux de MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant une solution du tétraoxypropane (TEP) qui donne le MDA après leur hydrolyse (Annexe 2 figure 3).

### 6-3-Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Le principe est basé sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5, 5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) qui, au pH alcalin, présente une absorbance à 412 nm, selon la réaction suivante :



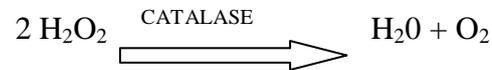
**Figure 5** : Principe de dosage de glutathion.

Pour ce dosage, 50 µl du surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0,01 M, pH=8). 20 µl du DTNB (0,01M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 15 min d'incubation, la lecture de la DO est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le tampon phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 7, 4) contenant KCL (1,15M).

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimés en millimoles de glutathion par gramme de tissu (Annexe 2 figure 2).

#### **6-4-Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique**

L'activité enzymatique de CAT est déterminée par la méthode de Clairborne (1985). Le principe est basé sur la dégradation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de la source enzymatique à 25 °C en eau (H<sub>2</sub>O) et dioxygène (O<sub>2</sub>) selon la réaction suivante :



La mesure de cette activité a été effectuée par un mélange de 1 ml de tampon phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 M, pH 7.2), 0.950 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.019 M) et de 0.025 ml de la source enzymatique (fraction cytosolique). L'absorbance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est lue à 240 chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique est calculée en terme d'unité internationale par minute et par gramme de protéine (UI / min/g de protéine), selon la formule suivante :

$$\text{UI/g} = (2.3033/T) \times (\log A1/A2) / \text{g de protéine.}$$

Sachant que :

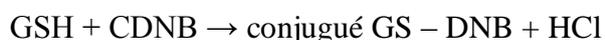
**A1** : Absorbance au temps 0 mn.

**A2** : Absorbance après 1mn.

**T** : Intervalle de temps en mn.

#### **6-5-Mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase (GST) cytosolique**

L'activité de la GST est déterminée selon la méthode de Habig *et al.* (1974). La GST catalyse la réaction de conjugaison entre le glutathion et le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) comme substrat. La conjugaison se fait par le biais du groupement thiol du glutathion selon la réaction suivante :



Le produit issu de cette réaction (GS - DNB) absorbe à 340 nm. L'augmentation de l'absorption est directement proportionnelle à l'activité GST de l'échantillon. Cette dernière est déterminée classiquement par la mesure à 340 nm (et 25C°) de la formation du produit de la réaction de conjugaison du CDBN avec du glutathion réduit.

Le mélange réactionnel contient 1700 µl du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) et 100 µl du CDBN (20 mM).Après incubation du mélange réactionnel à 37°C pendant 10 min, la réaction est démarrée par l'addition de 100 µl de l'homogénat diluée 1 /100 et de 100 µl du glutathion (20 mM).

La variation de la densité optique est lue chaque minute pendant 5 min à 340 nm. Le calcul de l'activité de la GST, exprimée en UI/ml, a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) selon la relation suivante :

$$\text{Activité (UI/ml)} = (\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}/\text{T})_{\text{E}} - (\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}/\text{T})_{\text{B}} \times V_{\text{t}} \times F / \epsilon \times V_{\text{EZ}}$$

$(\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}/\text{T})_{\text{E}}$  : différence de l'absorbance échantillon.

$(\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}/\text{T})_{\text{B}}$  : différence de l'absorbance du blanc.

$V_{\text{t}}$  : volume réactionnel total (ml).

$F$  : facteur de dilution.

### **7-Dosage des protéines :**

Le dosage est réalisé selon la méthode de Bradford (1976) qui consiste à mesurer la concentration protéique. C'est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance mesuré à 595 nm, qui se manifeste par le changement de la couleur de bleu brillant de coomassie (BBC: G250) après complexation avec les acide aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines.

La réalisation de ce dosage nécessite de mélanger 0.1 ml d'homogénat dilué (1/5) avec 3 ml du reactif de Bradford dilué (1/2). Après agitation, la lecture est lue à 595 nm 5 min plus tard. La concentration en protéines est déterminée à partir d'une gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons avec de l'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations (0-1 mg/ml).

### **8-Traitement des résultats**

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous formes de moyenne  $\pm$ écart type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par le MTX à celle des groupes témoins d'une part ,et d'autre part à celle traités par la quercétine et EEP de la propolis en utilisant le test t de *student* avec un seuil de signification supérieur à 95% ( $p < 0,05$ ).

( $p > 0,05$ ), effet non significatif ns.

( $p < 0,05$ ), désigne un effet significatif \*.

( $p < 0,01$ ), désigne un effet hautement significatif\*\*.

( $p < 0,001$ ), désigne un effet très hautement significatif\*\*\*.

## V-Résultats et interpretation

### Partie 1 - Etude phytochimique

Après la récolte de différents échantillons , on a remarqué que les échantillons ont des couleurs différentes (propolis de kaous : marron. Propolis de Texenna : marron foncé presque noire) . Cette variabilité de couleur est la conséquence d'une composition différente .

#### 1-Rendement d'extraction

Après évaporation à sec des extraits, nous avons pris le poids de l'extrait sec de chaque échantillon afin de calculer le rendement d'extraction. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau ci –dessous .

*Tableau 1: Rendement d'extraction des extraits éthanoliques de la propolis des deux régions.*

Les échantillons	Poids de propolis (g)	Poids sec de l'extrait éthanolique (g)	Rendement d'extraction (%)
EEP Kaous	85,7	23,82	27,79
EEP Texenna	73,79	19,79	26,81

A partir de notre étude expérimentale, nous avons constaté que le rendement d'extraction diffère d'un extrait à l'autre selon la région. L'extrait éthanolique de la propolis de Kaous présente le meilleur rendement (27,79%), par rapport à celui de Texenna avec un rendement de 26,81% .

#### 2-Teneur en polyphénol et en flavonoïdes

##### 2-1-Teneur en polyphénols

La quantité des composés phénoliques des deux extraits éthanoliques de la propolis, exprimée en mg équivalent d'acide gallique / g de propolis, est illustrée dans le tableau 2 .

*Tableau 2: Teneur en polyphénols dans les deux échantillons de propolis en mg EAG/g de propolis.*

	EEP Kaous	EEP Texenna
Teneur en polyphénols(mg EAG/g de propolis)	797,5±0,35	675±3,53

D'après les résultats obtenus les teneurs en polyphénols diffèrent d'un extrait à un autre selon la région de provenance de chaque propolis. La propolis de Kaous présente une teneur plus élevée en polyphénols ( $797,5 \pm 0,35$  EAG/g de la propolis) que celle de Texenna ( $675 \pm 3,53$  EAG/g de la propolis).

### 2-2-Teneur en flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes des deux extraits éthanoliques de la propolis, exprimée en mg EQ/g de propolis sont illustrées dans le tableau 3.

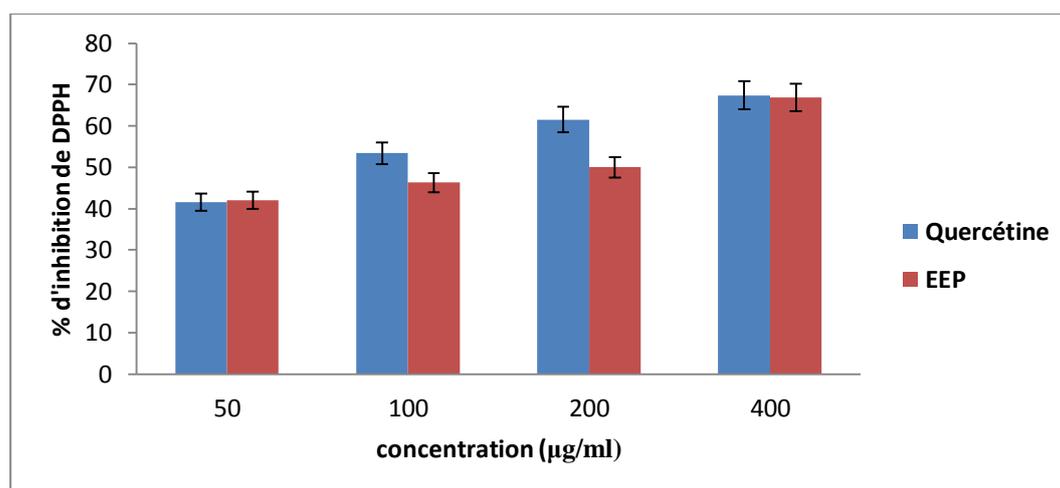
*Tableau 3: Teneur en flavonoïdes dans les deux échantillons de propolis en mg EQ/g de propolis.*

	<b>EEP Kaous</b>	<b>EEP Texenna</b>
<b>Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g de propolis)</b>	$340 \pm 3,66$	$333,3 \pm 1$

Nos résultats montrent que la propolis de Kaous est la plus riche en flavonoïdes ( $340 \pm 3,66$  mg EQ/g de la propolis) par rapport à celle de Texenna ( $333,3 \pm 1$  mg EQ/g de la propolis).

### 3-Effet anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis

La figure 6 montre les variations de l'effet scavenger de l'EEP de kaous, et de la quercétine à différentes concentrations molaires vis-à-vis de radical DPPH°.



*Figure 6: Evaluation de l'activité anti-radicalaire de l'EEP à différentes concentration vis-à-vis de radical libre DPPH°.*

L'évaluation du pouvoir antiradicalaire de l'EEP aux concentrations de 50, 100, 200 et 400 µg / ml repose sur le pourcentage de réduction du DPPH°. Nos résultats montrent que l'effet anti-

radicalaire de l'EEP est proportionnel à leurs concentrations (42,05±5,26, 46,36±6,43, 50,02±5,11 et 66,88±11,97 % respectivement). Les mêmes résultats sont enregistrés pour la quercétine avec des pourcentage d'inhibition (41,59±8,36, 53,42±15,55, 61,55±6,19 et 67,45±7,51 % respectivement). À la concentration de 50 et 400 µg / ml l'EEP présente une activité anti-radicalaire proche à celle de la quercétine, cette activité est diminuée pour les deux concentrations 100 et 200 µg / ml .

**Parti 2 - Etude *in vivo* de l'effet antioxydant de l'EEP**

**1-Paramètres sériques**

Les variations des taux des paramètres sériques des rats traités par le MTX seul, en association avec la propolis ou la quercétine sont démontrées dans le tableau 2 .

**Tableau 4 : Variations des taux des paramètres sériques des rats traités par des doses répétées de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg) ou avec la quercétine (10 mg/kg).**

	<b>Témoin</b>	<b>MTX</b>	<b>EEP+MTX</b>	<b>Quercétine+MTX</b>
<b>ASAT (UI/l)</b>	355,33±11,01	582±85,24 **	208,33±50,80###	292±79,89##
<b>ALAT (UI/l)</b>	68,33±2,51	108,66±11,59**	38±5,19###	33,66±12,34##
<b>PAL (UI/l)</b>	60,66±6,8	133±32,96*	56±10,39#	60,66±6,65#
<b>Bilirubine (mg/l)</b>	1,76±0,55	2,96±0,057**	2,1±0,17###	2,33±0,28#
<b>LDH (UI/l)</b>	1365,5±456,47	2326,66±410,04*	1291±384,51#	1985,66±88,37ns
<b>Protéines totales (g/l)</b>	150,33±8,5	135,33±4,04*	145,66±1,15#	191±1,52#
<b>CPK (UI/l)</b>	1623,66±551,15	3480,66±866,38*	1089±55,42##	661,6±845,8#

**1-1- Aspartate amino-transférase (ASAT/GOT)**

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative (p<0.01) des taux de TGO des rats traités par le MTX (582±85,24 UI/l) par rapport aux rats témoins (355,33±11,01 UI/l) . Pour les rats prétraités par l'EEP, on observe une diminution très hautement significative (p<0.001) par rapport à celle des rats traités par le MTX et une diminution hautement significative (p<0.01) pour la quercétine ou la substance de référence . L'effet de la propolis est mieux que celui de la quercétine avec des taux (208,33±50,80 ; 292±79,89 UI/l respectivement ) .

### **1-2-Alanine amino-transférase (ALAT/TGP)**

On constate une augmentation hautement significative ( $p < 0.01$ ) des taux de TGP des rats traités par le MTX par rapport aux rats témoins avec ( $108,66 \pm 11,59$  contre  $68,33 \pm 2,51$  UI/l). Pour les rats prétraités par l'EEP on observe une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) par rapport à celle des rats traités par le MTX. Chez les rats prétraités par la quercétine on observe une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ). L'effet de cette dernière est mieux que celui de la propolis ( $33,66$  contre  $38 \pm 5,19$  UI/l).

### **1-3-Phosphatase alcaline (PAL)**

Nous avons observé une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) du taux de PAL des rats traités par le MTX par rapport aux rats témoins ( $133 \pm 32,96$  contre  $60,66 \pm 6,8$  UI/l). Concernant les rats prétraités par l'EEP ou la quercétine une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de PAL par rapport aux rats traités par le MTX a été enregistrée. L'EEP possède un effet plus élevé que celui de la quercétine avec des taux ( $56 \pm 10,39$  contre  $60,66 \pm 6,65$  UI/l) .

### **1-4-Bilirubine**

Chez les rats traités par le MTX, on constate une augmentation hautement significative ( $p < 0.01$ ) du taux de la bilirubine par rapport aux rats témoins avec ( $2,96 \pm 0,057$  contre  $1,76 \pm 0,55$  mg/l). Les rats prétraités par l'EEP montrent une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) et significative ( $p < 0.05$ ) pour la quercétine , en comparaison avec les rats traités par le MTX. L'EEP possède un effet plus élevé que celui de la quercétine (  $2,1 \pm 0,17$ ;  $2,33 \pm 0,28$  mg/l respectivement ) .

### **1-5-Lactate déshydrogénase (LDH)**

Concernant les rats traités par le MTX, on observe une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) du taux de LDH par rapport aux rats témoins ( $2326,66 \pm 410,04$  contre  $1365,5 \pm 456,47$  UI/l). Les taux de LDH ont été diminués de façon significative ( $p < 0.05$ ) chez les rats prétraités par l'EEP et non significative ( $p > 0.05$ ) chez les rats prétraités par la quercétine. L'EEP présente un meilleur effet par comparaison avec celui de la quercétine .

### **1-6-Protéines totales**

Une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de la concentration des protéines totales chez les rats traités par le MTX par rapport aux rats témoins est observée ( $135,33 \pm 4,04$  contre  $150,33 \pm 8,5$  g/l). Pour les rats prétraités par l'EEP et la quercétine on constate une augmentation significative

( $p < 0.05$ ) de la concentration des protéines totales ( $145,66 \pm 1,15$  ;  $191 \pm 1,52$  g/l respectivement ) par rapport aux rats traités par le MTX .

### 1-7- Créatine phosphokinase (CPK)

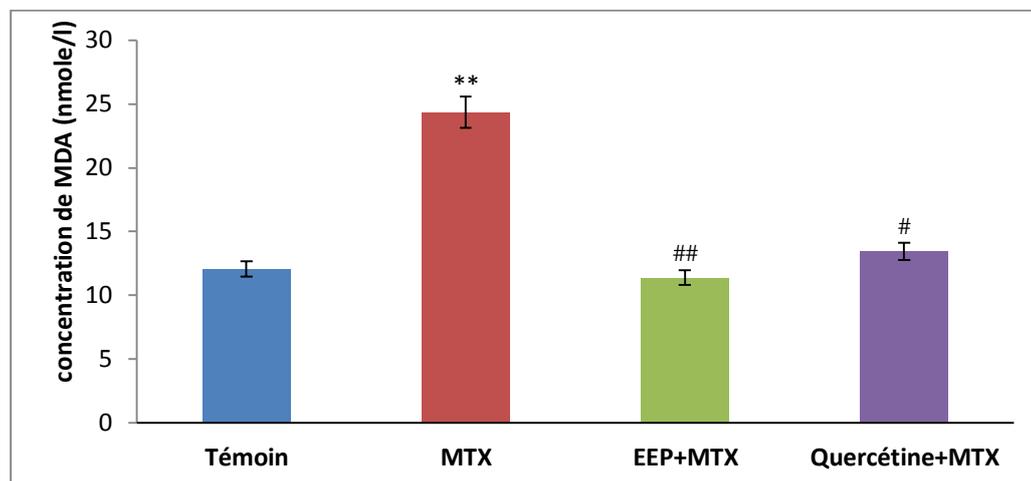
Nos résultats montrent une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) des taux de CPK chez les rats traités par le MTX par rapport aux rats témoins ( $3480,66 \pm 866,38$  contre  $1623,66 \pm 551,15$  UI/l) .Pour les rats traités par l'EEP , on constate une diminution ( $1089 \pm 55,42$  UI/l) hautement significative ( $p < 0.01$ ) par contre les rats traités par la quercétine on observe une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de taux de CPK ( $661,6 \pm 845,8$ ).

## 2-Dosage des marqueurs du stress oxydatif

### 2-1-Tissu hépatique

#### 2-1-1-Taux du MDA cytosolique

Les variations des taux du MDA cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) sont illustrées dans la figure 7 .



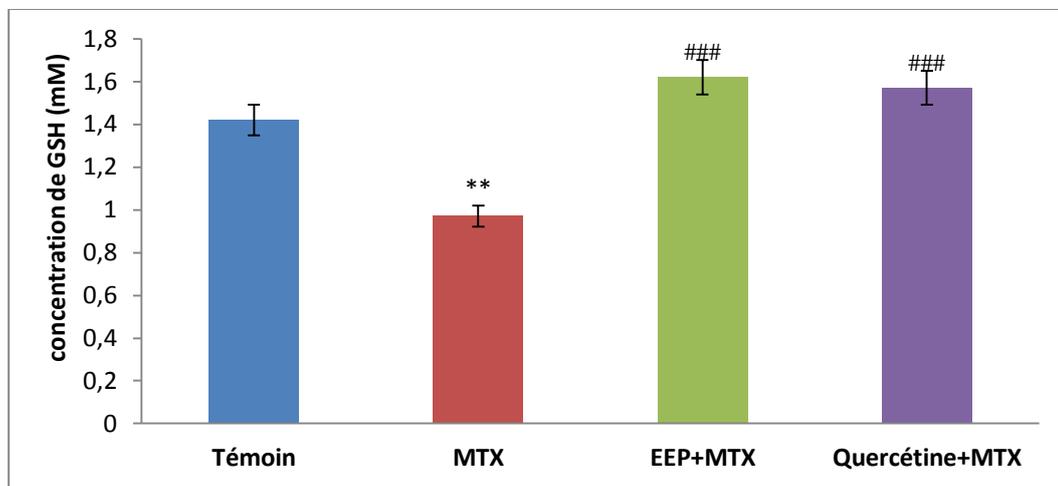
**Figure 7 : Taux du MDA cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) .**

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative ( $p < 0.01$ ) du taux de MDA chez les rats traités par le MTX par rapport aux rats témoins ( $24,36 \pm 3,28$  contre  $12,08 \pm 2,78$  nmole /l).

Concernant les rats prétraités par l'EEP, on constate une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ) par rapport aux rats traités par le MTX et une déplétion significative ( $p < 0.05$ ) pour les rats prétraités par la quercétine ( $11,38 \pm 0,78$ ;  $13,45 \pm 3,85$  nmole /l respectivement ) .

### 2-1-2-Evaluation des taux de glutathion

L'évolution des taux de GSH chez les rats traités par des doses répétées de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg), ou avec la quercétine (10 mg/kg) est enregistré dans la figure 8 .

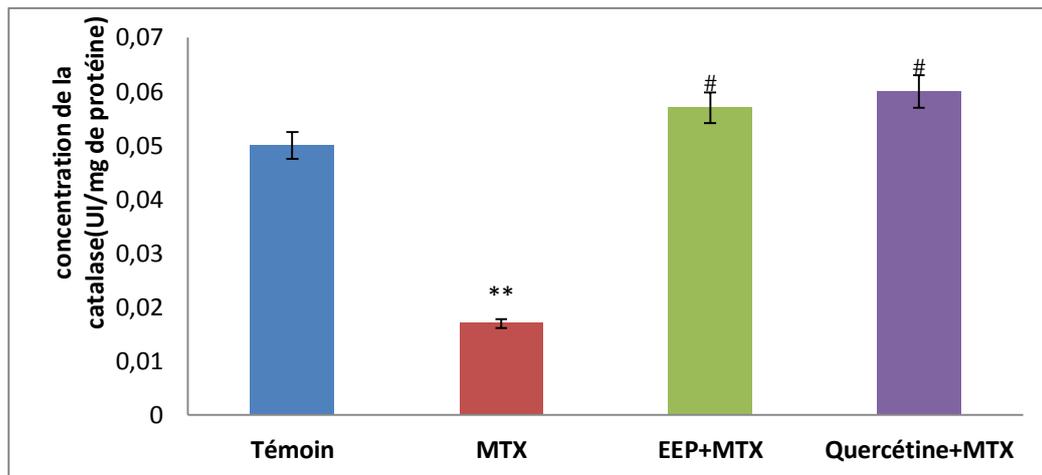


**Figure 8 : Evolution des taux de GSH cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr).**

D'après nos résultats, les rats traités par le MTX subissent une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ) de GSH par rapport aux rats témoins avec des concentrations ( $0,97 \pm 0,066$  contre  $1,42 \pm 0,15$  mM). Alors que le taux de GSH varie de façon très hautement significative ( $p < 0.001$ ) chez les rats prétraités par l'EEP et les rats prétraités par la quercétine ( $1,62 \pm 0,098$  contre  $1,57 \pm 0,058$  mM) par rapport aux rats traités par le MTX .

### 2-1-3-Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique

La figure 9 ci-dessous illustre l'activité de la catalase cytosolique hépatique chez les rats après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) .

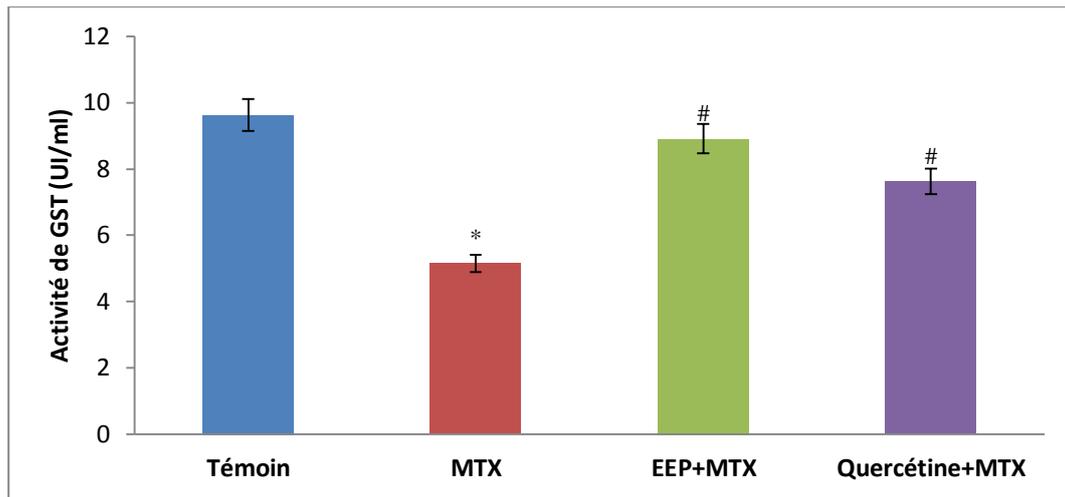


**Figure 9 :** Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) .

D'après les résultats, nous avons remarqué que l'administration de MTX seul a induit une déplétion hautement significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la CAT par rapport aux rats témoins ( $0,017 \pm 0,007$  UI/mg de protéines contre  $0,05 \pm 0,01$  UI/mg de protéines ). La mesure de l'activité de la CAT chez les rats prétraités par l'EEP ou la quercétine a montrée une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) , ( $0,057 \pm 0,013$ ;  $0,062 \pm 0,006$  UI/mg respectivement ) par rapport aux rats traités par le MTX .

#### 2-1-4-Evaluation de l'activité de la glutathion S-transférase hépatique

La figure 10 montre l'effet de l'EEP à 100 mg/kg et la quercétine à 10 mg/kg sur l'activité de la CAT chez les rats traités par des doses répétées de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP ou avec la quercétine .



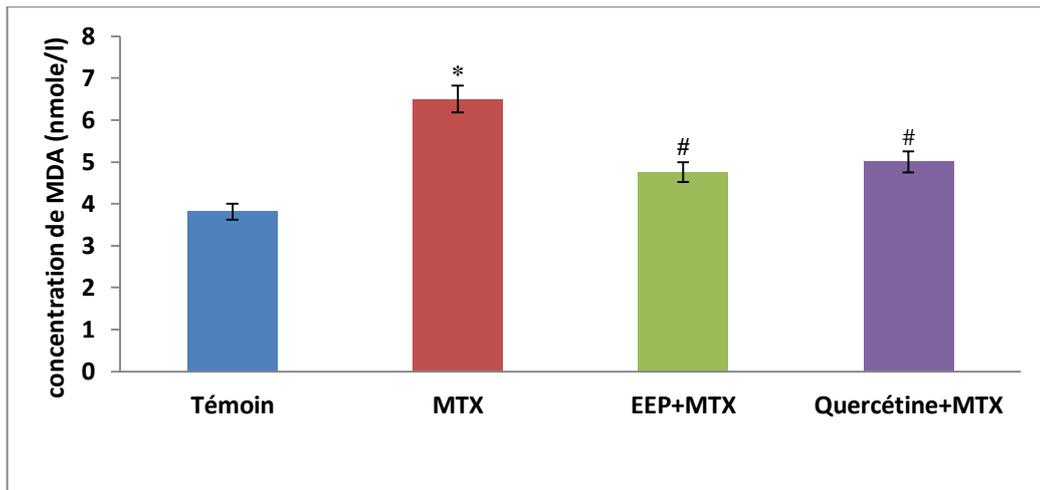
**Figure 10 :** Variations de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) .

Notre étude montre que l'administration de MTX seul a induit une déplétion significative ( $p < 0.05$ ) de la GST hépatique par rapport aux rats témoins ( $5,15 \pm 0,98$  contre  $9,95 \pm 0,47$  UI/ml) . Concernant les rats prétraités par l'EEP ou la quercétine on observe une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) de GSH ( $8,91 \pm 1,63$ ;  $7,62 \pm 1,07$  UI/ml respectivement) en comparaison avec les rats traités par le MTX .

## **2-2-Tissu cardiaque**

### **2-2-1-Taux du MDA cytosolique**

Les variations des taux du MDA cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seule, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) sont illustrées dans la figure 11 ci-dessous.

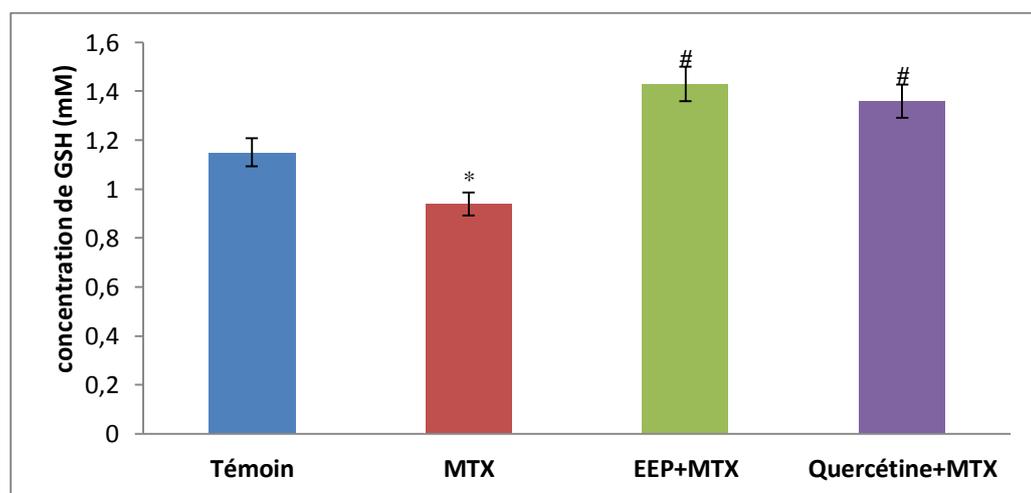


**Figure 11 :** Variations des taux du MDA cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr).

Nous avons remarqué une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) du taux de MDA chez les rats traités par le MTX par rapport aux rats témoins ( $6,83 \pm 0,76$  contre  $3,81 \pm 0,75$  nmole/l). Pour les rats prétraités par l'EEP ou la quercétine on constate une diminution significative ( $p < 0.05$ ) du taux de MDA ( $4,76 \pm 1,14$  et  $5 \pm 0,43$  respectivement) par rapport aux rats traités par le MTX.

### 2-2-2-Evaluation des taux de glutathion

La figure 12 montre les variations des taux de GSH cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr).

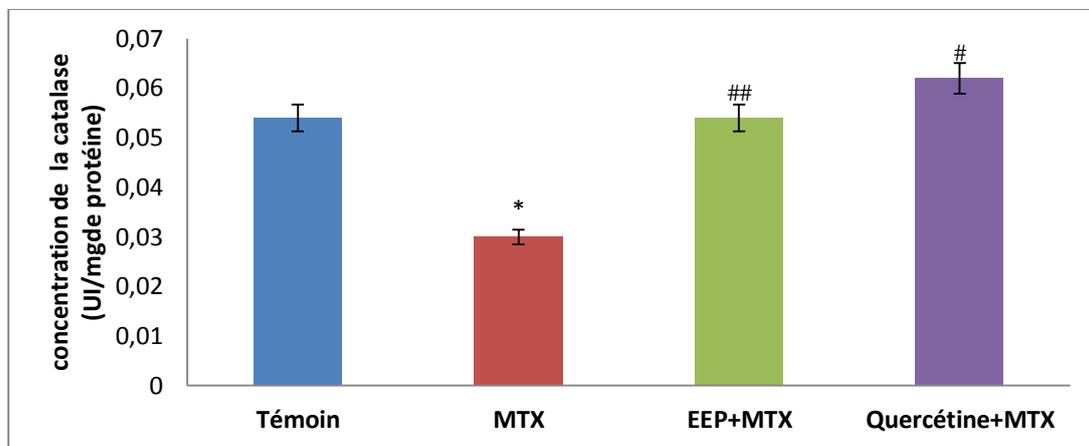


**Figure 12 :** Variations des taux de GSH cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr).

Dans cette présente étude, les résultats ont montrés une diminution significative ( $p < 0.05$ ) du taux de GSH chez les rats traités par le MTX par comparaison avec les rats témoins ( $0,94 \pm 0,064$ ;  $1,15 \pm 0,075$  respectivement). Par contre on constate une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) du taux de GSH chez les rats prétraités par l'EEP ou la quercétine ( $1,43 \pm 0,22$  contre  $1,36 \pm 0,2$ ) par rapport aux rats traités par le MTX .

### **2-2-3-Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique cardiaque**

L'effet de l'EEP à 100 mg/kg et la quercétine à 10 mg/kg sur l'activité enzymatique de la catalase après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EPP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) est représenté dans la figure 13 ci-dessous .

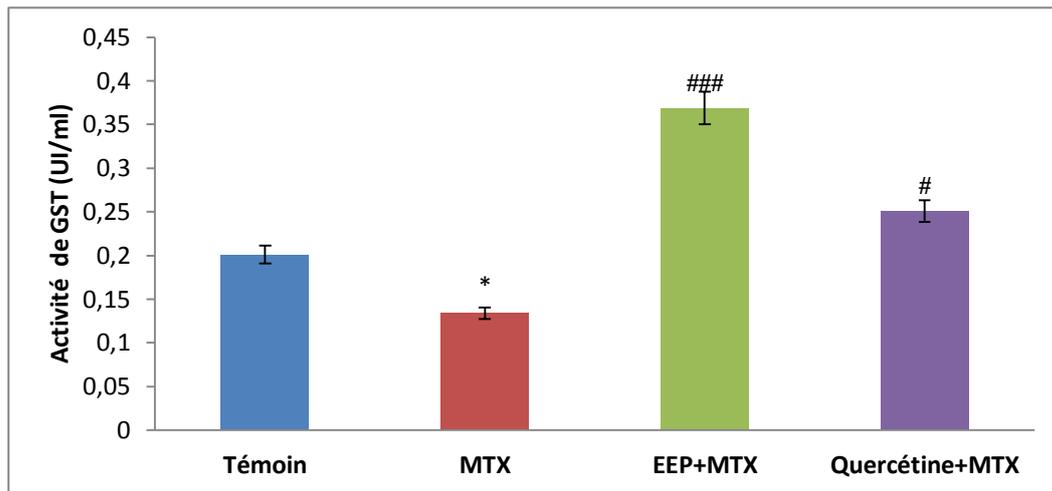


**Figure 13 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr) .**

Une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de l'activité de la CAT est enregistrée chez les rats traités par le MTX seul par rapport à celle mesurée chez le groupe témoin ( $0,03 \pm 0,01$  contre  $0,054 \pm 0,012$  UI/mg de protéines). Cette activité est augmentée de façon hautement significative ( $p < 0.01$ ) pour les rats prétraités par l'EEP ( $0,062 \pm 0,005$  UI/mg de protéines ) et significative ( $p < 0.05$ ) chez les rats prétraités par la quercétine ( $0,054 \pm 0,07$  UI/mg de protéines).

### **2-2-4-Evaluation de l'activité de la glutathion S-transférase**

La figure 14 illustre les variation de l'activité enzymatique de GST chez les rats témoins, traités par des doses répétées de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg) ou avec la quercétine (10 mg/kg)



**Figure 14:** Variations de l'activité enzymatique de la GST cytosolique cardiaque après administration orale de MTX (20 mg/kg) seul, en association avec l'EEP (100 mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr).

Une diminution significative ( $p < 0.05$ ) de l'activité de la GST a été constatée chez les rats traités par le MTX par rapport aux témoins ( $0,134 \pm 0,013$  contre  $0,201 \pm 0,045$  UI/ml). Pour les rats prétraités par l'EEP on observe une augmentation très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité enzymatique de la GST ( $0,369 \pm 0,035$  UI/ml) par rapport aux rats traités par le MTX. Cette activité chez les rats prétraités par la quercétine est significative ( $p < 0.05$ ) ( $0,251 \pm 0,05$  UI/ml).

**VI-Discussion**

La présente étude est consacrée en premier lieu à l'étude phytochimique des extraits de la propolis puis à l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur et cardioprotecteur de la propolis contre la toxicité induite par le MTX .

**1- Etude phytochimique**

Notre étude phytochimique a été portée sur l'évaluation de l'effet de l'origine botanique sur la composition chimique et l'activité anti-oxydante de la propolis .

Les deux échantillons collectés de la propolis présentent des couleurs (marron et marron foncé presque noire) et des odeurs différents, qui sont la conséquence de la différence de l'origine botanique des espèces de plantes constituantes de la flore botanique qui se situe à proximité immédiate des ruches. Selon (Velikova *et al.*, 2000 ; Kartal *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*,2016) , le climat, la zone géographique, et la saison de collecte sont aussi considérés comme des facteurs de cette variation .

Après la préparation des deux extraits éthanoliques, on constate qu'il y a une différence de rendements entre les deux échantillons selon la région. Le meilleur rendement est obtenu avec la propolis de Kaous (27,79 %) par rapport à celui de Texenna (26,81 %).

Nos résultats montrent que la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des deux échantillons est variable selon l'origine botanique de la propolis. On constate que l'EEP de kaous est l'extrait le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes, ceci est expliqué par l'influence des facteurs environnementaux sur la synthèse et l'accumulation de ces composés phénoliques. D'après les résultats obtenus par (Kebsa *et al.*,2014) la teneur en polyphénols dans l'EEP de kaous est 410,25 mg EAG/ g, cette teneur est plus faible que celle qu'on a trouvé dans notre étude. Alors que la teneur en flavonoïdes est très proche à celle obtenu par (Kebsa *et al.*,2014) (320,71 mg ER /g) et (Lahouel *et al.*,2008) ( 370 mg EQ / g) .

L'activité antiradicalaire de l'EEP de kaous vis-à-vis du radical libre DPPH° a été évalué par la méthode au DPPH°. Notre étude montre que l'EEP de kaous présente un effet très puissant et concentration dépendant. Par comparaison avec l'activité antiradicalaire de la quercétine on observe que les pourcentages d'inhibition sont très proche; cela nous indique que la propolis présente vraiment une forte activité anti-axydante. Ces résultats sont en accord avec plusieurs auteurs (Lahouel *et al.*, 2010 ; Kebsa *et al.*,2014 ; De Mendonça *et al.*,2015). Cette forte activité est expliquée par la présence des composés phénolique, particulièrement les flavonoïdes. L'une des

propriétés les plus éminents de ces derniers est leur excellente capacité de piéger les ROS (Wang *et al.*, 2016). Chen et al ont rapporté que les flavonoïdes ayant un pouvoir antioxydant très remarquable. Puisque la propolis contient des niveaux élevés en flavonoïdes, on pense que ces molécules biologiquement actives peuvent être responsables de cet effet antioxydant .

## **2-Evaluation de l'effet hépatoprotecteur et cardioprotecteur de la propolis contre la toxicité induite par le MTX**

### **2-1- Evaluation des paramètres sériques**

La présente étude vise d'abord à évaluer l'hépatotoxicité et la cardiotoxicité induite par le MTX en évaluant les marqueurs sériques et ses effets sur la balance antioxydant-prooxydant cytosolique, puis de voir l'effet hépatoprotecteur et cardioprotecteur de la propolis contre cette toxicité .

Les variations des taux des paramètres sérique sont utilisées comme marqueur de diagnostic des lésions et des dommages hépatiques et cardiaques. Des tests de la fonction hépatique et cardiaque menés par des analyses de sang donnent des informations sur l'état du foie et du cœur.

Dans notre étude, nous avons constaté que le taux des enzymes TGO, TGP, PAL, LDH ,la bilirubine et les CPK est élevé dans le plasma des rats traités par le MTX, par contre nous avons enregistré une diminution du taux des protéines totales, ceci par comparaison avec le taux obtenu chez les rats témoins. Ces résultats sont expliqués par la présence des lésions ou des nécroses au niveau des cellules hépatiques et cardiaques qui permettent la libération des paramètres sériques dans le plasma. Les résultats de notre étude sont conformes aux travaux précédents (Demiryilmaz *et al.*, 2012; Moghadam *et al.*, 2015; Erdogan *et al.*, 2015) .

Selon Tunali-Akbay et al., les rats traités par le MTX présentaient un effet toxique sur le foie où il a provoqué une élévation notable des activités sériques d'ALAT et ASAT (Tunali-Akbay *et al.*,2010). L'ALAT est une enzyme cytosolique de l'hépatocyte, son activité sérique accrue reflète une fuite dans la membrane plasmatique, ce qui, à son tour, associée à la mort cellulaire. Il est considéré comme l'un des meilleurs indicateurs de la nécrose du foie (Hemeida et Mohafez, 2008Tag ; 2015).

D'après ( Lahouel *et al.*, 2011), les flavonoïdes de l'extrait ethanolique de la propolis protègent les tissus du foie et du cœur chez les rats traités par des médicaments anticancéreux. Dans notre étude on constate que l'EEP et la quercétine ont des effet hépatoprotecteurs et cardioprotecteurs contre les dommages induits par le MTX, ceci est illustré par la diminution du taux des enzymes

sériques et par l'augmentation de celui des protéines totales dans le sérum des rats prétraités par l'EEP et la quercétine. Nos résultats sont en accord avec celui de (Tag, 2015). Tag a étudié l'effet hépatoprotecteur de mûrier contre l'hépatotoxicité de MTX et a rapporté que l'administration de mûrier empêche l'augmentation de l'ASAT et l'ALAT et améliore la fonction hépatique grâce aux propriétés antioxydantes de ses composants de mûrier, en particulier les flavonoïdes ( à savoir, la quercétine, la rutine...) . Les résultats de notre étude sont conformes ainsi aux travaux de (Birsen, 2011) qui a constaté que l'administration de la quercétine a un effet hépatoprotecteur contre la toxicité hépatique du MTX, cela par l'amélioration de taux des paramètres sériques dans le sang, de la peroxydation lipidique et des systèmes enzymatiques et non enzymatiques .

### **2-2-Evaluation des marqueurs du stress oxydatif**

#### **2-2-1-Malondialdéhyde (MDA)**

La peroxydation lipidique est l'un des principaux effets de l'attaque radicalaire conduit à la formation de malondialdéhyde (MDA). Il représente le processus de dégradation oxydative des acides gras poly - insaturés. Sa présence dans les membranes biologiques provoque une altération de la fonction membranaire, une altération de l'intégrité structurale, une diminution de la fluidité membranaire, et une inactivation de nombreux enzymes et récepteurs liée à la membrane (Alyane *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Nirala et Bhadauria, 2008; Cichoz-Lach et Michalakn,2014 ) .

Notre étude montre une augmentation hautement significative du taux de MDA hépatique (significative au niveau cardiaque) dans les groupes d' animaux recevant le MTX seul, cette augmentation est un indicateur de la toxicité du médicament et de la peroxydation lipidique qui est considérée comme une cause importante de la destruction et des dommages aux membranes cellulaires, ce qui a été suggéré d'être un facteur contribuant au développement des lésions tissulaires au niveau hépatique et cardiaque (Tag, 2015; Moghadam *et al.*, 2015 ). Les résultats obtenus sont en accord avec ceux trouvés par (Vardi *et al.*, 2010) qui ont constaté que le MTX provoque une lésion tissulaire oxydative par l'augmentation de la peroxydation des lipides dans les tissus du foie et la diminution des taux d'enzymes antioxydantes .

La co-administration de la propolis avec le MTX, réduit la formation de MDA dans les tissus hépatiques (de façon hautement significative) et cardiaques des rats. Cela peut être expliqué par la présence des polyphénols et surtout des flavonoïdes qui sont considérés comme des antioxydants puissants. L'effet protecteur des flavonoïdes peut être dû à leur capacité à réagir avec les radicaux peroxyde des acides gras polyinsaturés; inhibant ainsi de ce fait la peroxydation lipidique (Viswa, 2005 ;Tag, 2015; Wang *et al.*, 2016). Cet effet vis-à-vis de la peroxydation lipidique des

membranes est bien établi, et dépend de la structure moléculaire et de la capacité d'interagir et de pénétrer dans la bicouche lipidique (Santos *et al.*, 1998; patricia *et al.*, 2005). D'après (Sergio and Russel 1999; El-Demerdach *et al.*, 2004), le prétraitement par la beta-carotène provoque une protection de l'intégrité de la membrane des hépatocytes en empêchant la peroxydation des acides gras par les radicaux libre en comparaison avec les rats recevant le MTX.

### 2-2-2-Glutathion (GSH) :

Le GSH est un antioxydant non enzymatique de défense. Il joue un rôle important dans la désintoxication par la formation de métabolites réactifs conjugués (interaction directe du groupe -SH de GSH avec les ROS) et protège les membranes cellulaires contre l'oxydation (Tarasub *et al.*, 2012; Dhanesha *et al.*, 2015). La présente étude montre que le MTX pourrait réduire le taux de GSH, ce qui indique un déséquilibre entre les antioxydants et les oxydants dans le foie. Cette diminution du niveau de GSH modifie l'état redox cellulaires et les cellules pourraient être plus sensibles aux métabolites réactifs de l'oxygène. Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats obtenus par (Vardi *et al.*, 2010; Moghadam *et al.*, 2015).

D'après (Demiryilmaz *et al.*, 2012), l'un des mécanismes possibles liés à une réduction du GSH est basée sur la diminution de la disponibilité du NADPH dans les cellules. Cette diminution des taux de GSH est certainement due à l'effet toxique des métabolites réactifs instables de médicament qui sont fixés et neutralisés par le système de détoxification. De plus, le GSH est un substrat clef pour les enzyme antioxydantes telle que la GST qui neutralise le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, donc sa diminution peut être liée à sa consommation accru par ces enzymes (Philips *et al.*, 2001; Elia *et al.*, 2006).

Notre étude montre ainsi une diminution du taux de GSH cardiaque chez les rats traités par le MTX, résultat en accord avec la littérature (Eskandari *et al.*, 2014) où les chercheurs montrent une diminution de GSH cardiaque intracellulaire et l'augmentation du GSSG extracellulaire suite à l'administration des antimétabolites (5-fluorouracil, capecitabine) qui provoquent l'augmentation des niveaux intracellulaires des ROS et des dommages au niveau du cœur.

Le co-traitement par l'EEP provoque l'amélioration intracellulaire des taux cytosoliques de GSH. Cela montre que l'EEP avait un effet positif. On peut expliquer cette augmentation soit par l'action des flavonoïdes au niveau génétique pour induire la synthèse de cette protéine ou sur l'une des étapes de sa biosynthèse soit par l'effet scavenger des flavonoïdes c'est-à-dire au lieu que les métabolites réactifs toxiques se fixent et consomment le glutathion ils vont être captés par les flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Madiha *et al.*, 2012; Dalaklioglu

2013) qui ont constaté que cette déplétion pourrait être due à une stimulation de la synthèse de cet antioxydant et/ou à sa régénération par les polyphénols et les flavonoïdes.

### **2-2-3-Catalase (CAT) :**

La catalase est l'un des éléments qui permet le maintien de l'état normal dans la cellule. Elle agit comme un antioxydant catalysant la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et joue un rôle important dans la protection contre les effets délétères de la peroxydation lipidique, des ROS et des radicaux hydroxyles suite à l'administration du MTX (Dinkova-Kostova, 2002; Vardi *et al.*, 2008).

Nos données montrent une inhibition de l'activité de la CAT hépatique de façon hautement significative suite à l'administration du MTX seul. Ce résultat est en accord avec la littérature (Moghadam *et al.*, 2015; Hafez *et al.*, 2015). Cette diminution peut être due à une destruction de l'enzyme par les ROS ou à sa inhibition. Selon (Abdel-Ghaffar *et al.*, 2013) une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes peut être expliquée soit par leur induction lors de la conversion des radicaux libres en métabolites inactifs ou secondairement à l'effet inhibiteur direct du MTX sur les activités des enzymes.

Notre étude montre ainsi une diminution de l'activité de la CAT cardiaque chez le groupe traité par le MTX. Selon (Kebsa *et al.*, 2010) la doxorubicin est un anticancéreux qui provoque une déplétion de la CAT hépatique.

Le prétraitement par l'EEP a montré une amélioration de l'activité de la CAT ceci pourrait s'expliquer par l'effet piègeurs des ROS joué par la propolis. (Dalaklioglu *et al.*, 2013) ont prouvé que le traitement par le resvératol provoque l'augmentation de la CAT dans le foie.

### **2-2-4-Gluthation s-transférase (GST)**

Notre recherche montre une diminution des taux de GST hépatique de façon significative après le traitement par le MTX, résultat conforme avec celui trouvé par (Ikediobi *et al.*, 2004). La déplétion des taux de GST peut être expliquée par une production accrue des radicaux libres ou en raison d'une diminution significative de la machinerie antioxydante (Abdel-Ghaffar, 2013).

Le prétraitement par l'EEP provoque une augmentation des taux de GST. Résultats conforme avec la littérature (Dalaklioglu *et al.*, 2013) où les chercheurs montrent que le resvératol présente non seulement un effet de balayage directe sur les ROS mais aussi stimule la production intracellulaire des enzymes antioxydantes.

Les résultats obtenus montrent ainsi une diminution des taux de GST cardiaque chez les rats traités par le MTX. (Lemaire *et al.*, 1992) ont rapporté que l'original objectif de son étude était de relier la

cardiotoxicité de l'antimétabolite 5-fluorouracile au métabolisme du médicament dans le cœur. Donc cette diminution peut être expliquée par la production des ROS et/ou l'inactivation des enzymes antioxydantes. Par contre le taux de GST est augmenté chez les groupes prétraité par l'EEP grâce aux propriétés antioxydantes de la propolis et ces composés.

Les radicaux libres sont capables de réduire l'activité enzymatique de certains antioxydants endogènes tel que l'alpha tocophérol, le glutathion, la superoxyde dismutase, et la catalase. De ce fait ils sont responsables, en partie du stress oxydant (Stoyanovsky *et al.*,1998; Puntarulo *et al.*,1999). Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs activités antioxydantes. Ils sont des piègeurs des radicaux libres, des chélateurs des ions métalliques et également des inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation des radicaux libres (Cotelle *et al.*, 1996; Cos *et al.*, 1998; Rice-Evan *et al.*, 2005). Nos résultats confirment ces données et sont, en grande partie, similaires à ceux rapportés par Kashif *et al.*, (2004) : ils ont trouvé que l'exposition des rats au stress diminue l'activité enzymatique de la CAT et de GST, réduit le taux de glutathion mais, augmente celui de malondialdéhyde (MDA) par rapport au témoins. Par contre, le traitement par les antioxydants (vitamine E, C, et A) avant ou après l'exposition au stress augmente plutôt l'activité enzymatique de la GST, de la CAT, et le contenu cellulaire en glutathion et réduit dans l'autre côté les taux de MDA (Kashif *et al.*, 2004) .



## **Résultats et interprétation**

## ***Discussion***

# **Conclusion**

### **Conclusion**

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que le traitement par le MTX a induit une toxicité hépatique sévère ainsi qu'une toxicité cardiaque chez les rats wistar albinos. Cette toxicité est traduite d'une part par la libération des transaminases, LDH, bilirubine, PAL, CPK dans le sang et la diminution du taux des protéines totales, et d'autre part, par un déficit dans le système antioxydant enzymatique et non enzymatique avec augmentation de la peroxydation lipidique. Cela conduit à des altérations au niveau hépatique et cardiaque.

Le prétraitement par l'EEP a réduit la toxicité du MTX par amélioration du taux des paramètres sériques, augmentation du taux des protéines totales, normalisation du taux des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, et diminution de la peroxydation lipidique.

Cette recherche nécessite d'autres études plus approfondies pour mieux se concentrer sur les effets révélés. Il serait souhaitable de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres du statut antioxydant et pro-oxydant. Des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour développer le mécanisme hépatotoxique du MTX, déterminer la toxicité à d'autres niveaux et mieux connaître le mécanisme hépatoprotecteur et cardioprotecteur des polyphénols de la propolis.

# **Références bibliographiques**

### Références bibliographiques

- **Abdel-Ghaffar F R, El-Elaimy I A, El-Dougdoug K A, Nassar H I,2013.** Protective and modulatory effects of Curcumin and L-Carnitine against Methotrexate-induced Oxidative stress in albino rats. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 744.
- **Amacher D.E.** A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Hum. Exp. Toxicol.* **2002** May; 21(5):253-62. .In THESE DE MEDECINE. **2011**, TOXICITE HEPATIQUE DU PARACETAMOL A DOSE THERAPEUTIQUE : REVUE DE LITTERATURE ET PROPOSITION D'UN PROTOCOLE D'EVALUATION EN PERIODE POSTOPERATOIRE.
- **Alyane M, KebaW, Boussenane H, Rouibah H, Lahouel M,2008.**Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity.*Pak J Pharm Sci*, **21(3):**201-9.
- **Balloy T, Desroches M C, Moussay C, Merkadal L, Fernandezif C, Farinotti R, 2007.** Modalités de prise en charge des intoxications aiguës par le méthotrexate haute dose. *J Pharm Clin*, **26 (4):** 253-60.
- **Benguedouar L,Boussenane H N,Keba W, Alyane M, Rouibah H , Lahouel M,2008.**Efficiency of propolis against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents ( doxorubicin and vinblastine) in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, **46:112-119**.
- **Birsen A, 2011.**Quercetin Prevents Methotrexate-induced Hepatotoxicity without Interfering Methotrexate Metabolizing Enzymes in Liver of Mice. *Journal of Applied Biological Sciences* **5 (2):** 75-80, 2011.
- **Beylot-Barry M, Le Maitre M ,2011.**Methotrexate. *Annales de dermatologie et de vénéréologie* ,**138** :833-835.
- **Boutabet K , Keba W, Alyane M ,Lahouel M,2011.**polyphenolic fraction of algerianpropolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin .*Indian J Nephrol*, **21 (2):** 101-106.
- **Çakır T , BaştürkA , Polat C, Aslaner A, DurguthH, ŞehirliA Ö , GülM, ÖgünçA V, Gül S , SabuncuogluM Z, Oruç M T ,2015.** Does alfalipoic acid prevent liver from methotrexate induced oxidative injury in rats?.*Acta Cirúrgica Brasileira*, **30 (4):** 247-254.

- **Carpentier N, Ratsimbazafy V, Bertin P, Vergne P, Bonnet C, Bannwarth B, Dehais J, Treves R,1999.** Interaction méthotrexate /anti-inflammatoires non stéroïdiens : importance de la dose. *Journal de Pharmacie Clinique*, **18**:295-9.
- **Cardinault N, Cayeux M O, Percie du Sert P ,2012.** La propolis : origine, composition et propriétés .*Phytothérapie* ,**10**:298-304.
- **Castaldo S, Capasso F, 2002.**propolis and old remedy used in modern medicine. *Fitotérapie*, **73(1)**:1-6.
- **Castaing D, Smail A.** Anatomie du foie et des voies biliaires. EMC, Hépatologie, 7-001-A-10, **1999**, 12 p. In THESE de Doctorat en Pharmacie.**2009**, l'hepatotoxicite des anti-inflammatoires non steroïdiens, RABAT.
- **Chan S L E, Cronstein B N, 2002.**Molecular action of methotrexate in infalammatory diseases. *Res de l' arthrite*,**4 (4)**: 266-273.
- **Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, 1990.** Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants free *Radical .Biol Med*, **9**: 19-21.
- **Chira K, Suh J H, Saucier C, Teissèdre P L,2008.** Les polyphénols du raisin.*Phytothérapie* , **6** : 75-82.
- **Cichoż-Lach H, Michalak A, 2014 .**Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*,**20 (25)**: 8082-8091.
- **Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van-Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, and Vanden BJ,1998.**Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxyde scavengers. *J Nat Prod* ,**61**: 71-76.
- **Cotelle N, Bernier JL, Catteau JP, Pommery J, Wallet JC, Gaydou EM.1996.**Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic Biol Med*,**20**: 35-43.
- **Creaven P J, Hansen H H, Alford D A, Allen L M.** Methotrexate in liver and bile after intravenous dosage in man. *Br J Cancer***1973**; 28(6):589-91. In *THESE DE DOCTORAT EN MEDECINE*, **2014**, Psoriasis et Méthotrexate :Efficacite, Tolerance et Place therapeutique(A propos de 40 cas).
- **CronsteinB N, 2005.**Low-Dose Méthotrexate: A Mainstay dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.*Pharmacological*,**57(52)** :163-172.
- **Coralie L, 2010.**ETUDE DE LA TOLERANCE DU METHOTREXATE CHEZ LE CHIEN SAIN.THESE (Médecine – Pharmacie), LYON I.

- **Cutolo M, Sullia A, Pizzorni C, Serio B, 2001.** Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, **60**:729-735.
- **Dalaklioglu S, Genc G E, Aksoy N H, Akcıt F, Gumuslu S. 2013.** Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol*; **32**: 662-671.
- **David P.** Transplantation d'hépatocytes isolés: de la disponibilité en cellules humaines à l'application dans un modèle rat *in vivo*. Th: Sciences du vivant: Strasbourg I: **2000**, 252 p. In Thèse de Doctorat. **2004**, Evaluation de la cinétique de régénération hépatique et de l'efficacité de transplantation d'hépatocytes dans différents modèles murins d'insuffisance hépatique, Strasbourg.
- **Deavall D G, Martin E A, Horner, J M, Roberts R, 2012 .** Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J. Toxicol*, 1-1.
- **Demiryilmaz I, Sener E, Cetin N, Altuner D, Suleyman B, Albayrak F, Akcay F, Suleyman H. 2012.** Biochemically and histopathologically comparative review of thiamine's and thiamine pyrophosphate's oxidative stress effects generated with methotrexate in rat liver. *Med Sci Monit*, **18(12)**: 475-481.
- **De Mendonça I C G et al, 2015.** Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **15**:357.
- **Donadieu y, 2008 .** la propolis. Edition Dangles: paris.
- **Donehower R C, Hande K R, Drake J C, Chabner B A.** Presence of 2, 4-diamino-N<sup>10</sup>-methylptericoic acid after high-dose methotrexate. *Clin Pharmacol Ther* **1979**; 26(1):63-72. In *THÈSE De Doctorat*, 2008, Facteurs pharmacocinétiques et variabilité de Réponse aux médicaments utilisés dans le traitement des lymphomes, Toulouse.
- **El-Demerdash, F. M., Yousef, M. I., Kedwany, F. S., and Baghdadi, H. H., 2004.** Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and b-carotene. *Food and Chemical Toxicology*, **42**:1563–71.
- **ELIA C, DÖRR A J M, MASTRANGELO C, PREARO M, ABETE M C, 2006.** GLUTATHIONE AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN THE HEPATOPANCREAS OF CRAYFISH *PROCAMBARUS CLARKII* (GIRARD, 1852) OF LAKE TRASIMENO (ITALY) *Bull. Fr. Pêche Piscic*, 380-381.

- **Erdogan E, Ilgaz Y, Gurgor P N, Oztas Y, Topal T, Oztas E, 2015.** Rutin ameliorates methotrexate induced hepatic injury in rats. *ActaCirúrgicaBrasileira*, **30 (11):**778-784.
- **Eskandari M R, Moghaddam F, Shahraki J, Pourahmad J, 2014.** A comparison of cardiomyocyte cytotoxic mechanisms for 5-fluorouracil and its pro-drug capecitabine. *Xenobiotica*, 1-9.
- **Fekry B, Esmailniakooshkghazi A, Krupenko S A, Krupenko N, 2016.** Ceramide Synthase 6 Is a Novel Target of Methotrexate Mediating Its Antiproliferative Effect in a p53 Dependent Manner. *PLoS One*, **11 (1):** 0146618.
- **Frank C. Lu. 1992.** Toxicologie, données générales procédures d'évaluation, organescibles, évaluation du risque. Ed : Masson, p. 179,184. In Thèse de Doctorat en Sciences. **2014, Pistacia lentiscus L. : Evaluation pharmacotoxicologique, CONSTANTINE.**
- **Gaïes E, Jebabli N, Trabelsi S, Salouage I, Charfi R, Lakhall M, Klouz A, 2012.** Methotrexate Side Effects: Review Article. *J Drug Metab Toxicol*, **3:4**.
- **Gaïes E, Trabelsi S, Sahnoun R, Salouage I, Hamza I, Jebabli N, Klouz A, Lakhall M, 2010.** Modification of methotrexate pharmacokinetic by the use of amphotericin B: a case report. *J. Afr. Cancer*, **2: 264-266.**
- **Genestier L, Paillet R, Fournel S, Ferraro C, Miossec P et Revillard J P –** Immunosuppressive Properties of Methotrexate: Apoptosis and Clonal Deletion of Activated Peripheral T Cells – The American Society for clinical Investigation, Volume 102, Number 2, July **1998**, 322-328. In THESE de (Médecine – Pharmacie) , **2010**, ETUDE DE LA TOLERANCE DU METHOTREXATE CHEZ LE CHIEN SAIN, LYON.
- **Gervaise A, 2003.** Conduite à tenir en cas de prise en charge non chirurgicale d'une grossesse extra-utérine. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*, **32 : 64-74.**
- **Georgiev V, Ananga A and Tsoleva V, 2014.** Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*, **6 (1):**391-415.
- **Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R, 2009.** Propolis. *Phytothérapie* , **7: 100-105**
- **Ghedira K, 2005.** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4: 162-169.**
- **Guyton A.C.** The liver as an organ. *Textbook of Medical Physiology* 2nd édition, **1995**. p.835-840. In Thèse de Doctorat. **2004**, Evaluation de la cinétique de régénération hépatique et de l'efficacité de transplantation d'hépatocytes dans différents modèles murins d'insuffisance hépatique, Strasbourg.

- **Hafez H M, Ibrahim M A, Ibrahim S A, Amin E F, Goma W, Abdelrahman AM.2015.**Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats.*Eur J Pharmacol*, **768 (5)**:1-12.
- **Hegazi A G, 1997.**Propolis an overview. International Symposium on Apitherapy Cairo 8 and 9th Egypt.*IN Thèse de Doctorat, 2011*, Contribution à l'étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis,Constantine.
- **Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F, 2004.** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1** : 3-6.
- **Hemeida R A M, Mohafez O M, 2008.***J Egyptian Nat Cancer Inst* , **20(2)**: 141-148 .
- **Howell S B, Herbst K, Boss G R, Frei E, 3rd.**Thymidine requirements for the rescue of patients treated with high-dose methotrexate. *Cancer Res***1980**; 40(6):1824-9. In *THÈSE De Doctorat .2008*, Facteurs pharmacocinétiques et variabilité de Réponse aux médicaments utilisés dans le traitement des lymphomes ,Toulouse.
- **Ikediobi C O, Badisa V L, Ayuk-Takem L T, Latinwo L M, West J,***Int J Mol Med* ,2004; **14**: 87–92 .
- **Jaunin-Stalder N, Pasche O, Cornuz J, 2009.**Patient avec des tests hépatiques perturbés : que faire ?.*Rev Med Suisse* ,**5** :2410-2414.
- **Jolivet J, Faucher F, Pinard M F, Dionne P, Bertrand R, 1987.** Biochimie Des antinéoplasiques : le modèle du méthotrexate. *m/s*, **3** : 223-8.
- **Kashif S M, Zaidi R, Naheed B ,2004.** Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta* ,**340**: 229-233.
- **Kartal M, Kaya S, Kurucu S, 2002.** CG-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z. Naturforsch.* **57**:905-909.
- **Kanti B P, Syed I R, 2009.** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2(5)**:270-278.
- **Kebsa W, Rouibah H, Lahouel M, 2014.** Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pak. J. Pharm. Sci* ,**27(6)** :1891-1897.
- **Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M ,Swierczek-Zieba G,2013.** Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, **(1)**:78-101.

- **Laharie D, Terrebonne E, Vergniol J, Chanteloup E, Chabrun E, Couzigou P, de Lédighen V, 2008.** The liver and methotrexate. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, **32** : 134-142.
- **Lahouel M, Boutabet K, Kebsa W, Alyane M.2010.** Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin-induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* ,**4(10)** : 712-720 .
- **Lebrun-Vignes B, Bachelez H, Chosidow O.** Le methotrexate en dermatologie : pharmacologie, indications, utilisation et précautions d'emploi. *RevMed Interne***1999** ; 20 Suppl**3** :384-92.In *THESE DE DOCTORAT EN MEDECINE, 2014*, Psoriasis et Méthotrexate :Efficacité, Tolérance et Place thérapeutique(A propos de 40 cas).
- **Lemaire .L, Malet- Martino, M.C, DeForni, Martino R. Lassere. B ,1992.** Cardiotoxicity of commercial 5- fluorouracil vials stems from the alkaline Hydrolysis of this drug *Br .J .Cancer* ,**66 (1)**: 119-127.
- **Li S , Tan H Y, Wang N, Zhang Z J, Lao L, Wong C W , Feng Y ,2015.** The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci*, **16** : 26087–26124.
- **Liu C F, Lin C H, Lin C C, Lin Y H, Chen C F, Lin C K, Lin S C,2004.** Antioxidant natural products protect against Econazole-induced liver injuries. *Toxicology*,**196**: 87-93.
- **Lugasi A, Hovari J, Katalin V S, Biro L, 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* ,**47(14)**:119-125.
- **Madiha A A H, AbdEllah F, Ebtesam M M G, 2012.** The Possible Ameliorative Effect of Propolis in Rat's Liver Treated with Monosodium Glutamate (MSG). *Nature and Science*, **10(12)**.
- **Malik R., Selden C., Hodgson H.** The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin. Cell Develop Biol.* 13:425-431, **2002**. In Thèse de Doctorat.**2004**, Evaluation de la cinétique de régénération hépatique et de l'efficacité de transplantation d'hépatocytes dans différents modèles murins d'insuffisance hépatique, Strasbourg.
- **Massau C ,2012.** Polyphénols : des alliés pour la santé. *abeilles &c<sup>ie</sup>*, **149** :4.
- **McGuire J J, Russell C A, Balinska M.** Human cytosolic and mitochondrial polyglutamate synthetase are electrophoretically distinct. Expression in antifolate sensitive and -resistant human cell lines. *J Biol Chem***2000**; 275(17):13012-6 In *THÈSE De Doctorat .2008*, Facteurs pharmacocinétiques et variabilité de Réponse aux médicaments utilisés dans le traitement des lymphomes , Toulouse.
- **Moghadam A R, Tutunchi S, Namvaran-Abbas-Abad A, Yazdi M , Bonyadi F , Mohajeri D, Mazani M , Marzban H, J. Łos M , Ghavami S 2015.** Pre-administration of turmeric

- prevents methotrexate-induced liver toxicity and oxidative stress. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **15**:246.
- **Murphy K M, Travers P and Walport M** - Janeway's Immunobiology– **2008** – Seventh Edition. In THESE de (Médecine – Pharmacie), **2010**, ETUDE DE LA TOLERANCE DU METHOTREXATE CHEZ LE CHIEN SAIN, LYON.
  - **Murtala B A, Wan Z A, Siti A S, Boon S A, 2014**. Polyphenols as Key Players for the Antileukaemic Effects of Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **11**.
  - **Nadine M W T , Rosmarie V , Georgios N B , Thomas T , Thomas A , Patrick R S ,2014**. The in Vitro Antimicrobial Efficacy of Propolis against Four Oral Pathogens: A Review. *Dent. J*, **2** : 85-97.
  - **Nirala SK, Bhadauria M ,2008**. Propolis reverses acetaminophen induced acute hepatorenal alterations: a biochemical and histopathological approach. *Arch. Pharm. Res*, **31**: 451-461.
  - **Nurby R, Carlos Y, Luis R, Flor M, Alfredo U, Patricia V,2014**. Chemical composition of essential oil of *Apis mellifera* propolis from Falcón État, Venezuela. *J. Food Agric*, **26 (7)**: 639-642.
  - **Oliveira A P , França H S ,Kuster R M ,Teixeira L A ,Rocha L M, 2010**. Composition and antibacterial activity of Brazilian propolis essential oil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop*, **16** :1.
  - **Ozer J., Ratner M., Shaw M. et Al.** The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. **2008** Mar 20;245(3):194-205. In THESE DE MEDECINE. **2011**, TOXICITE HEPATIQUE DU PARACETAMOL A DOSE THERAPEUTIQUE : REVUE DE LITTERATURE ET PROPOSITION D'UN PROTOCOLE D'EVALUATION EN PERIODE POSTOPERATOIRE.
  - **Patricia I O, Alejandra G E, Sandra V V, Carl LK, Sarg F,2005** .Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clinical and Developmental Immunology*; **12**: 19–25.
  - **Puntarulo S, Stoyanovsky DA, and Cederham AI ,1999**. Interaction of 1-hydroxymethyl radical with antioxidant enzymes. *Arch Biochem Biophys*, **372**: 355-359.
  - **Pariente A .2013**. Cytolyse hépatique (augmentation des aminotransférases) chez l'adulte. *HEPATO-GASTRO et Oncologie digestive*, **20** :8
  - **Philips J .Sherratt and John D.Hayes, 2001**. 9Glutathione S-transferase. Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. Edition Costas Ioannides.

- **Poupon R, Chignard N et al.** La fonction biliaire et sa régulation. MEDECINE/SCIENCES **2004** ; 20 :1096-9. In THESE de Doctorat en Pharmacie.**2009**, l'hepatotoxicite des anti-inflammatoires non steroïdiens, RABAT.
  - **Rice-Evan C A, Miller N J, Pagnana G,1996.**Structure-antioxydant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* ,**20** : 933-56.
  - **Reutenauera S, Chauveaub D, Récher C, 2009.**High-dose methotrexate Toxicity, management and prevention.*Réanimation*, **18**:654-658.
  - **Rosenbaum J, Mallat A, Mavier P .1994 .** La fibrose hépatique, une « itopathie » ? *.médecine/sciences*, **10**:1245-52.
  - **Santos A C, Uyemura S A, Lopes J L C, Bazon J N, Mingatto F E, Curti C,1998.**Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Rad Biol Med*, **24**: 1455-1461.
  - **Sawadogo A, Dib N, Calès P.2007.**Pathophysiology of cirrhosis and its complications. *Réanimation*, **16**: 557-562.
  - **Sergio, A. R., and Russel, R. M, 1999.** B-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, **18**:426–33.
  - **Schuppan D, Afdhal N H.2008.** Liver Cirrhosis. *Lancet*, 371(**9615**): 838–851.
- Shaffer E A et Myers R P.** Métabolismes hépatiques.EMC, Hépatologie, 7-005-B-10, **1999**,12P. In THESE de Doctorat en Pharmacie.**2009**, l'hepatotoxicite des anti-inflammatoires non steroïdiens, RABAT.
- **Shapiro W R, Young D F, Mehta B M.** Methotrexate: distribution in cerebrospinal fluid after intravenous, ventricular and lumbar injections. *N Engl J Med* **1975**; **293**(4):161-6. In *THÈSE De Doctorat* .**2008**, Facteurs pharmacocinétiques et variabilité de Réponse aux médicaments utilisés dans le traitement des lymphomes , Toulouse.
  - **Spahr L, Morard I, Restellini A, Hadengue A, 2003.**La fibrose hépatique : tests non invasifs. *Rev Med Suisse*, **2422**.
  - **Stoyanovsky DA, Wu D, Cederbaum AI ,1998.** Interaction of 1-hydroxymethyl radical with glutathione, ascorbic acid and alpha tocopherol. *Free Radiv Biol Med* ,**24**: 132-138.
  - **Tag H M.2015.**Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **15**:252.

- **Tian H, Cronstein B N, 2007.** Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU HospJt Dis*, **65 (3)**:168-73.
- **Tunali-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G, 2010.** Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *J Pharm PharmaceutSci.*, **13(2)**:303–10.
- **Vardi N, Parlakpinnar H , Cetin A, Erdogan A, Ozturk I C . 2010.** Protective Effect of  $-\beta$  Carotene on Methotrexate –Induced Oxidative Liver Damage. *Toxicologic Pathology*, **38**: 592-597.
- **Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Houcine S, Tsetkova I, Kujemgiev A, 2000.** Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z. Naturforsch*, **55(9-10)**: 790-803.
- **Viala A, Botta A. 2007.** Toxicologie. 2<sup>ème</sup> édition. Ed: Lavoisier, p.03-10,20-21. In Thèse de Doctorat en Sciences .**2014**,*PistacialentiscusL.*:Evaluationpharmacotoxicologique,CONSTANTINE.
- **Von Moos S, Müllhaupt B .2015.** Cirrhose hépatique: potentiel de progression et régression. *SWISS MEDICAL FORUM – FORUM MÉDICAL SUISSE* ,**15(5)**:100-105.
- **Vuppalanchi R , Juluri R , Bell L N, Ghabril M , Kamendulis L, Klaunig J E, Saxena R , Agarwal D, Johnson M S , Chalasani N.2011.** Oxidative Stress in Chronic Liver Disease Relationship Between Pheripheral and Hepatic Measurements.*AM J Med Sc* , **342 (4)**: 314-317.
- **Waltham M C, Holland J W, Robinson S C, Winzor D J, Nixon P F.** Direct Experimental evidence for competitive inhibition of dihydrofolatereductase by methotrexate. *BiochemPharmacol***1988**; **37(3)**:535-9. In *THÈSE De Doctorat .2008*, Facteurs pharmacocinétiques et variabilité de Réponse aux médicaments utilisés dans le traitement des lymphomes, Toulouse.
- **Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Woo S O, Kwon H W, Perumalsamy H, Ahn Y J, 2016.** Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complementary and AlternativeMedicine*, **16**:65 .
- **Wolfrom C, Hepp R, Hartmann R, Breithaupt H, Henze G.** Pharmacokinetic study of methotrexate, folinic acid and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. *Eur J Clin Pharmacol***1990**; **39(4)**:377-83. In *THÈSE De Doctorat .2008*, Facteurs pharmacocinétiques et variabilité de Réponse aux médicaments utilisés dans le traitement des lymphomes , Toulouse.
- **Yang Z C, Wang H F,ZuoT C,Guan L L,Dai N,2016.** Salidroside alleviates oxidative stress in the liver with non- alcoholic steatohepatitis in rats.*BMC Pharmacology and Toxicology*, **17**:16.

# ***Annexes***

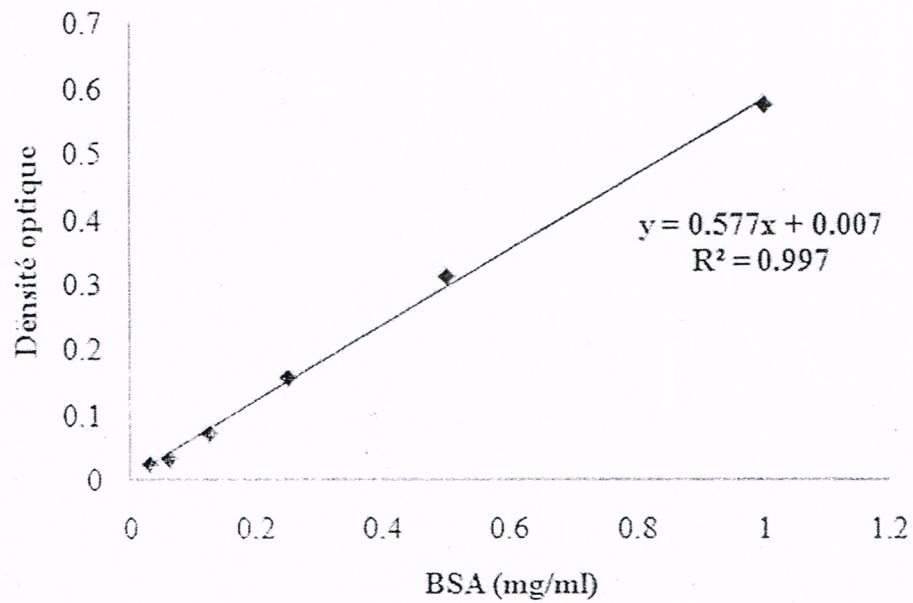
Annexe 1

Figure 1 : Courbe étalon du dosage des protéines (BSA comme standard), (Moyenne de trois essais)

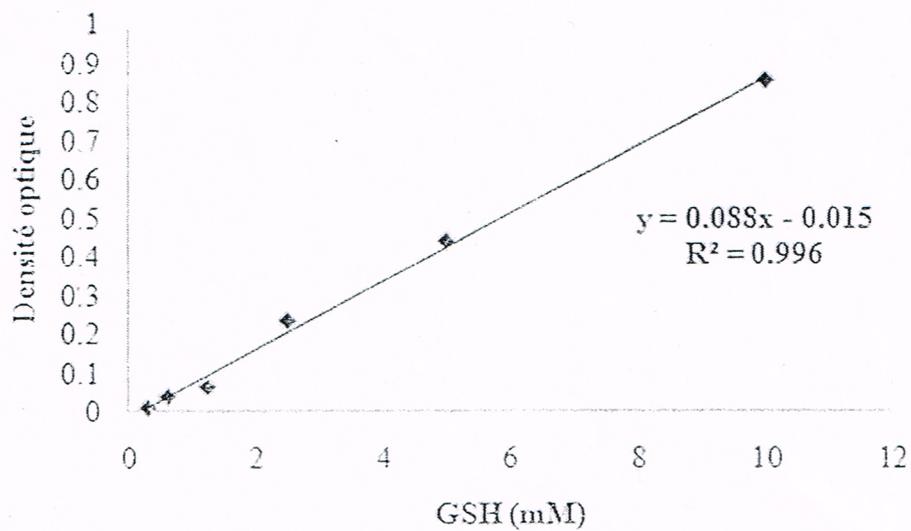
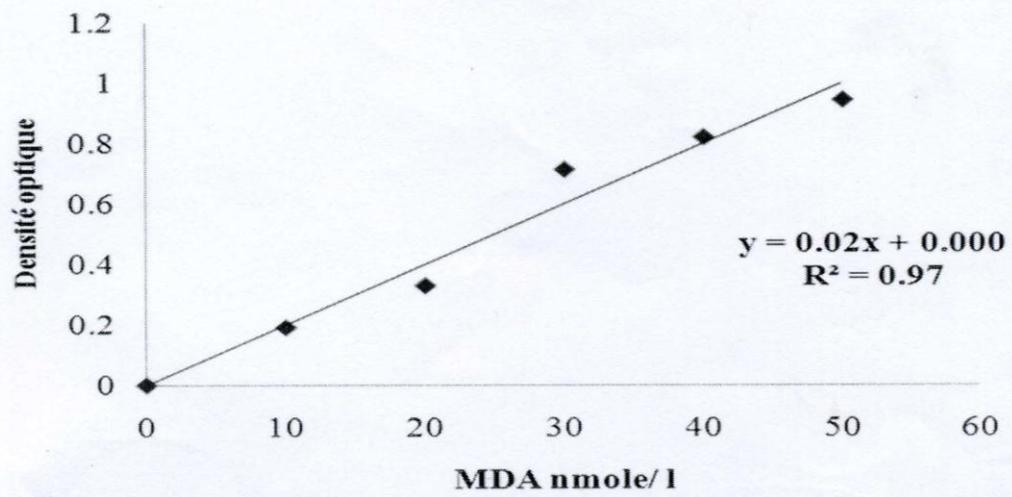
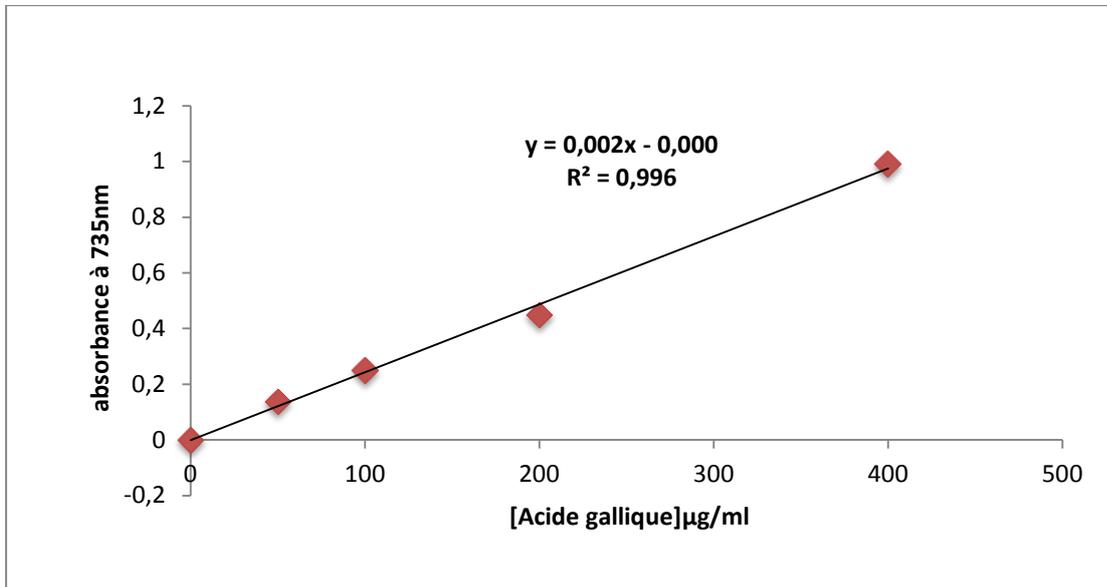


Figure 2 : Courbe étalon du GSH avec le réactif DTNB, (Moyenne de trois essais)

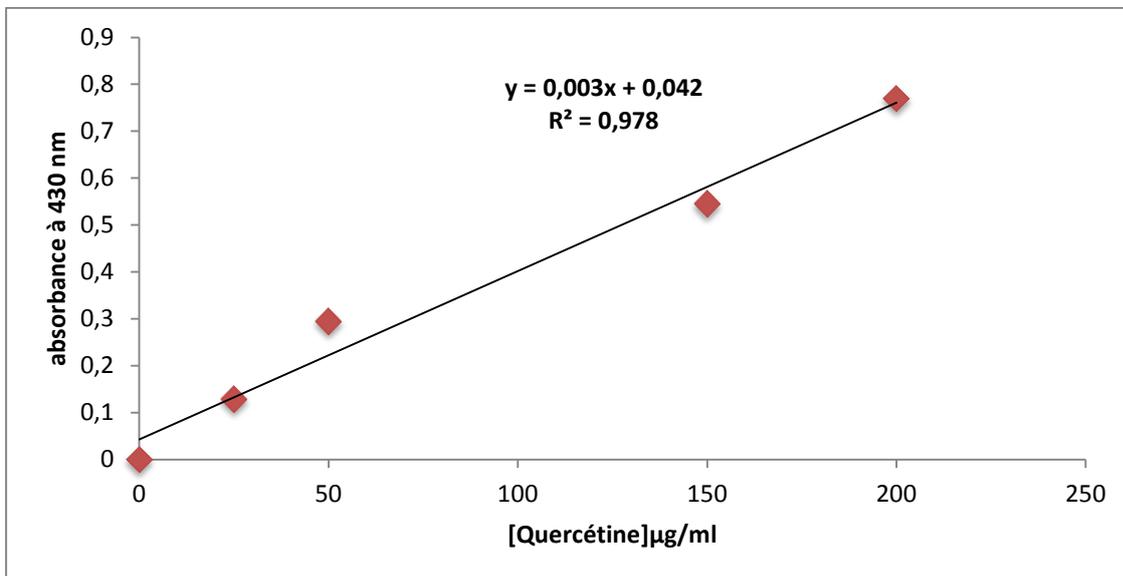


**Figure 3 : Courbe étalon du MDA (TEP comme standard), (Moyenne de trois essais)**

## ANNEXE 2



**Figures 1 :** Courbe étalon du dosage des polyphénols (l'acide gallique comme standard).



**Figures 2 :** Courbe étalon du dosage des flavonoïdes (quercétine comme standard).

## Etude de l'effet de la propolis sur la toxicité hépatique et cardiaque du méthotrexate

### Présenté par :

HAMMOUDI Ilheme

KHEN Nour elhouda

LOUZRI Wassila

Soutenue le :02/07/2016

Encadreur :M<sup>eme</sup>. ROUIBAH Hassiba

**Résumé :** le méthotrexate (MTX) est l'un des agents cytotoxiques largement utilisé dans le traitement de plusieurs maladies tel que le cancers. La présente étude porte sur l'évaluation de l'effet de la propolis sur l'hépatotoxicité et la cardiotoxicité induite par le méthotrexate chez les rats wistar albinos. Le groupe témoin reçoit l'eau distillée (1ml /j pendant 15 js), le groupe de MTX reçoit 1 ml du MTX (20 mg /kg par voie orale doses répétés ), le groupe MTX + l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) reçoit 1 ml de l'EEP (100 mg /kg) , 7 js avant l'administration du MTX , le groupe MTX+ quercétine reçoit 1 ml de la quercétine (10 mg/kg) 7js avant le traitement par le MTX. Les résultats montrent que l'administration du méthotrexate seul se manifeste par une élévation du taux des enzymes sériques (ASAT, ALAT, LDH, PAL, CPK, bilirubine), et une diminution du taux des protéines totales, une production marquée du malondialdéhyde, une déplétion du contenu de glutathion , et une inhibition des activités enzymatiques de la catalase et de la glutathion -S-tansférase. Cette altération est due à un stress oxydant développé au sein du tissu hépatique et cardiaque. Un prétraitement des rats par l'extrait éthanolique de la propolis et la quercétine réduit considérablement les dommages peroxydatifs dans les tissus hépatiques et cardiaques , augmente l'activité enzymatique de la catalase et de la glutathion -S-transférase. Ces résultats confirment le pouvoir anti-radicalaire de la propolis et sa capacité à piéger les ROS et stimulée la synthèse des agents antioxydants.

**Mots clés :** Méthotrexate, Stress Oxydatif, Propolis, hépatotoxicité, cardiotoxicité.

**Abstract:** the methotrexate one of the cytotoxic agents is largely used in the treatment of several diseases such as cancers. The present study relates to the evaluation of the effect of the propolis on the hepatotoxicity and the cardiotoxicity induced by the méthotrexate at the albino wistar rats. The reference group receives water distilled (1ml /j during 15 days), the group of MTX receives 1 ml of the MTX (20 Mg /kg by oral way amounts repeated), the group MTX + EEP receives 1 ml of the EEP (100 Mg /kg), 7 days before the administration of the MTX, group MTX+ quercetin receives 1 ml of quercetin (10 mg/kg) 7days before the treatment by the MTX. The results show that the administration of the methotrexate only appears by a rise in the rate of the serum enzymes(ASAT, ALAT, LDH, PAL, CPK, bilirubine), and a reduction in the rate of total proteins, a marked production of malondialdéhyde, a déplétion of the contents of glutathion, inhibition of the enzymatic activities of the catalase and glutathion - S-tansférase. This deterioration is due to a stress oxidizing developed within hepatic and cardiac fabric. A pretreatment of the rats by the extract ethanolic of the propolis and quercetin reduces considerably the damage peroxydatifs in fabrics hepatic and cardiac, the enzymatic activity of the catalase and glutathion increases - S-transférase. These results confirms the capacity anti-ridicalizing of the propolis and its capacity to trap the ROS and stimulated the synthesis of the antioxydant agents.

**Key words:** Methotrexate, Oxydative Stress, Propolis, hepatotoxicity, cardiotoxicity.

**ملخص:**الميثوثريكسات هو واحد من العوامل السامة الأكثر نشاطا في علاج عدة امراض من بينها مرض السرطان، هذه الدراسة تركز على تقييم تأثير الدنج على السمية الكبدية والقلبية التي يسببها الميثو ثريكسات على جردان وستر ألبينوس المجموعة الشاهدة، تلقت 1 مل من الماء المقطر لمدة 15 يوما، المجموعة المعالجة بالميثوثريكسات تلقت 1 مل من الميثوثريكسات لوحده (20 مغ/كغ) عن طريق الفم لمدة 7 ايام ، المجموعة المعالجة بالميثوثريكسات مع الدنج تلقت 1 مل من الدنج (100مغ / كغ ) لمدة 7 ايام، المجموعة المعالجة بالكرستين تلقت 1 مل من الكرستين (10 مغ/كغ). أظهرت النتائج بأن تقديم جرعات متكررة من الميثو ثريكسات تميزت بارتفاع معتبر في كمية المعايير البيوكيميائية (ASAT, ALAT, LDH, PAL, CPK, bilirubine) وانخفاض في كمية البروتينات الإجمالية، كما لوحظ ارتفاع في نسبة Malondialdéhyde، نقصان في كمية الGSH، تراجع النشاط الإنزيمي لل Glutathion-S- transférase، Catalase. هذا التدهور راجع إلى الإجهاد التأكسدي المتطور داخل الأنسجة الكبدية والقلبية. المعالجة المسبقة للجردان بالدنج و الكرستين ، أحدثت تراجع ملحوظ في نسبة التلف على مستوى النسيج الكبدى والقلبي وارتفاع النشاط الإنزيمي لل Glutathion-S- transférase، Catalase، هذه النتائج تؤكد النشاط المضاد للجدور للدنج وقدرته على تطبيب الجدور الحرة للاكسجين و تحفيز العوامل المضادة للاكسدة.

**الكلمات المفتاحية:**المثوثريكسات، الإجهاد التأكسدي، الدنج، السمية الكبدية، السمية القلبية.