

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère d'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى- جيجل

Université de Mohammed Seddik BenYahia-Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلية

Mémoire de fin d'études

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

Option : Pharmacologie Expérimentale

Thème

**Effet protecteur de la propolis contre la
néphrotoxicité, l'hépatotoxicité et la cardiotoxicité
induite par le cisplatine chez le rat *wistar***

Membres de jury :

Présidente: Dr Lamia BENGADOUER

Examinatrice : M^{me} Asma CHERBAL

Encadreur : M^{me} Hassiba ROUIBEH

Présenté par :

LAHOUES Asma

MAKHLOUF Walida

BELHADI Amina

Année Universitaire 2015-2016.

Remerciements

Que notre remerciement, dédicaces, et l'expression à notre profonde reconnaissance soient adressés :

A nos regrettes et chères mères et pères en témoignage de notre affection, notre gratitude et notre admiration pour leurs indescriptibles sacrifices, leurs dévouements, et leur proche surveillance a notre égard qui ne quitteront jamais nos mémoires.

A eux, qui nous aider, qui ont partagé nos bonheurs et nos soucis, pour leur apport moral, leur conseils, leur éducation, leurs encouragements, leurs veillées, pour que nous serons ce que nous sommes aujourd'hui.

Que cet instant trop longtemps retard soit une récompense oh ! Combien maigre pour toutes leurs peines et leurs abnégations.

A notre encadrant M^{me} ROUIBEH Hassiba, d'avoir dirigé cet humble travail, et nous avait permis d'apprécier l'esprit d'équipe.

A Dr Lamia BENGADOUER, et M^{me} Asma CHERBAL que nous les remercions d'avoir accepté d'être les membres du jury et pour le temps et l'énergie qu'ils ont dédiés à la lecture et la correction de notre manuscrit.

A tous les enseignants de département de la biologie moléculaire et cellulaire, nous exprimons notre gratitude et notre respect à leur égard, nous 'en garde un souvenir vivace et reconnaissant pour la nature de leurs conseils et pour tous ce qu'ils nous ont transmis.

A nous oncles, nos tentes, nos frères et nos sœurs, que ceci soit le gage pour eux de notre estime.

A nos collègues et ceux qui font partie de notre promotion avec lesquels nous avons passé des agréables études.

Merci...

Sommaire

Sommaire

Liste des figures	i
Liste des Tableaux.....	ii
Liste des abréviations	iii
Liste des annexes.....	iv
Introduction	01
Chapitre 01 : Généralités sur le cisplatine	
I. Découverte de l'activité antitumorale du cisplatine.....	03
I.1. Description de cisplatine.....	03
I.1.1. Définition	03
I.1.2. Propriété physicochimique.....	03
I.1.3. Forme galénique	04
I.1.4. pharmacocinétique	04
II. l'activité du cisplatine.....	04
II.1. Mécanisme d'action.....	04
II.1.1. L'ADN nucléaire	04
II.1.2. L'ADN mitochondriale	06
II.2. Mécanisme de résistance	06
II.2.1. Le glutathion et la chimiorésistance	07
II.2.2. Capacité des cellules cancéreuse a la réparation de L'ADN	07
III. L'Indication et l'effet secondaire de cisplatine pour le traitement du cancer	07
III.1.L' Indication thérapeutique	07
III.1.1. Cisplatine et le cancer du poumon	07
III.1.2. Cisplatine et cancer de l'ovaire	07
III.1.3. Cisplatine et cancer du sein	07
III.1.4. Cisplatine et cancer du cerveau	08
III.2. L'effet secondaire de cisplatine.....	08
III.2.1. Hépatotoxicité	08
III.2.2. Cardiotoxicité	08
III.2.3. Néphrotoxicité.....	08

III.2.4. Autre organes	09
------------------------------	----

Chapitre 02 : La néphrotoxicité du cisplatine

I. Le rein	11
I.1. Anatomie	11
I.2. La physiologie.....	12
I.3. La pathophysiologie.....	12
II. Mécanisme de la néphrotoxicité induit par le cisplatine	13
II.1. Captage de cisplatine par les cellules rénales	13
II.2. Le transport de cisplatine dans les cellules des reins	13
II.3. La biotransformation du cisplatine dans le rein	13
II.4. Lésion tubulaire proximale	14
II.5. L'inflammation	15
II.6. Rôle de stress oxydatif dans la néphrotoxicité par le cisplatine	16
II.7. Hémodynamique rénal et de lésion vasculaire	16
III. L'évaluation de la néphrotoxicité.....	17
IV. Stratégies de néphroprotection.....	18

Chapitre 03 : Généralités sur la propolis

I. La propolis	21
I.1. Définition	21
I.2. L'origine	21
I.3. Composition chimique	21
II. Les polyphénols.....	22
II.1. Définition	22
II.2. Classification des polyphénols	22
II.2.1. Les acides phénols	23
II.2.2. Les flavonoïdes.....	23
II.2.3. Les tannins	23
II.3. Biodisponibilités.....	23
III. La propolis comme une source des polyphénols.....	24
III.1. La propolis Algérienne.....	24

III.2. Propriétés pharmacologiques et biologiques	24
III.2.1. Propriétés antioxydantes	25
III.2.2. Propriétés antitumorales	25
III.3. L'effet protecteur de la propolis	26
Chapitre 04 : La partie expérimentale	
Partie .01. Matériel et méthodes	
I. Etude phytochimique	28
I.1. La récolte de la propolis.....	28
I.2. L'extraction éthanoliques de la propolis.....	28
I.3. Dosage des polyphénols totaux	28
I.4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	29
I.5. Etude du pouvoir anti radicalaire par le test au DPPH°	29
II. Etude <i>in vivo</i> de l'effet antioxydant de la propolis	30
II.1. Animaux et conditions d'hébergement	30
II.2. Traitement.....	31
II.3. Prélèvement du sang, sacrifice des animaux et prélèvement des organes (reins, cœur et foie)	31
II.4. Dosages des paramètres biochimique.....	31
II.5. Dosages tissulaires.....	32
II.5.1. Préparation de la fraction cytosolique	32
II.5.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	32
II.5.3. Dosage du glutathion (GSH)	32
II.5.4. Evaluation de l'activité enzymatique de catalase (CAT)	33
II.5.5. Evaluation de l'activité de la glutathion -S -transférase cytosolique (GST)	33
II.5.6. Dosage des protéines	34
III. Traitement des résultats.....	34
Partie .02. Résultats et Discussion	
I. Etude phytochimique	36
I.1. Rendement d'extraction	36
I.2. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes	36
I.3. Etude du pouvoir anti radicalaire par le test au DPPH°	37

II. Etude <i>in vivo</i> de l'effet antioxydant de la propolis	39
II.1. Dosages des paramètres biochimique	39
II.1.1. Dosage des paramètres biochimiques au niveau rénal, hépatique et cardiaque.....	39
II.2. Dosages tissulaires.....	42
II.2.1. Dosage des paramètres de stress dans le tissu rénal	42
II.2.1.1. Evaluation du taux de peroxydation lipidique MDA.....	42
II.2.1.2. Evaluation du GSH cytosolique	43
II.2.1.3. L'évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes	45
II.2.1.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique.....	45
II.2.1.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT	45
II.2.2. Dosage des paramètres de stress dans le tissu hépatique.....	47
II.2.2.1. Evaluation du taux de peroxydation lipidique MDA.....	47
II.2.2.2. Evaluation du GSH cytosolique	48
II.2.2.3. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes	49
II.2.2.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique.....	49
II.2.2.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT.....	50
II.2.3. Dosage des paramètres de stress dans le tissu cardiaque.....	52
II.2.3.1. Evaluation du taux de peroxydation lipidique MDA.....	52
II.2.3.2. Evaluation du GSH cytosolique	52
II.2.3.3. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes	53
II.2.3.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique.....	53
II.2.3.4.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT.....	54
Conclusion.....	58
Références bibliographiques	60

Annexes

Liste des figures

Figure 01 : La formule du CDDP.....	03
Figure 02 :L'entrée de CDDP et la représentation topologique de la protéine CTR1	05
Figure 03 : Modes de fixation du CDDP sur l'ADN: bifonctionnelle inter brin, bifonctionnelle intra brin, monofonctionnel.....	05
Figure 04 :L'intégration de CDDP avec la métallothionéine / GSH	06
Figure 05 : La morphologie rénale	12
Figure 06 : La mort cellulaire des cellules épithéliales induit par le CDDP.....	15
Figure 07 : Les mécanismes immunitaires de la néphrotoxicité du CDDP	15
Figure 08 : Mécanismes hypothétiques de la néphrotoxicité du CDDP	16
Figure 09 : Les différentes classes des composés phénoliques.....	23
Figure 10 : Réduction du DPPH° par un antioxydant.....	30
Figure 11 :Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'EEP de et de la quercétine à différentes concentrations vis-à-vis le radical libre DPPH°	38
Figure 12 :Variations des concentrations en MDA dans le tissu rénal	42
Figure 13 :Variation de taux de GSH dans le tissu rénal	44
Figure 14 :Variation de l'activité de la GST dans le tissu rénal	45
Figure 15 :Variation de l'activité de la CAT dans le tissu rénal.....	46
Figure 16 :Variations des concentrations tissulaires en MDA dans le tissu hépatique.....	47
Figure 17 :Variation des taux de GSH dans le tissu hépatique	48
Figure 18 :Variation de l'activité de GST dans le tissu hépatique	50
Figure 19 :Variation de l'activité de CAT dans le tissu hépatique	51
Figure 20 :Variations des concentrations tissulaires en MDA dans le tissu cardiaque.....	52
Figure 21 :Variation de taux de GSH dans le tissu cardiaque.....	53
Figure 22 :Variation de l'activité de GST dans le tissu cardiaque	54
Figure 23 :Variation de l'activité de CAT dans le tissu cardiaque	55

Liste des tableaux

<i>Tableau01</i> : Classement des biomarqueurs d'atteintes rénales selon leur type, leur fonction ou leur structure rénale cible (glomérulaire, tubulaire. . .) et leur utilisation expérimentale ou clinique.....	18
<i>Tableau02</i> : Rendement d'extraction de l'EEP de la propolis des deux régions.....	36
<i>Tableau03</i> : Teneur en polyphénols dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent acide gallique /g de propolis.....	36
<i>Tableau04</i> : Teneur en flavonoïdes dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent quercétine /g de propolis.....	37
<i>Tableau05</i> : Variation des taux sériques des biomarqueurs rénal, hépatique et cardiaque.....	39

Liste des abréviations

AIF :	Apoptosis inducing facteur
ARA :	L'atteinte rénale aiguë
BBC :	Bradford
CAT:	Catalase
CDDP :	Cisplatine
CDNB :	Chlorodinitrobenzène
CK(CPK):	La créatine Kinase=La créatinephosphoKinase
CTR1 :	Copper Transport protein 1
DPPH° :	2,2-Diphenylpicrylhydrazyl.
DTNB :	5,5-Dithiobis(2-Nitrobenzoïque) .
EEP :	L'extrait éthanolique de la propolis.
EOR :	Espèces oxygénées radicalaires.
FU :	Fluoro-Uracil
GSH :	Glutathion
GST:	La glutathion - S – transférase cytosolique
HMGB₁:	High-mobility group box 1
IP :	Intrapéritonéale
IRA :	Insuffisance rénale aiguë
IRC :	Insuffisance rénale chronique
LDH:	La lactate déshydrogénase
MDA:	Malondialdéhyde
MRC :	Maladie rénale chronique
NF- κB :	Facteur nucléaire kappa B
OCT2 :	Le transporteur de cation organique OCT2
PAL:	La phosphatase alcaline
ROS :	Reactive Oxygen Species
RPTECs:	Renal proximal tubule epithelial cells= cellules épithéliales du tubule proximal
SCLCs :	Small Cell Lung cancer .
TBA :	ThioBarbiturique Acid
TCA :	L'acide trichloracétique
TGO :	La transaminase glutamique oxaloacétique.
TGP :	La transaminase glutamique pyruvate.
TNB:	L'acide thionitrobenzoïque
TNF-α :	Tumor necrosis factor- α

Liste des annexes

Annexes 1

Figure 01 : Courbe étalon de l'acide gallique (Moyenne de trois essais).

Figure 02 : Courbe étalon de la quercétine (Moyenne de trois essais).

Figure 03 : Courbe étalon du dosage des protéines (BSA comme standard), (moyenne de trois essais).

Figure 04 : Courbe étalon du GSH avec le réactif DTNB, (Moyenne de trois essais).

Figure 05 : Courbe étalon du TEP comme standard, (moyenne de trois essais).

Annexes 2

Tableau 01 :Evaluation de l'activité antiradicalaire des différents de l'EEP de Kaous et quercétine à différentes concentrations vis-à-vis le radical libre DPPH°.

Tableau 02 :Dosage des paramètres du stress oxydant dans le tissu rénal.

Tableau 03 :Dosage des paramètres du stress oxydant dans le tissu hépatique.

Tableau 04 :Dosage des paramètres du stress oxydant dans le tissu cardiaque.

Introduction

Introduction

Le cisplatine est l'un des agents chimiothérapeutiques le plus efficace utilisé dans le traitement d'une variété de tumeurs solides tels que le cancer de l'ovaire et le cancer des testicules. Son efficacité antitumorale est dose-dépendante, mais son utilisation clinique est limitée par le développement de néphropathies et de l'insuffisance rénale aiguë (Miller *et al.*, 2010).

Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les mécanismes de la toxicité induite par le cisplatine. 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. Ces radicaux, en particulier l'anion superoxyde et le radical hydroxyle, jouent le rôle le plus important dans l'induction de l'insuffisance rénale en réduisant le flux sanguin rénal et en augmentant le risque de la peroxydation lipidique (Kandemir *et al.*, 2011; Sarawoot *et al.*, 2013).

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, anticancérigène, hépatoprotecteur, antiviral, spasmolytique, et antioxydant (Liu *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, nous allons trouver intéressant de répondre à la question suivante : Est-ce que le stress oxydant intervient dans la toxicité induite par le cisplatine et quel est le mécanisme protecteur de la propolis contre cette toxicité ?

Cette étude est s'inscrit dont l'objectif vise d'une part, à étudier l'effet néphrotoxique, hépatotoxique et cardiotoxique du cisplatine 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 rénale, hépatique et cardiaque du cisplatine.
- ✓ L'évaluation de l'effet préventif bénéfique de la propolis sur le rein, foie et le cœur.

Chapitre01

Généralités sur le cisplatine

Chapitre 01:Généralités sur le cisplatine

I. Découverte de l'activité antitumorale du cisplatine

En Plus de 100 ans plus tôt, le cisplatine a été synthétisé pour la première fois par Alfred Werner qui a déduit sa structure, en 1965 Rosenberg a publié le premier article de son activité antitumorale en voulant d'étudier l'influence du champ électrique sur le processus de croissance de bactéries *Escherichia Coli*, il a observé un comportement inhabituel : la division cellulaire est stoppée, mais la croissance des cellules a continué. Rosenberg a montré que l'effet inhibiteur n'était pas dû au courant parcourant le milieu de culture, mais à la formation d'un complexe entre le platine libéré par les électrodes et le chlorure d'ammonium contenu dans le milieu, le cisplatine a montré un niveau élevé et un large spectre d'activité antitumorale, cette découverte a ouvert une nouvelle ère dans le traitement du cancer (Desoize, 2002 ; Chen, 2009; Frezza, 2010; Dasari, 2014).

Par conséquent, les recherches approfondies ont développés des espèces de métaux non-platine ayant une activité anticancéreuse de qualité supérieure et de faibles effets secondaires (Olszewski, 2010).

I.1.Description de la molécule

I.1.1. Définition

Le *cis-diamminedichloroplatine* (CDDP) est un complexe constitué par un atome central de platine lié à deux atomes de chlore et à deux radicaux ammoniums en position 6 dans le plan horizontal. Le dérivé *trans*-diamminodichlorocisplatine est inactif comme anticancéreux.

Le cisplatine ne possède pas de radical alkyl, mais ayant l'action d'un agent alkylant utilisé pour la chimiothérapie de certains cancers. Le principal effet secondaire limitant son utilisation clinique est la néphrotoxicité (insuffisance rénale aigue, chronique) (Isnard-Bagnis, 2005).

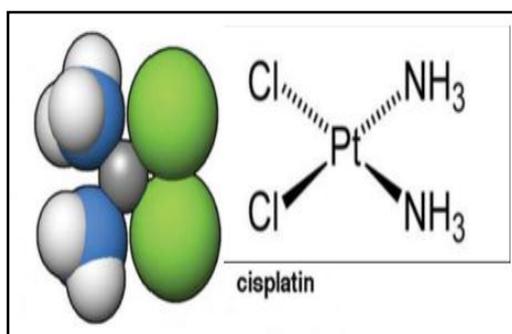


Figure 01 : La formule du CDDP (Dasari, 2014).

I.1.2. Propriété physicochimique

Le cisplatine ou le $[H_6N_2Cl_2Pt]$ est d'une masse molaire de 300mg/mol, il est absorbé dans l'UV-Visible à 300 nm, cependant son absorption atomique est égale à 265,9 nm. Le CDDP est soluble dans le sérum physiologique à une concentration 2mg /ml, ainsi dans le ndiméthylprimanide et le

N Diméthylformamide, mais il est peu soluble dans l'eau, la stabilité de la molécule est préservée dans les conditions normales de température et de pression mais elle peut se transformer lentement au fil du temps à l'isomère trans perd ainsi son activité. L'hydrolyse de la molécule conduit à des composés très réactifs qui se fixent d'une manière irréversible sur les protéines (albumine notamment), peptides, acide nucléique et dérivés du soufre (Tranchand, 1997 ; Dasari, 2014).

I.1.3. Forme galénique

Le CDDP se présente sous forme de poudre cristalline lyophilisée, blanche ou jaune foncé à jaune-orange à température ambiante, la molécule est préparée sous forme injectable contenant le CDDP, le mannitol, et de chlorure de sodium, conditionnée en flacons de 10.25 et 50 mg de cisplatine (Tranchand, 1997 ; Dasari, 2014).

I.1.4. Pharmacocinétique

Après l'injection intraveineuse rapide ($100\text{mg}/\text{m}^2$ de CDDP), le pic de CDDP plasmatique est de l'ordre de $25,6\ \mu\text{M}$ à $51,2\ \mu\text{M}$ (5 à 10 mg/l). La clairance du platine ultrafiltrable varie de 100 à 500ml/min. On peut distinguer deux phases différentes : une phase initiale, de demi-vie courte (environ 30 min correspondant à la pharmacocinétique du platine ultrafiltrable, et une phase terminale de demi-vie longue (3 à 8 jours) correspondant à l'élimination du platine fixé sur les protéines. Certains auteurs décrivent une phase intermédiaire dont la demi-vie varie de 30 min à 10 h, la valeur de pic plasmatique du platine total correspond en injection rapide à celle du platine (Tranchand, 1997 ; Valérian, 2015).

Le CDDP se trouve pratiquement dans tous les tissus (rein, foie, prostate, vessie...) à des concentrations variantes, les concentrations observées dans le liquide céphalo-rachidien et les érythrocytes semblent d'importance négligeable (3 % du platine administré).

La voie rénale est la voie principale d'élimination. Seul le CDDP ultrafiltrable ou fixé à des molécules de faible masse moléculaire est éliminé dans les urines par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. Cette élimination en partie due à des mécanismes actifs, à lieu durant les premières heures après l'administration (Tranchand, 1997; Thomas, 2007; Valérian, 2015).

II. L'activité du cisplatine

II.1.Mécanisme de cisplatine

II.1.1.L'ADN nucléaire

De nombreuses études ont montré que le CDDP reste dans son état neutre tant qu'il circule dans les voies sanguines, la concentration forte en ions chlorure (100 mM) empêche son hydrolyse. Le CDDP entre dans la cellule soit par diffusion passive ou par le CTR1 : c'est le transporteur membranaire de cuivre (protéine a 3 domaines transmembranaires dont la partie N terminale extracellulaire est caractérisée par de nombreux résidus méthionine M), les cellules qui l'expriment

beaucoup présentent dans la plupart des cas une sensibilité accrue au CDDP . À travers la membrane, la diminution de la concentration en ions chlorures facilite l’hydrolyse et le CDDP est activé une fois qu’il pénètre dans la cellule par déplacement des atomes de chlore par des molécules d'eau. Ce produit hydrolysé est un puissant agent électrophile capable de réagir avec un nucléophile y compris les groupes sulfhydriles sur les protéines et les atomes donneurs d'azote sur les acides nucléiques. Les cibles principales sont les atomes d’azote des bases purines et pyrimidines de l’ADN, c’est à dire les atomes N7 et N1 de l’adénine, N3 de la cystéine et N7 de la guanine (Linnet *al.*, 2002 ;Holzer *et al.*, 2006 ; Dasari, 2014 ;Monica , 2014) .

L'ADN est une cible essentielle pour la cytotoxicité du CDDP, ce dernier se lie de manière covalente à l'ADN à une région sensible du génome, le gène BOX1 qui code pour la protéine HMGB1, en formant des adduits bifonctionnels intrabrin et inter brin et monofonctionnels qui vont provoquer des distorsions dans l'ADN et peuvent entraver les processus cellulaires tels que la transcription, la réplication et qui nécessitent la séparation de l'ADN à brin à différents degrés. Ceci active différentes voies de transduction du signal ; par exemple, arrêt prolongé du cycle cellulaire en phase G1, S ou G2-M et la mort cellulaire programmée (l’apoptose) (Kelland, 2007 ; Florea, 2011).

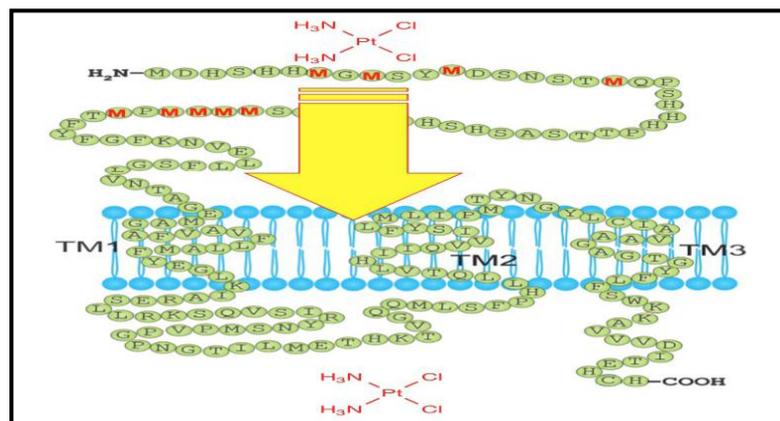


Figure 02 : L’entrée de CDDP et la représentation topologique de la protéine CTR1 (DU X. *et al.*, 2012).

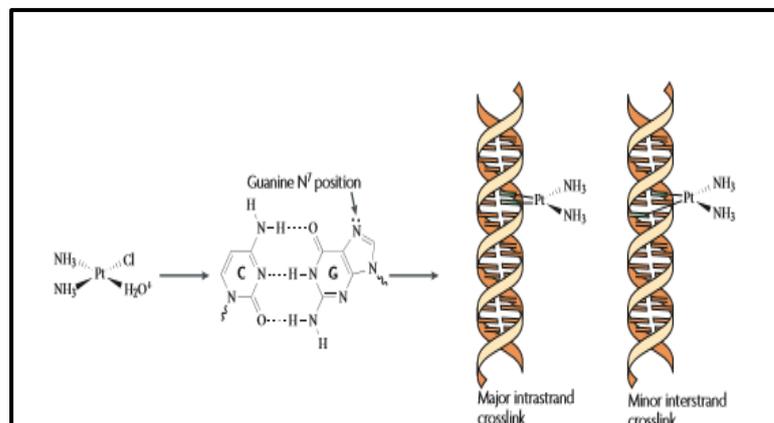


Figure 03 : Modes de fixation du CDDP sur l’ADN : bifonctionnelle inter brin, bifonctionnelle intra brin, monofonctionnel (Kelland, 2007).

II.1.2. L'ADN mitochondrial

La plus part des dommages à l'ADN nucléaire est la cause de la mort cellulaire induite par le CDDP. En fait, seule une petite quantité de platine cellulaire (<1%) est liée à l'ADN. En outre, Cullen et al.(2007), ont utilisé des cellules énuclées pour démontrer que la signalisation apoptotique induite par le CDDP se produit indépendamment des dommages à l'ADN nucléaire. Plusieurs preuves suggèrent que l'ADN mitochondrial, ou d'autres cibles mitochondriales, sont peut-être plus importants que les dommages de l'ADN nucléaire dans la médiation de la mort cellulaire induite par le CDDP. Le CDDP est hydrolysé pour produire un métabolite chargé positivement qui s'accumule préférentiellement dans les mitochondries chargés négativement.

Enfin, l'ADN mitochondrial peut être plus sensible que l'ADN nucléaire des dommages induits par le CDDP en raison de mécanismes de réparation d'ADN moins efficaces (Olivero *et al.*, 1997).

II.2. Mécanisme de résistance

La chimiorésistance peut se définir comme la capacité des cellules cancéreuses à survivre à l'exposition d'agents cytotoxiques. Elle constitue la première cause d'inefficacité de la chimiothérapie. Elle se manifeste soit d'emblée, on l'appelle alors chimiorésistance innée (c'est le cas pour les cancers du rein), soit progressivement au cours du traitement, auquel cas elle sera dite acquise (cas des leucémies, cancer du sein, etc. Le CDDP pénètre dans les cellules et ses ligands chlorures sont remplacés par de l'eau formant des espèces hydrolysés qui réagissent avec les sites nucléophiles, il peut également interagir avec d'autres macromolécules contenant du soufre, par exemple la métallothionéine / glutathion(GSH), qui séquestrent le CDDP et le retirer hors de la cellule manifestant donc à une résistance au médicament (Florea, 2011).

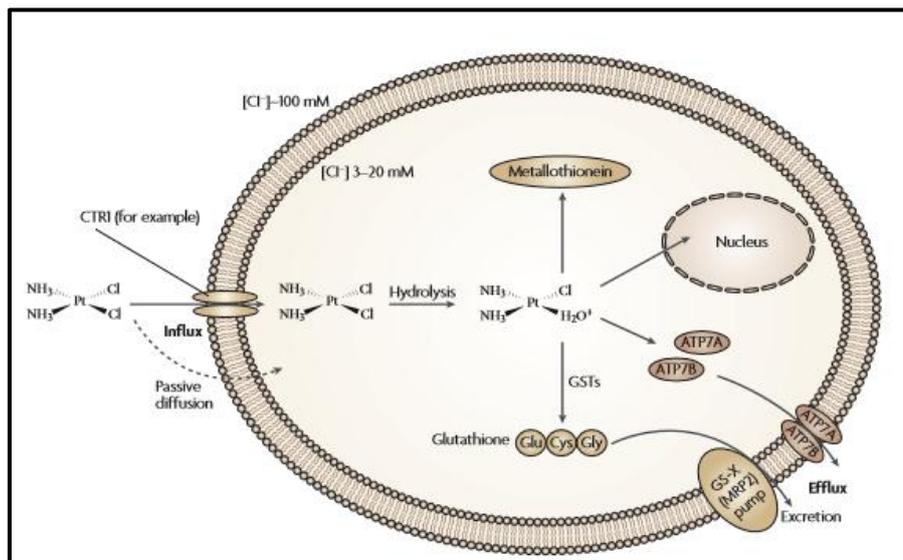


Figure 04 : L'intégration de CDDP avec la métallothionéine / glutathion (Kelland, 2007).

II.2.1. Le glutathion et la chimiorésistance

Le glutathion (GSH) est impliqué dans la désintoxication. Il est également essentiel pour le maintien de la structure normale des globules rouges (Florea, 2011).

Le stress créé par la tumeur augmente la capacité de la cellule à produire du glutathion en présence de CDDP, le GSH protège la cellule cancéreuse en interceptant les métabolites réactifs du CDDP avant qu'ils ne puissent réagir avec l'ADN et forment des complexes qui seront éliminés de la cellule, il protège aussi la cellule en favorisant la réparation de l'ADN, probablement en stabilisant les enzymes nécessaires ou en favorisant la formation de désoxyribonucléotides (Florea, 2011).

Les niveaux de GSH sont augmentés dans certaines cellules chimiorésistantes, mais pas toutes les cellules résistantes au CDDP, ce qui suggère qu'il existe d'autres mécanismes de résistance cellulaire (Florea, 2011).

II.2.2. Capacité des cellules cancéreuses à la réparation de l'ADN

Les cellules cancéreuses peuvent devenir résistantes au CDDP par leurs capacités à éliminer les produits d'addition de CDDP à l'ADN et à réparer les lésions induites par CDDP dans l'ADN. Ces capacités peuvent résulter de la présence de certaines protéines de réparation d'ADN (par exemple le produit du gène XRCC1, YB1, etc.). Ceci suggère que la réparation d'ADN est un mécanisme qui est activé dès le début de la résistance au CDDP (Thomas, 2007; Florea, 2011).

III. Indication de cisplatine pour le traitement du cancer

5.1. Cisplatine et le cancer du poumon

Les petits cancers du poumon à petites cellules (SCLC) représentent 15% de tous les cancers du poumon. À l'heure actuelle, les traitements à base de platine sont des médicaments clés pour SCLC. CDDP et le carboplatine sont deux des types les plus courants de traitements à base de platine utilisés en chimiothérapie. Dans les essais cliniques, le CDDP est souvent choisi en raison de son activité antitumorale forte (Chen *et al.*, 2009).

5.2. Cisplatine et cancer de l'ovaire

La plupart des patients atteints de cancer de l'ovaire sont diagnostiqués à un stade avancé en raison du manque de stratégies efficaces de dépistage et des symptômes spécifiques associés à la maladie à un stade précoce. Le traitement conventionnel pour les stades tardifs de cancers de l'ovaire est l'excision chirurgicale suivie par la combinaison chimiothérapie du CDDP (Pabla, 2008).

5.3. Cisplatine et cancer du sein

Le cancer du sein est l'une des principales causes de mortalité des femmes dans le monde. La chimiothérapie est la seule option pour le traitement du cancer du sein métastatique et de l'état de

l'augmentation de la durée de vie du patient. Le CDDP est un agent chimiothérapeutique important largement utilisé dans le traitement d'une variété d'affections malignes, y compris du sein, du testicule, de l'ovaire, du col utérin, de la prostate, la tête et du cou, de la vessie, du poumon et des lymphomes non hodgkiniens réfractaires. L'effet cytotoxique est probablement le résultat de l'inhibition de la réplication par adduits CDDP-ADN et induction de l'apoptose (Dasari, 2014).

5.4. Cisplatine et cancer du cerveau

Glioblastomamultiforme (GBM) est la tumeur la plus fréquente primaire maligne du cerveau, et à de rares exceptions, est invariablement fatale la thérapie de CDDP est également utilisé pour les tumeurs cérébrales infantiles récurrentes (Stupp *et al.*, 2005).

6. L'effet secondaire

6.1. Hépatotoxicité

Une haute dose de CDDP peut entraîner une hépatotoxicité, le stress oxydatif est la principale raison de la toxicité induite par le CDDP probablement en raison de l'épuisement du GSH réduit, également de nombreuses études ont rapporté qu'il y avait une élévation significative du malonaldéhyde hépatique (MDA) et la réduction des niveaux d'enzymes antioxydants chez les rats traités avec le CDDP. Les bio-marqueurs plus sensibles directement ayant causé le dommage cellulaire et la toxicité sont les transaminases, parce qu'ils sont cytoplasmiques dans un endroit et sont libérés dans la circulation après les dommages cellulaires (Florea,2011 ;Dasari ,2014).

6.2. Cardiotoxicité

La fuite de lactate déshydrogénase (LDH) et la créatine kinase (CK) à partir de myocytes cardiaques est due à la cardiotoxicité qui pourrait être un événement secondaire induit par le CDDP suivant de la peroxydation lipidique des membranes cardiaques (Florea,2011 ;Dasari ,2014).

6.3. Néphrotoxicité

Le rein et l'organe principal pour l'excrétion de CDDP, cela signifie son accumulation dans les cellules épithéliales tubulaires proximales d'environ 5 fois de la concentration sérique, cette disproportionnée contribue à la néphrotoxicité (Dasari ,2014).

Le CDDP est effacé par le rein à la fois par filtration et sécrétion tubulaire glomérulaire à concentrations CDDP dans le rein dépassent ceux dans le sang suggérant une accumulation active de la drogue par les cellules parenchymateuses rénales. Les études de ces dernières années ont permis d'identifier deux transporteurs membranaires différents capables de transporter le CDDP dans des cellules: Plus tard, le CDDP est biotransformé dans le rein en cystéinyl conjugués de glycine et d'autres thiols élevées par certaines enzymes localisées (Thomas, 2007; Günes, 2009).

6.4. Autres organes

La toxicité de d'autres organes induits par le CDDP tels que la toxicité gastrique, suppression méloïdique, des réactions allergiques et des effets toxiques pour la reproduction a également été signalée (Florea, 2011; Dasari, 2014).

Chapitre 02

La néphrotoxicité du

cisplatine

Chapitre 02 : La néphrotoxicité du cisplatine

I. Le rein

I.1. Anatomie

Le rein est un organe noble intraabdominal, encapsulé, pair, asymétrique et rétro-péritonéal, situé entre la paroi dorsale et le péritoine pariétal (le rein droit est situé plus bas que le rein gauche dans environ 65% des cas). Il a la forme d'un haricot mesurant 12 cm de hauteur, 06 cm de largeur et 03 cm d'épaisseur, son poids varie de 150 à 250 grammes, il possède deux bords (médial convexe et latéral concave) et deux pôles (Noël, 2008).

En coupe frontale, le rein laisse apparaître 2 zones distinctes : le cortex ; de couleur pâle et situé en superficie, et la médullaire ; de couleur plus rouge et située en profondeur, cette dernière est constituée par 4 à 18 (en moyenne 8) pyramides rénales (ou pyramides de Malpighi) dont le sommet, orienté vers le centre du rein est appelé papille rénale. La zone corticale coiffe la base des pyramides de Malpighi et s'insinue entre les pyramides constituant les colonnes de Bertin. Le parenchyme rénal est la partie du rein qui lui permet d'assurer ses fonctions. En effet, ce dernier est le siège d'une multitude d'unités anatomiques et fonctionnelles appelées néphrons (Gilroyet *al.*, 2010).

Le néphron est un tube à une extrémité fermée, l'autre extrémité s'ouvre dans un tube collecteur. L'extrémité fermée ou aveugle est indentée afin de former la capsule glomérulaire (capsule de Bowman) en forme de coupe qui entoure presque complètement un réseau de capillaires artériels ; le glomérule. Le reste du néphron faisant suite à la capsule glomérulaire long d'environ 3 cm, comprend trois parties : le tube contourné proximal, l'anse médullaire (anse de Henlé) et le tube contourné distal (Bunel, 2015).

La vascularisation rénale est assurée par l'artère rénale et la veine rénale qui se placent au niveau du hile dans le pédicule rénal, l'artère rénale est une branche de l'aorte abdominale, c'est une artère à la fois nourricière et fonctionnelle. A l'intérieur du sinus rénal l'artère se divise en branches ; les artères interlobaires qui pénètrent dans la médulla et cheminent entre les pyramides pour se diviser et suivre un trajet en forme d'anneau entre le cortex et la médulla (prenant ainsi le nom d'artères arquées). Dans le cortex, les artères sont disposées de façon radiaire et abandonnent régulièrement des vaisseaux afférents qui forment des pelotons vasculaires : les glomérules ; ceux-ci sont impliqués dans l'ultrafiltration du sang ; ce dernier quitte les glomérules par des vaisseaux efférents qui aboutissent dans le réseau capillaire du cortex, relayé ensuite par le réseau veineux. La médulla reçoit des branches de l'artère arquée ou des vaisseaux efférents proches de la médulla (Nguyenet *al.*, 2008).

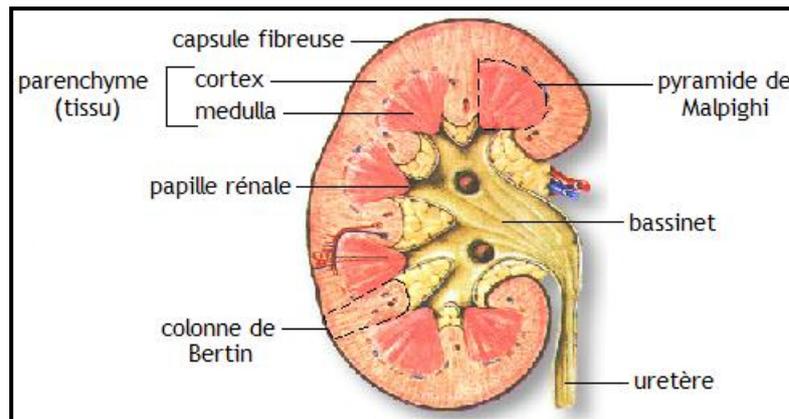


Figure 05 : La morphologie rénale (Bunel, 2015).

I.2. Physiologie rénal

Le rôle le plus connu des deux reins consiste en la production de l'urine via trois processus : la filtration glomérulaire, la résorption tubulaire et la sécrétion tubulaire. Ces trois phénomènes permettent d'épurer le plasma sanguin des déchets métaboliques de l'organisme tout en garantissant la recapture des éléments utiles tels que les nutriments, l'eau et certains ions. La fonction d'épuration est très gourmande en énergie : les reins, dont la masse atteint moins de 1 % de la masse corporelle, consomment 20 à 25 % de l'oxygène de l'organisme pour produire l'ATP nécessaire à leur métabolisme, ce qui signifie la richesse des cellules parenchymes de système tubulaire de néphron en mitochondries (Tortora *et al.*, 2001).

Le rein n'exerce pas uniquement une fonction d'épuration et d'excrétion, il s'agit également d'un organe régulateur qui assure un équilibre hydrique (eau), électrolytique (ions) et acido-basique (pH) du sang (Marieb, 2005).

Enfin, une fonction endocrine qui joue un rôle considérable dans la régulation des métabolismes de l'organisme, tel que la production du métabolite actif de la vitamine D, la synthèse de rénine et d'érythropoïétine (Rabiller, 2013).

I.3. La pathologie

La classification des néphropathies repose généralement sur les données histologiques de la biopsie rénale ; les maladies avec lésions du glomérule sont appelées néphropathies glomérulaires, les pathologies dont les lésions touchent essentiellement l'espace interstitiel et la partie tubulaire sont nommées néphropathies tubulo-interstitielles, les maladies qui touchent les artères du rein sont appelées néphropathies vasculaires. Par ailleurs, d'autres pathologies rénales comme les tumeurs du rein ou les anomalies congénitales du développement rénal font partie de cette classification, toutes ces néphropathies peuvent conduire à une insuffisance rénale (l'insuffisance rénale aiguë (IRA) ou l'insuffisance rénale chronique (IRC) (Rabiller, 2013).

Une régénération tubulaire déficiente renforce la durée et la sévérité de l'atteinte rénale aiguë (ARA), dans ce cas, la pathologie est souvent accompagnée d'une cicatrisation de type fibrotique. La fibrose est la pierre angulaire du développement d'une maladie rénale chronique (MRC): la production de tissu inerte non résorbable conduit à une perte irréversible de néphrons. Il est ainsi démontré que des administrations récurrentes de CDDP occasionnent des ARA à sévérité exacerbée et qui tendent à durer plus longtemps, conduisant à une MRC potentiellement terminale et nécessitant le recours à la dialyse (Bunel, 2015).

II. Mécanisme de la néphrotoxicité induite par le cisplatine

Il y a plus de 25 ans, la néphrotoxicité du CDDP a été reconnue depuis son introduction dans l'organisme, elle peut présenter un certain nombre de façons, cependant la plus grave et la plus courante est l'IRA qui se produit chez 20-30% des patients (Ronald *et al.*, 2010).

II.1. Captage de cisplatine par les cellules rénales

En raison de son poids moléculaire faible et le caractère non chargé, le CDDP non lié dans le plasma est librement filtré par le glomérule, la majeure partie du CDDP est piégé au sein de cortex rénal, ce phénomène dépend de l'énergie, sa concentration dans le rein dépasse ceux dans le sang suggérant une accumulation active de médicament conduisant ainsi à des complications histopathologiques à ce niveau (Yao *et al.*, 2007)

Le tubule proximal rénal présente une sensibilité particulière à la toxicité par le CDDP car ce segment présente l'une des plus fortes densités de mitochondries dans le rein en vue que la mitochondrie est l'une des cibles principales de CDDP (Kolb *et al.*, 2003).

II.2. Le transport de cisplatine dans les cellules du rein

Les études de ces dernières années ont permis d'identifier deux transporteurs membranaires différents capables de transporter le CDDP dans les cellules rénales : Ctr1 et OCT2.

Le Ctr1 est un transporteur de cuivre, sa régulation négative dans les cellules rénales *in vitro* a diminué l'absorption du CDDP et de la cytotoxicité, il est fortement exprimé dans le rein adulte. La protéine est localisée dans la membrane basolatérale du tubule proximal ce qui suggère que Ctr1 est un mécanisme d'absorption du CDDP important dans ces cellules (Holzer *et al.*, 2004).

En outre, le transporteur de cation organique (OCT2) transporte le CDDP, deux observations récentes indiquent son rôle important dans la médiation de l'absorption de CDDP et la toxicité rénale (Pabla, 2009).

II.3. La biotransformation du cisplatine dans le rein

Le mécanisme de la néphrotoxicité du CDDP n'est toujours pas parfaitement élucidé, le métabolisme du CDDP fait apparaître sa transformation en de nombreux métabolites dits mobiles (liaison à des molécules de petit poids moléculaire comme le GSH, la méthionine ou la cystéine) ou

fixes (liaison à des protéines de haut poids moléculaire comme l'albumine ou des nucléotides), certains de ces métabolites pourraient être toxiques, néanmoins la molécule présentant la plus grande toxicité restant la molécule parente (Isnard-Bagnis, 2005). Des études chez le rat et la souris indiquent que le CDDP subit une activation métabolique dans le rein à une toxine plus puissante, ce processus commence avec la formation de GSH dans la circulation, peut-être médié par la glutathion-S-transférase (GST) (Townsend *et al.*, 2009).

Étant donné que les conjugués de GSH passent à travers le rein, ils sont clivés à cystéinyl-glycine à partir de gamma glutamyl transférase (GGT) exprimé sur la surface des cellules tubulaires proximales. Les cystéinyl-glycine métabolisée en cystéine par aminodipeptidases, également exprimée sur la surface des cellules du tubule proximal (Townsend *et al.*, 2003).

Les cystéines sont transportées dans les cellules tubulaires proximales, où ils sont encore métabolisés par la cystéine-S-conjugué bêta-lyase à thiols hautement réactifs (Townsend *et al.*, 2003).

II.4.Lésion tubulaire proximale

La dose de CDDP détermine si les cellules meurent par nécrose ou apoptose (Hutchison *et al.*, 1988). Dans une culture cellulaire des études, les concentrations élevées de CDDP provoquent des cellules nécrotiques, mais les concentrations inférieures conduisent les cellules à l'apoptose. Cependant *in vivo*, le CDDP induit à la fois la nécrose et l'apoptose (Cao *et al.*, 2002).

Plusieurs voies sont définies pour l'apoptose telles que la voie extrinsèque induite par les récepteurs de mort, la voie intrinsèque selon la plupart du temps sur les mitochondries, et le stress de réticulum endoplasmique (ER) (Abdullah *et al.*, 2014).

Dans la voie extrinsèque, l'activation des récepteurs de la mort tels que Fas et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNFR) conduit à l'activation en aval des caspases pour induire l'apoptose. L'importance relative du TNF- α engageant directement les récepteurs du TNF sur les cellules épithéliales rénales pour induire l'apoptose par rapport à son rôle dans la promotion de l'inflammation n'est pas claire (Kaushal *et al.*, 2001).

Dans la voie intrinsèque, la lésion cellulaire conduit à l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax et Bak, ce qui entraîne à leur tour la libération des facteurs apoptogènes y compris le cytochrome c, apoptosis inducing facteur (AIF) et endonucléase G de la mitochondrie (Cilenti *et al.*, 2005).

En plus de caspases et les voies pro-apoptotiques, il y a d'autres voies qui sont activés dans l'IRA induite par le CDDP comme l'autophagie (Peyrou *et al.*, 2007).

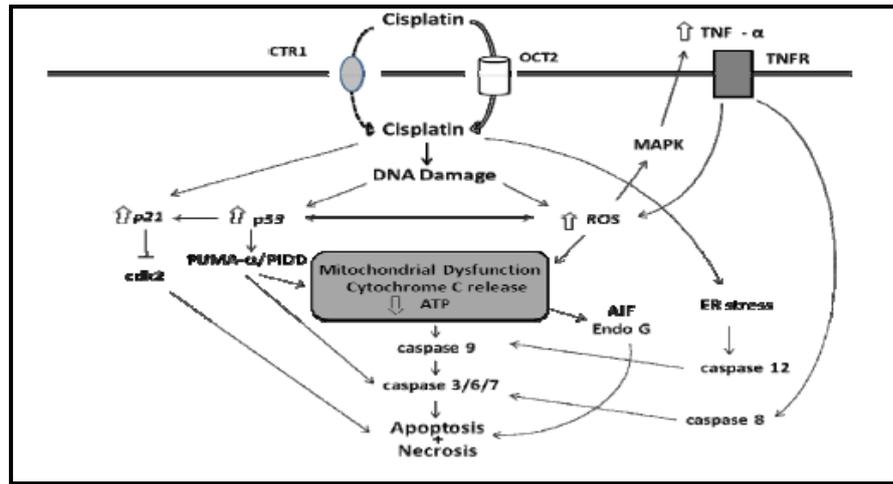


Figure 06 : La mort cellulaire des cellules épithéliales induit par le CDDP (Ronald, 2010).

II.5.L'inflammation

Le CDDP induit la phosphorylation et la translocation subséquente de la transcription du facteur nucléaire kappa B (NF- KB) vers le noyau par la dégradation de la protéine inhibiteur de IKBa (Sung *et al.*, 2008) .

Dans le noyau, le NF-kB activé conduit à la transcription des médiateurs inflammatoires, y compris TNFalpha. À son tour, le TNF-alpha induit l'expression des autres cytokines inflammatoires et le recrutement des maladies inflammatoires dans le tissu rénal, mais le rôle de NF-kB dans l'IRA induite par le CDDP reste à étudier (Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2011).

Outre de la voie NFkB, d'autres voies inflammatoires ont été définies dans l'IRA induite par le CDDP tel que la voie des récepteurs Toll-like (TLR, ces récepteurs jouent un rôle clé dans l'immunité de l'hôte à l'infection par la détection de l'invasion d'organismes et d'initier à la fois la réponse immunitaire innée et adaptative (West *et al.*, 2006) .

La néphrotoxicité du CDDP a été démontré d'être TLR4-dépendante de l'activation de TLR4 sur les cellules du parenchyme rénal, cela peut activer les voies p38-MAPK menant à la néphrotoxicité (Zhang *et al.*, 2008).

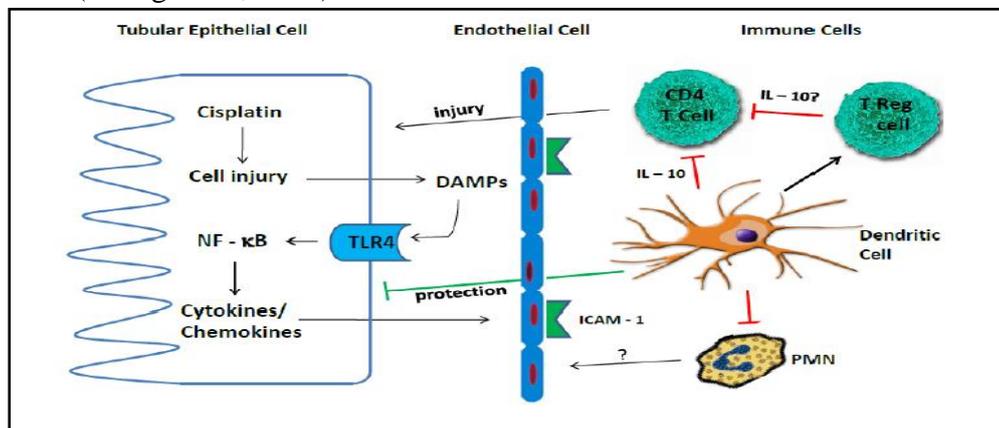


Figure 07 : Les mécanismes immunitaires de la néphrotoxicité du CDDP (Ronald, 2010) .

II.6. Rôle de stress oxydatif dans la néphrotoxicité par le cisplatine

Le mécanisme initial pourrait être un épuisement des réserves cellulaires en GSH. Le GSH constitue un élément clé dans la défense antioxydante de l'organisme. Un déficit en GSH favoriserait la formation accrue d'espèces oxygénées réactives (ROS) l'origine de multiples dommages cellulaires. Le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$), doté d'une très forte réactivité entraîne la peroxydation lipidique de la membrane cellulaire, l'oxydation de nombreuses protéines, l'oxydation de l'ADN (Chirino *et al.*, 2009)

Des altérations mitochondriales avec libération de cytochrome c dans le cytosol. L'activation de la protéine p53 et de la voie des caspases sont des processus à l'origine du déclenchement de l'apoptose cellulaire (Bunel, 2015).

La production de ROS/RNS intervient directement dans les dommages aux cellules notamment à leur ADN, l'élévation du stress oxydatif pourrait être expliquée par la capacité du platine à se lier spontanément au GSH, formant un conjugué qui pourra être éliminé plus facilement par les cellules épithéliales du tubule proximal (RPTECs), cette conjugaison est assortie d'une déplétion en GSH qui affaiblit les défenses antioxydantes de la cellule (Thomas *et al.*, 2007).

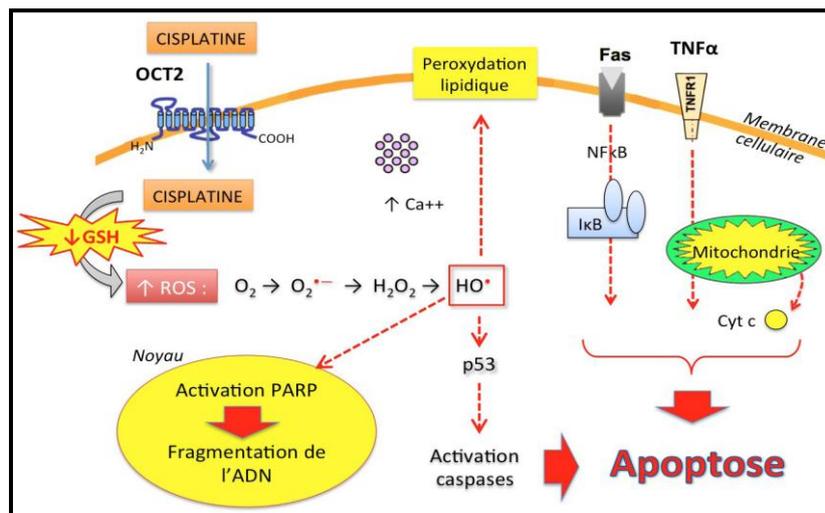


Figure 08 : Mécanismes hypothétiques de la néphrotoxicité du CDDP (Chirino *et al.*, 2009)

II.7. Hémodynamique rénale et de lésions vasculaires

La vasoconstriction rénale provoquée par un dysfonctionnement endothélial et l'autorégulation vasculaire altérée sont des signes importants dans la physiopathologie d'IRA induite par le CDDP, ce dernier induit une lésion ischémique aiguë avec une diminution de la circulation sanguine médullaire entraînant des lésions des cellules tubulaires.

De même chez le rat, le flux sanguin rénal a été réduit 2-3 jours après l'administration du CDDP, cette altération hémodynamique rénale peut être associée à une augmentation du calcium cytosolique dans les artérioles glomérulaires (Kang *et al.*, 2006). Cependant, d'autres causes

possibles de vasoconstriction rénale induits par le CDDP tel que le réducteur COX-2 et les Prostaglandines vasodilatateurs (Shi *et al.*, 2007).

III. L'évaluation de la néphrotoxicité

Les néphrotoxicités d'origine iatrogène seraient l'étiologie la plus fréquente d'ARA dans la population générale, elles sont généralement provoquées par l'usage des médicaments (CDDP) l'exposition à ces substances néphrotoxiques peut induire des effets transitoires ou définitifs et concerner les structures glomérulaires et tubulaires (Bunel, 2015).

Les patients atteints de déficience rénale chronique ou aiguë souffrent de nombreuses complications pouvant conduire à une dialyse, une transplantation ou une mort prématurée. Même si les atteintes rénales peuvent être classées en fonction du type de structure touchées ou du mécanisme mis en œuvre, le CDDP est susceptible d'induire une néphrotoxicité par son mécanisme propre (Fang *et al.*, 2008).

Les outils diagnostiques doivent permettre au médecin d'établir l'étiologie de la dysfonction rénale et de suivre l'évolution de la maladie vers sa guérison ou sa chronicité. Jusqu'ici, les marqueurs cliniques les plus utilisés sont la diurèse et l'estimation du débit de filtration glomérulaire. Afin de progresser dans l'amélioration à long terme du traitement de cette pathologie et de ses conséquences chez les patients, l'utilisation de nouveaux biomarqueurs est nécessaire pour identifier le plus tôt possible l'apparition de néphropathies et d'installer rapidement le protocole thérapeutique approprié (Pabla *et al.*, 2008).

Un biomarqueur est une substance trouvée dans le sang, les sécrétions ou les tissus et qui fournit une mesure de l'état biologique normal, pathologique ou d'une réponse à un médicament ou une autre substance étrangère. Il existe un vaste choix des biomarqueurs comprenant des ARN messagers, des protéines, des peptides et des molécules lipidiques. Ils peuvent aussi être classés selon le type d'atteinte qu'ils identifient. Malgré leurs limites bien connues, les biomarqueurs les plus utilisés actuellement pour la détection de déficiences rénales aiguës ou chroniques sont la protéinémie/protéinurie, la créatininémie /créatininurie et le débit urinaire. Ces marqueurs fonctionnels sont peu sensibles et non spécifiques de l'atteinte aiguë de la fonction rénale ou d'une lésion structurelle. L'avancement des connaissances scientifiques dans la néphrologie a permis durant ces dernières années de mettre en évidence de nouvelles molécules susceptibles d'être utilisées comme marqueurs de l'intégrité tissulaire et de la fonction rénale (Karie *et al.*, 2010). L'identification des biomarqueurs efficaces passe par la compréhension de la physiopathologie et des mécanismes d'action d'un toxique sur sa cible (Gueguen *et al.*, 2012).

Tableau 01 : Classement des biomarqueurs d'atteintes rénales selon leur type, leur fonction ou leur structure rénale cible (glomérulaire, tubulaire. . .) et leur utilisation expérimentale ou clinique (Gueguen et al., 2012).

Biomarqueur	Fonction ou structure cible	Utilisation expérimentale/clinique
Marqueurs classiques Créatinine	La clairance de la créatinine permet d'estimer le débit de filtration glomérulaire	Marqueur de référence pour classer les atteintes rénales en clinique mais déficit de sensibilité et de spécificité Utilisation clinique malgré un manque de spécificité
Urée Électrolytes, glucose, pH et volume urinaire	Fonction tubulaire (réabsorption) évaluée même en cas de faible altération	
Protéines de haut PM Albumine, immunoglobuline, transferrine, haptoglobine	Excrétion élevée de protéines qui indique une altération glomérulaire	Marqueur d'atteinte aiguë ou chronique en clinique (microalbuminurie), degré d'atteinte glomérulaire
Protéines de bas PM α 1-microglobuline, β 2-microglobuline, β -trace protein, cystatine C, <i>retinol binding protein</i> , KIM-1	Marqueurs précoces de dysfonction tubulaire La BTP et la RBP permettent une meilleure estimation du débit de filtration glomérulaire	Utilisation pour prévoir si une greffe rénale est nécessaire KIM-1 mesuré en clinique pour évaluer l'IRA et pour surveiller les atteintes médicamenteuses
Enzymes N-acétyl- β -glucosaminidase (NAG), phosphatase alcaline	Tubule proximal, papille rénale, glomérule Tubule proximal (spécifique du segment S3)	Utilisation comme marqueur prédictif et/ou pour la sévérité des dommages en clinique ou expérimentalement Utilisation comme marqueur tubulaire peut être limitée car augmentation lors de pathologies glomérulaires chroniques
γ -glutamyl transpeptidase Alanine aminopeptidase Glutathion-S-transférase (GST) LDH, AST	Tubule proximal (S3 chez les rongeurs) Tubule proximal GST α (tubules proximaux) et GST π ou μ (tubules distaux) Néphron entier	LDH et AST sont peu spécifiques
Marqueurs de l'inflammation NGAL, IL-18 L-FABP, H-FABP	Tubule distal et proximal Tubule proximal (L-FABP) ou distal (H-FABP)	Marqueurs de diagnostic et pronostic masqué en cas d'atteinte glomérulaire chronique Utilisation clinique comme marqueur précoce de dysfonction rénale
Cyr61 CXCR3-binding chemokines Platelet activating factor	Induction dans la médulla externe et excrétion urinaire Inflammation tubulaire Tubule collecteur, excrétion urinaire	Test clinique lors de traitement anti-rejet Études expérimentales
Autres biomarqueurs Clusterine	Marqueur d'altération structurelle du TCP	Marqueur précoce et sensible d'atteintes rénales en l'absence d'atteinte fonctionnelle
Collagène IV Endothéline	Glomérule Endothélium vasculaire	Lésion glomérulaire chronique chez le rat et l'homme Détection chez les patients ayant une nécrose tubulaire aiguë
Fibronectine	Marqueur tubulaire retrouvé dans les urines	Augmentation lors de néphrotoxicité médicamenteuse chez le rat
NHE-3	Tubules rénaux	Lésion tubulaire discriminant l'étiologie (pré-/post-rénale)
Ostéopontine	Tubule proximal	Augmentation lors d'inflammation rénale chez le rat et l'homme
RPA-1...	Tubule collecteur lors de nécrose papillaire rénale	Néphrotoxicité médicamenteuse chez le rat

IV. Stratégies de néphroprotection

A l'heure actuelle, la seule mesure permettant de réduire la néphrotoxicité du CDDP consiste à augmenter la diurèse (1 à 2 litres de liquide, 8 à 12 h avant et après le traitement) : la perte rapide de grands volumes liquidiens contribue à assurer un débit tubulaire tel que la capture par RPTECs est réduite (Pabla *et al.*, 2008). Le maintien d'une concentration élevée de chlorures (par l'utilisation de solutions de perfusion à base de NaCl) permet également d'éviter la formation de dérivés mono et di-hydratés plus réactifs. L'efficacité de ces stratégies reste toutefois incomplète et aléatoire (Dos Santos, 2012).

Une approche complémentaire à l'augmentation de la diurèse consiste à administrer une substance cytoprotectrice concomitamment au CDDP. L'amifostine, utilisée aux Etats-Unis et au Canada, permet de réduire le risque de néphrotoxicité par son activité neutralisant les ROS ; cette activité ne semble pas s'opposer à la régression de la tumeur. D'autres effets incluant une accélération de la réparation de l'ADN et une inhibition de l'apoptose pourrait contribuer à la protection rénale (Kelly *et al.*, 1999).

D'autres antioxydants, tels que la N-acétylcystéine, le GSH, la vitamine E ou le thiosulphate de sodium pourraient également permetent de réduire la néphrotoxicité du traitement par CDDP, alors que les preuves cliniques restent insuffisantes pour ces agents protecteurs (notamment dans des essais de neuroprotection), certains sont de surcroi suspectés de favoriser la survie tumorale (Dos Santos, 2012).

Des approches pharmacologiques autres que l'administration d'antioxydants permettant de réduire la toxicité rénale du CDDP et de minimiser le risque d'ARA ont été testées. Celles-ci ont notamment révélé un effet néphroprotecteur pour la cimétidine, dont le transport par les OCT-2 entre en compétition avec celui du CDDP. De plus, en inhibant certains CYP450, la cimétidine permettrait de limiter la génération de radicaux libres (Bunel, 2015).

Une autre stratégie visant à limiter l'entrée de CDDP dans les RPTECs pourrait être un blocage du transporteur Ctr1. Cette stratégie reste discutable en raison de la présence de Ctr1 dans de nombreuses cellules. Au contraire, les OCT-2 sont distribués essentiellement dans le rein, la cochlée et les neurones et son peu présents dans les tumeurs (Ichimura *et al.*,2004.)

Alternativement, la recherche se concentre sur la découverte de nouveaux composés, notamment d'origine naturelle, qui pourraient être administrés parallèlement au CDDP. De nombreuses études publiées à ce sujet rapportent entre autres des réductions de mortalité cellulaire, de stress oxydatif ou de dégâts à l'ADN (Nagwani *et al.*, 2010).

En cas de surdosage en CDDP, il est possible d'administrer du diéthylthiocarbamate afin de chélater le platine (II) et de faciliter son élimination rénale. A l'instar de l'administration d'amifostine ou d'acétylcystéine, l'efficacité de cette mesure reste limitée. Toutefois, en pratique, l'hémodialyse permet d'épurer le sang en limitant la fixation au parenchyme rénal (Nitha *et al.*, 2008).

Chapitre 03
Généralités sur la propolis

Chapitre 03 : Généralités sur la propolis

I. La propolis

I.1. Définition

La propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies par les abeilles sur certaines parties de végétaux (essentiellement les bourgeons et les écorces de certains arbres), substances qu'elles rapportent à la ruche et qu'elles modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs propres sécrétions (cire et sécrétions salivaires principalement) (Donadieu, 2008).

Etymologiquement, « pro » (devant) et « polis » (cité) veut dire « devant la cité » ou « protège la cité ». Son nom résume bien à lui seul les propriétés et les rôles de cette substance d'origine à la fois végétale et animale (Donadieu, 2008).

I.2. Origine

L'origine botanique de la propolis peut influencer la saveur, la couleur, et la composition chimique de la propolis (Kokaleci *et al.*, 2003). La propolis a deux origines :

L'origine interne : la propolis est un résidu résineux provenant de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe situé entre le jabot et l'intestin moyen.

L'origine externe : les principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis sont représentées par différents conifères: pin, sapin, épicéa; plusieurs espèces de peuplier (qui semble l'espèce la plus importante); l'aulne; le saule; le marronnier d'inde; le bouleau; le prunier; le frêne; le chêne; et l'orme (Moudir, 2005).

I.3. Composition chimique

La composition chimique de la propolis est extrêmement complexe. Elle est composée essentiellement de cire, résine et produits volatils. La cire est sécrétée par les abeilles. Les deux autres composants proviennent des sécrétions des plantes butinées lors de la collecte de la propolis (Marcucci, 1995).

La composition chimique de la propolis a éveillé l'intérêt de nombreux chercheurs. Plusieurs travaux ont été effectués sur des propolis de différents pays et ont abouti aux conclusions suivantes : la composition chimique de la propolis varie selon l'origine botanique (Bankova *et al.* 2000, Popova *et al.* 2002), l'espèce d'abeille, le temps de la récolte et la zone géographique mais elle

présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable (Daleprane *et al.*, 2013).

D'une manière générale la propolis est composée de 45 à 55% de résine contenant principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques ainsi que leurs esters, 25 à 35% de cire, 5% de pollen et 5% d'autres composés organiques avec comme minéraux: calcium, magnésium, fer, zinc, silice, potassium, phosphore, manganèse, cobalt et vitamines: A, B1, B2, B3, C, E, H et la vitamine P (Segueni, 2011).

II. Les polyphénols

II.1. Définition

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Gianmaria, 2011).

II.2. Classification des polyphénols

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou sans autres fonctions (alcooliques, carboxyles...). Dans cette famille de molécules, se trouvent de nombreuses substances, on peut dégager les principales classes de composés phénoliques: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, ...) (Figure 09).

II.2.1. Les acides phénols

Les acides phénols, ou acides phénoliques, ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se divisent en deux catégories:

Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou de glycosides, dont les plus répandus sont l'acide salicylique, l'acide vanillique, l'acide gallique (Del Rio, 2009).

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique de structure de type C6-C3. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféïque, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide sinapinique, ils existent souvent sous forme combinées avec des molécules organiques (Bruneton, 2009).

II.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 constituée de deux cycles aromatiques (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) .Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, ... (Figure 09) (Tapas, 2008).

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances (Hadj, 2009).

II.2.3. Les tannins

Les tannins sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux :

Les tannins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose.

Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique (D'Archivio, 2007). Les

tannins condensés : proanthocyanidines : ce sont des composés phénoliques hétérogènes. Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5 desoxy-3-flavonols et flavan-3,4-diols (Sarni-Manchad, 2006).

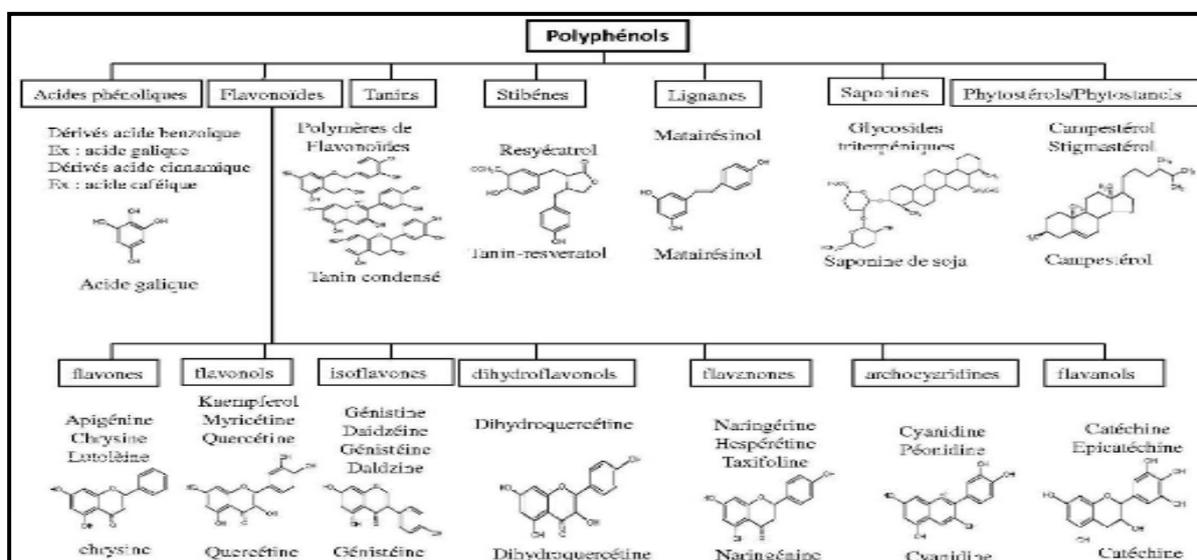


Figure 09 : Les différentes classes des composés phénoliques (Yvon, 2004).

II.3. Biodisponibilité des polyphénols

Des études expérimentales réalisées sur des rats, ont démontrés que l'absorption au niveau gastrique des polyphénols est possible pour certains flavonoïdes, comme la quercétine mais pas pour leurs glycosides .Les polyphénols présents dans les alimentas sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères ne peuvent être absorbés tels quels ; ils doivent être hydrolysés au préalable par des enzymes intestinales ou par microflore du côlon. Les polyphénols sont conjugués

dans les entérocytes et ensuite au niveau du foie et forment des dérivés méthyles, sulfatés, glucuronides ou glucuronides sulfatés (Pandey et Rizvi, 2009).

Cette transformation en différents métabolites permet d'éviter la formation de quinones toxique et facilite l'excrétion par augmentation de leur hydrophilicité. Ces dérivés sont soit transportés vers les tissus ou les reins, soit excrétés dans l'intestin via la bile. Les polyphénols provenant de la bile du foie ainsi que ceux n'ayant pas été absorbés durant le transit gastro-intestinal peuvent encore être dégradés par la flore intestinale. Finalement, les polyphénols seront excrétés par les urines ou les fèces (Collin *et al.*, 2011).

III. La propolis comme une source des polyphénols

III.1. La propolis Algérienne

Certains auteurs rapportent que les diterpéniques et notamment l'acide hydroxyditerpénique constitue le principale composé de l'extrait hydro-alcoolique (Miguel, 2013). Les polyphénols tels que : chalcone, pinostrobine, galangine, naringénine, tectochrysin, methoxychrysin, et un coumarine prénylé (suberosine) ont été détectés dans les extraits hydro-alcooliques de la propolis algérienne (Boutabet *et al.*, 2011).

Selon une étude menée par Segueni *et al.* (2012), la fraction volatile de trois échantillons de propolis recueillis dans différents endroits de l'est algérien (El-Malha, Benibelaid et Kaous) a montré une huile essentielle avec une composition distincte : 2-hexénal, l'acide myristique, l'acide linoléique et spathulenol dans la fraction volatile de la propolis d'El-Malha, alors que dans la propolis de Benibelaid : isooctane, l'acide linoléique, p-cymène, undécane, l'acide plamitique et le 4terpineol. Les principaux constituants de l'huile essentielle de la propolis ont été de Kaous : le 2-hexénal, l'acide myristique, l'acide linoléique, le carvacrol, acédrole, p-cymène.

III.2. Propriétés pharmacologiques et biologiques

Les propriétés pharmacologiques de la propolis sont connues dans la médecine populaire depuis l'antiquité, mais récemment, l'intérêt de la propolis est en développement considérable en raison de son large spectre d'activités biologiques. L'ensemble des recherches effectuées à ce jour permet de montrer que la présence des polyphénols est responsables de tous les propriétés pharmacologiques de la propolis (Sulaiman *et al.*, 2012).

Parmi ses activités on trouve : l'activité anti-inflammatoire, analgésique / anesthésie, cardioprotecteurs, antiangiogénique (Daleprane *et al.*, 2013), antivirale, antitumorale (Marcucci, 1995), ainsi que l'activité antioxydante (Benguedouar *et al.*, 2008 ; Lahouel *et al.*, 2010).

III.2.1. Propriétés antioxydantes

La propolis est une substance constituée de nombreux composés antioxydants : vitamines E, C et les polyphénols. L'activité antioxydante de ces composés naturels dépend de ses composants chimiques qui ont été décrits comme des inhibiteurs puissants de stress oxydatif, un de ses principaux composants, l'ester d'acide caféique phénéthyle (CAPE), qui bloque la production des espèces oxygénés radicalaires (EOR) dans plusieurs systèmes, voir les flavonoïdes qui sont des antioxydants puissants dans la propolis, et capables de piéger les radicaux libres et de protéger ainsi la membrane contre la peroxydation lipidique et donc contre le stress oxydatif(Daleprane *et al.*, 2013).

Les études ont montré que l'activité antioxydante de la propolis était positivement corrélée avec son contenu en polyphénols (Kumazawa *et al.*, 2004). Dans tous les systèmes de dosage antioxydant, l'extrait aqueux de propolis (AEP) a montré une activité plus élevée par rapport à l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) . Cela peut être dû à sa teneur plus élevée en polyphénols. En outre, il peut être utilisé dans la prévention de diverses maladies liées à des radicaux libres (Wagh, 2013).

In vivo, la propolis réduit significativement la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumon, cerveau) et module l'expression des enzymes antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) (Altuntas *et al.*, 2014).

III.2.2. Propriétés antitumorale

Plusieurs études ont pu montrer l'activité antitumorale vis-à-vis de différentes lignées tumorales (sang, peau, côlon, sein, prostate, poumon, foie, cerveau, rein) .Il a été démontré que l'extrait de la propolis agit sur la voie de signalisation en phosphoKinase A(PAKI) dont elle dépend plusieurs cancers de car facteurs impliqués dans cette voie de signalisation. L'effet antiprolifératif peut résulter aussi de la restauration du signal apoptotique. Les différentes molécules de la propolis vont pouvoir agir à différents endroits pour induire l'apoptose (Cardinault *et al.*,2012) .La galangine est un flavonoïde parmi les composants de la propolis qui présente des effets préventifs et antiprolifératifs , certaines ont démontré que la galangine inhibe la prolifération des lignées cancéreuses et induit l'apoptose par libération du cytochrome C dans le cytosol avec une diminution du potentiel de la membrane mitochondrial (Zhang *et al.*, 2010).

III.3. L'effet protecteur de la propolis

Plus à ses activités pharmacologiques, la propolis présente des effets préventifs. Son effet protecteur est considéré comme le résultat de ses propriétés antioxydants ainsi que sa capacité à piéger les radicaux libres .Plusieurs travaux ont prouvé cet effet protecteur (Kimoto *et al.*, 1999).

Selon l'étude de Lahoual *et al.* (2010), ont démontré que l'extrait de la propolis algérienne a un effet protecteur contre le stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. De plus, son effet protecteur des reins et du foie a été prouvé contre la toxicité du cyclophosphamide et de la doxorubicine (Lahoual *et al.*, 2004) .

D'autres études ont montré sa capacité à protéger les tissus contre les effets carcinogènes de certains molécules et produits chimiques (Borrelli *et al.*, 2002) .Elle a un effet hépatoprotecteur contre les dommages induisent par le tétrachlorure de carbone , en piégeant les radicaux libres et en protégeant les tissus contre la peroxydation lipidique (Gongalez *et al.*, 1995).

Matériel et méthodes

Partie 01 : Matériel et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire de Biochimie et labo de recherche, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des sciences de l'Université de Jijel. Il concerne l'évaluation de l'effet de propolis contre la toxicité induite par le CDDP.

I. Etude phytochimique de la propolis

I.1. Récolte de la propolis

La propolis a été récoltée selon la technique de raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence par température assez basse. La propolis alors dure et friable se détache mieux (Segueni, 2011).

L'échantillon de la propolis ont été recueillis à partir de Kaous, Taxanna pendant la période du printemps (Mars et Avril 2016), et ce par grattage et raclage des parois de la ruche par les apiculteurs.

I.2. Préparation de l'extrait éthanoliques de la propolis (EEP)

Selon le protocole décrit par Bruneton(1999), les échantillons de la propolis coupés en petits morceaux sont soumis à une extraction par macération dans l'éthanol 96% (20g de la propolis pour 100 ml de l'éthanol) sous agitation et à l'abri de la lumière pendant 10jours. Après filtration des macérats sur papier wattman, une évaporation à sec est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Evaporateur E100, Heidolph) à 60°C.

Juste après évaporation, les résidus obtenus de chaque échantillon sont pesés pour calculer le rendement d'extraction selon la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction en (\%)} = (E_1 / E_2) \cdot 100$$

Avec :

E_1 : masse de l'extrait obtenu (g)

E_2 : masse de la prise d'essai

I.3. Dosage des polyphénols totaux

✓ Principe

L'évaluation des polyphénols totaux est réalisée selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par Singleton *et al.* (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 oxydes 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 735 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits (Georgé *et al.*, 2005).

✓ Protocole du dosage

Brièvement, 500µL de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué à 1/10^{ème} dans l'eau) sont ajoutés à 100 µL d'extrait dilué. Le mélange obtenu est laissé 5min à température ambiante, puis 400µL de la solution de carbonate de sodium 75g/l sont ajoutés. Après incubation à 20°C pendant 30 min, l'absorbance est lue à 735 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Visible (UV-mini1240, SHIMADZU, China) 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- 0,4mg/ml) dans les mêmes conditions que les extraits. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec de l'extrait (mg GEA/g propolis) (Boizot, 2006).

I.4. Dosage des flavonoïdes totaux

✓ Principe

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode au trichlorure d'aluminium (AlCl₃) décrite par Bahorun *et al.* (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.

✓ Protocole du dosage

A 1ml d'échantillon ou standard (préparé dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ à 2% dans le méthanol. Après un repos de 10 min, l'absorbance est lue à 430 nm contre le blanc.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0- 200µg/ml) dans les mêmes conditions que les extraits.

La quantité des flavonoïdes correspond à la moyenne de 3 mesures sur un échantillon donné.

Les résultats sont exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par milli gramme d'extrait (µg EQ/mg de propolis) (Meziti, 2009).

I.5. Etude du pouvoir anti radicalaire par le test au DPPH° (2,2-Diphénylpicrylhydrazyl)

✓ Principe

La capacité de piégeage des radicaux libres des extraits éthanoliques a été déterminée en utilisant la méthode au DPPH°, comme elle est décrite par Brand *et al.* (1995).

Le principe est basé sur la capacité des extraits à réduire le radical DPPH°. Le DPPH° change sa couleur du violet vers le jaune pâle quand il réagit avec un antioxydant, ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 515 nm. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité.

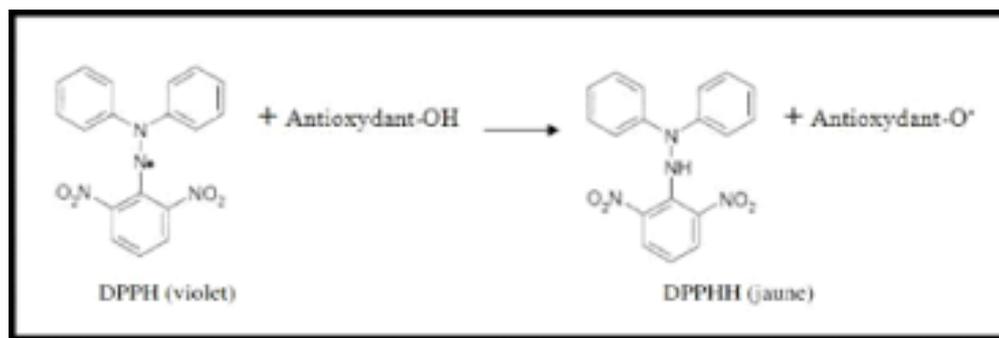


Figure 10: Réduction du DPPH• par un antioxydant (Brand et al. ,1995).

✓ Protocole du dosage

La solution de DPPH° est préparée à l'avance (au moins 3à4 h) car la solubilisation est difficile et ne se conserve pas plus de 48h à l'obscurité. À 1,5 ml de solution éthanolique de DPPH° (100 µM) sont additionnés 0,5 ml d'extrait ou de la quercétine (pris comme référence) à Différentes dilutions (0-400 µg/ml) de chaque extrait ainsi que de la quercétine. Le mélange contenant 0,5ml de méthanol et 1,5ml de DPPH° est considéré comme le contrôle.

Après 30 min à l'obscurité, la réduction du DPPH° est contrôlée en mesurant l'absorbance de la solution à une longueur d'onde caractéristique (517 nm), à cette longueur d'onde le radical absorbe, mais après sa réduction par l'antioxydant ou un autre radical l'absorption diminue.

L'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage de réduction du DPPH° en utilisant la formule suivant :

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

Dont :

I : Pourcentage d'inhibition.

A_B : Absorbance du contrôle négatif.

A_A : Absorbance de l'échantillon.

II. Etude *in vivo* de l'effet antioxydant de la propolis

II.1. Animaux et conditions d'hébergement

L'étude a été réalisée sur des rats mâles de souche *Wistar albinos* (l'Institut Pasteur, Alger, Algérie) pesant environs de 180-250g. Les animaux sont placés égaux selon le poids en groupe de 3 dans des cages standards pour une période d'acclimatation avant d'être utilisés dans les différentes expériences. Pendant cette période, les animaux ont un accès libre à la nourriture et à l'eau et sont maintenus dans une animalerie à température constante (22±2)°C soumis à un cycle de lumière / obscurité de 12 /24h.

II.2. Traitement

Notre travail est consacré à l'étude *in vivo* d'EEP contre la toxicité induit par le CDDP. Pour la réalisation de l'étude *in vivo* nous avons choisi la propolis de Kaous. Le CDDP est utilisée non pour son action anticancéreuse mais pour son effet toxique.

Les animaux ont été répartis en 4 groupes:

Groupe 01 (témoin): les rats reçoivent 1ml de l'eau distillée par gavage gastrique une fois par jour pendant 8 jours.

Groupe 02 (CDDP) : les rats reçoivent 1ml de l'eau distillée par gavage gastrique une fois par jour pendant 8 jours puis une dose unique par voie intrapéritonéale (IP) de CDDP (5 mg /kg) au 9^{ème} jour

Groupe 03 (Propolis +CDDP) : les rats reçoivent une dose de 100 mg /kg//j de la propolis par gavage gastrique pendant 8 jours suivie par une dose unique de CDDP (5 mg/kg) par voie IP le 9^{ème} jour.

Groupe 04 (Quercétine + CDDP) : les rats reçoivent une dose de 10 mg /kg/j de la quercétine par gavage gastrique pendant 8 jours suivie par une dose unique de CDDP (5mg/kg) par voie IP le 9^{ème} jour.

II.3. Prélèvement du sang, sacrifice des animaux et prélèvement des organes (reins, cœur et foie)

Six jours après l'administration de CDDP, le sang est prélevé avec un capillaire dans des tubes à hémolyse contenant l'héparine, par ponction de la veine du sinus rétro – orbital. Le sang est ensuite centrifugé à 3000 tours /min pendant 15 min, le plasma est aliquoté puis congelé à -20°C afin d'effectuer l'analyse des paramètres biochimiques.

Les rats sont euthanasiés par inhalation des vapeurs du chloroforme, la paroi abdominale est ouverte, le diaphragme est incisé et le cœur, le foie et les reins sont prélevés, pesés, plongé et lavés dans du NaCl 0,9% pour éliminer le sang, puis congelé à -20°C pour réaliser les différents dosages.

II.4. Dosages des paramètres biochimiques

La mesure des activités plasmatiques des enzymes pour le diagnostic de l'atteinte rénal, cardiaque et hépatique, à savoir Urée et créatinine, le lactate déshydrogénase (LDH) la transaminase glutamique oxaloacétique (TGO) et la transaminase glutamique pyruvate (TGP), la phosphatase alcaline (PAL), les protéines totales, la bilirubine, la créatinine Kinase (CK) ou (CPK) ont été effectués dans un laboratoire privé (laboratoire de BEKIOUA) en utilisant des Kits SPINREACT sur automate (ARCHITECT cSYSTEMSC4100), le dosage est effectué selon les instructions du fabricant. Les résultats sont exprimés en UI/l.

II.5. Dosages tissulaires

II.5.1. Préparation de la fraction cytosolique

La fraction cytosolique est préparée selon la méthode décrite par Iqbal *et al.*(2003). Pour cela, 0,5 g du rein (cœur, foie) sont coupés en petits morceaux et homogénéisés avec trois volumes de tampon phosphate KH_2PO_4 (0,1 M, pH 7,4) contenant KCl 1,17% à l'aide d'un Potter en verre (Wheaton USA). L'homogénéisation est réalisée à 4°C. L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à 2000 tours / min pendant 15 min à 4°C pour éliminer les débris nucléaires. Le surnageant obtenu est centrifugé à 9600 rpm (en utilisant la centrifugeuse de type Sigma 3-16 PK, Germany) pendant 30 min à 4°C, et le surnageant final est utilisé pour mesurer l'activité enzymatique.

II.5.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

✓ Principe

Le dosage de MDA est réalisé selon la méthode décrite par Ohkawa *et al.* (1979). Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres. La réaction de dosage du MDA repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100°C) entre le MDA et deux molécules TBA, d'un complexe coloré absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

Procédure : Pour ce dosage, 0,5 ml de la fraction cytosolique est homogénéisé avec 0,5 ml de TCA 20% et 1 ml de TBA (0,67% dans NaOH 50 mM) ensuite, le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 min, refroidi à l'eau de robinet pour stopper la réaction puis 4 ml de n-butanol sont ajoutés. Après centrifugation de 15 min à 3000 tours / min, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 532 nm contre un blanc fait avec 0,5 ml du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) de la même façon que l'échantillon.

Le taux du MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions, exprimés en nmole / g en utilisant le tétraéthoxypropane (TEP).

II.5.3. Dosage du glutathion (GSH)

✓ Principe

Pour l'évaluation du taux de GSH réduit chez les rats, la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) est utilisée, il s'agit d'une réaction chimique évoluant en une seule étape suivie d'une détection colorimétrique. Elle consiste en l'oxydation du GSH par le DTNB induisant la libération de TNB qui, au pH alcalin, présente une absorbance à 412 nm.

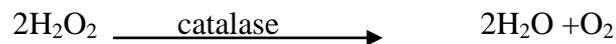
Procédure : pour ce dosage, 50 µl de l'homogénat sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 8). À 3 ml du mélange de dilution, 20 µl de DTNB (0,01 M) sont additionnés.

La lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le tampon phosphate (pH 7,4). Les concentrations sont déduites à partir d'une gamme étalon de GSH de concentrations de (0-10mM) préparée dans les mêmes conditions que le dosage.

II.5.4. Evaluation de l'activité enzymatique de catalase (CAT)

✓ Principe

L'activité de la CAT est mesurée selon la méthode de Claiborne (1985) par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution de peroxyde hydrogène (H₂O₂) après addition de la fraction cytosolique, mesurée à 240 nm pendant 1min 25°C. Cette diminution étant due à la diminution du H₂O₂ par la CAT selon la réaction :



Procédure : Dans la cuve de la mesure, 1ml de tampon phosphate (KH₂PO₄ : 0,1M, pH 7,2) est introduite puis 950µl d'H₂O₂ (0,019M) sont ajoutés. La réaction est déclenchée par l'addition de 25µl de la source enzymatique. L'absorbance est lue au spectrophotomètre (JNEWAY 7315 spectrophotomètre) à 240nm chaque minute pendant deux (02) minutes.

L'activité enzymatique de la CAT est exprimée en UI /g de protéines selon la réaction suivante :
 UI /g de protéines = (2.3033 /T) Log (Do₁ /Do₂) / mg de protéines

Avec :

T : Durée de la mesure (min) ;

Do₁ : Densité optique à l'instant t₀ ;

Do₂ : Densité optique à l'instant t.

II.5.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la glutathion - S – transférase cytosolique (GST)

✓ Principe

La GST est une famille des enzyme multifactorielles présentes chez tous les organismes (Renuka *et al.*, 2003). Cette enzyme est très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjuguer le GSH avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes organiques (ROOH) son activité est estimée par son action sur le composé CDNB en présence de GSH comme un co-substrat (Habig *et al.*, 1974).

Procédure : Un mélange de 1.7 ml du tampon phosphate KH₂PO₄ (0.1M, pH 6,5) et de 100 µl de CDNB (20mM) a été préparé et incubé à 37°C pendant 10 min. A ce mélange, 100µl du GSH (20mM) est additionné puis la réaction est entamée par l'addition de 100 µl de la fraction cytosolique (rien, cœur, foie). Le changement de l'absorbance est enregistré à une longueur d'onde 340 nm dans un intervalle d'une minute pendant 5 min contre un contrôle préparé dans les mêmes

conditions avec du tampon phosphate. Les résultats sont exprimés en UI /mg de protéines selon la formule :

$$\text{Activité (UI /ml)} = (\Delta D_{0340\text{nm}}/T)_E - (\Delta D_{0340\text{nm}}/T)_B \times V_t \times F / \epsilon \times V_{EZ}$$

$(\Delta D_{0340\text{nm}}/T)_E$: différence de l'absorbance échantillon.

$(\Delta D_{0340\text{nm}}/T)_B$: différence de l'absorbance blanc.

II.5.6. Dosage des protéines

✓ Principe :

Le dosage est réalisé selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode qui permet la mesure de la concentration protéique, est basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu brillant de coomassie G250 qui lie avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobe des acides aminés présent dans les protéines. La concentration en protéines dans l'échantillon est indiquée par le changement de l'absorbance qu'elle proportionnelle à la quantité du colorant lié.

Procédure : 100µl de la fraction cytosolique du rein (cœur, foie) dilués à 1/5^{ème} dans le tampon phosphate (pH 7.4) puis 3ml du réactif de BBC diluée 1/2^{ème} sont ajoutés. Après agitation, le mélange est incubé 5 min à température ambiante. La lecture de DO est effectuée à 595nm contre le blanc réactif.

La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée à partir d'une gamme étalon réalisée dans les conditions que les échantillons avec de l'albumine sérique bovine (BSA) de concentrations (0-1mg /ml).

III. Traitement des résultats

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous forme de moyenne ± écart type. Nos résultats sont vérifiés par le test de *student* avec un seuil de signification supérieur à 96% (p <0.05) (p > 0.05) effet non significatif (ns).

(p <0.05) désigne effet significatif *.

(p < 0.01) désigne un effet hautement significatif **.

(p < 0.001) désigne un effet très hautement significatif ***.

Résultats et Discussion

Partie 02 : Résultats et Discussion

I. Etude phytochimique

Les résultats de l'étude phytochimique et de l'activité anti-radicalaire sont représentés ci-dessous.

Après la récolte des deux échantillons, on a remarqué que les échantillons ont des couleurs différentes (*Propolis Kaous* : marron, *Propolis Taxanna* : noir). Cette variabilité de couleur est la conséquence d'une composition chimique différente. Les différents échantillons possèdent également des odeurs un peu différentes.

I.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. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau (02)

Tableau 02: Rendement d'extraction à partir des deux échantillons de la propolis.

Echantillon	Poids de la propolis(g)	Poids sec de L'extrait éthanolique (g)	Rendement d'extraction (%)
EEP Kaous	85.79	23.82	27.76%
EEP Taxanna	85.60	19.79	26.81%

On constate que le rendement des extraits éthanoliques diffère d'un extrait à l'autre selon les régions. L'extrait de la propolis de Kaous présente le meilleur rendement (27.76%), par rapport à celui de Taxanna (26.81%).

I.2. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes

La quantité des composés phénoliques des deux extraits éthanoliques de la propolis, exprimée en mg EAG /g de propolis, est illustrée dans le tableau (03)

Tableau 03: Teneur en polyphénols dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent acide gallique /g de propolis.

	EEP Kaous	EEP Taxanna
Concentration (mg EAG/g de propolis)	797,5±0,35	675±3,53

On remarque que les teneurs en polyphénols diffèrent d'un extrait à un autre selon la région de la récolte de chaque échantillon, la propolis de Kaous présente la teneur en polyphénols la plus élevée (797,5±0,35mg EAG/g) par rapport à l'extrait de Taxanna (675±3.53 mg EAG/g). D'après ces résultats, la teneur polyphénolique des extraits de la propolis varie d'une région à une autre, ceci est expliqué par l'influence des facteurs environnementaux des deux régions sur la synthèse de ces

composés phénoliques et peut être par la différence entre les souches des abeilles qui produisent la propolis.

Comparant ces résultats, on constate que les taux enregistrés dans notre étude sont plus haut que ceux obtenus par (Kebsa *et al.*, 2006) avec la propolis de Kaous 370mg éq quercétine/g de l'extrait brut, ceci peut être expliqué par l'effet de la saison .

Les flavonoïdes constituent la classe la plus abondante des polyphénols dans la nature. Le principe de leur dosage repose sur la propriété de ces composés à chélater les ions aluminiums en donnant un complexe coloré en jaune dont l'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des flavonoïdes dans l'extrait.

Le tableau (04) exprime les teneurs en flavonoïdes des deux extraits éthanoliques de la propolis exprimées en mg EQ/g de propolis.

Tableau 04: Teneur en flavonoïdes dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent quercétine /g de propolis.

	EEP Kaous	EEP Taxanna
Concentration (mg EQ/g de propolis)	340±3,66	333,3±1

Les résultats montrent que la teneur en flavonoïdes est presque la même dans les deux échantillons, cependant on ne peut pas négliger que la propolis de Kaous a la teneur la plus élevée (340±3,66 mg EQ/g) à celle de Taxanna (333.3±1mg EQ/g).

Une étude réalisée par Kartal *et al.* (2002), confirme que la teneur en flavonoïdes totaux peut être utile pour différencier entre les échantillons de la propolis.

Cette variation observée dans la teneur des polyphénols et des flavonoïdes entre les deux échantillons dépend essentiellement à l'origine de la propolis, la saison de la récolte, la localisation géographique, la durée de la conservation, et les conditions environnementales.

(Lopez *et al.* , 2003).

I. 3. Etude du pouvoir anti radicalaire par le test au DPPH°

La figure (11) montre les variations de l'effet scavenger de l'EEP et de la quercétine à différentes concentrations molaires vis-à-vis le radical DPPH°.

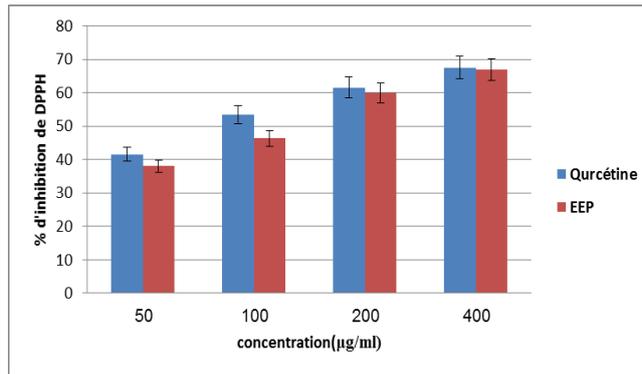


Figure 11 : Evaluation de l'activité anti-radicalaire de l'EEP de et de la quercétine à différentes concentrations vis-à-vis le radical libre DPPH°.

On se basant sur le pourcentage d'inhibition du DPPH°, on a évalué l'effet anti-radicalaire de l'extrait de la propolis aux concentrations 50, 100, 200, et 400 µg/ml, on a enregistré un effet antiradicalaire concentration dépendant, le même résultat est enregistré avec la quercétine.

Dans les concentrations 50 µg /ml et 100 µg /ml, l'EEP a donné un pouvoir antiradicalaire moins (38,05±5,26 %, 46,36±6,43% respectivement) que celui obtenu avec la quercétine (41,59±8,36 %, 53,42±15,55% respectivement). Cependant, à fortes concentrations (200 µg /ml et 400 µg /ml), l'EEP a donné un effet équivalent (59,09±5,11%, 66,88±11,97%) de celui de la quercétine (61,55±6,19% , 67.45±7,51%) respectivement.

Dans le but d'évaluer l'effet scavenger de l'EEP, nous avons utilisé une méthode basée sur la réduction du radical 1,1 diphenyle 2- picrylhydrazyl (DPPH°) et les résultats obtenus à propos de l'EEP sont en accord avec ceux déjà publiés .Corroborant, les propriétés anti-radicalaires de la quercétine sont dirigées contre les radicaux hydroxydes °OH et superoxydes O₂° qui sont des espèces impliquées dans le déclenchement de la peroxydation lipidique (Chen *et al.*,2004).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Maria *et al.*, 2002. Maria *et al.*, ont fait la comparaison de l'effet scavenger de la propolis collectée de différentes régions de l'argentine, et ont rapporté que l'extrait éthanolique de la propolis exprime d'une part un pouvoir scavenger remarquable qui reste d'autre part faible devant celui de la quercétine. La composition chimique de la propolis varie essentiellement avec la région de collection et par conséquent l'activité biologique (Lahouel *et al.*, 2009) .

II. Etude in vivo de l'effet antioxydant de la propolis

II.1. Les paramètres biochimiques

II.1.1. Dosage des paramètres biochimiques au niveau rénal, hépatique et cardiaque

Les résultats des paramètres sériques sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 05: Variation des taux sériques des biomarqueurs rénaux, hépatiques et cardiaques.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #: relatif au Cisplatine)

Paramètres	Urée g/l	Créatinine (mg/l)	Bilirubine totale (mg /l)	Bilirubine direct (mg /l)	Bilirubine indirect (mg /l)	
Groupes						
Témoin	0,52 \pm 0,02	5,72 \pm 0,17	2 \pm 0,91	1,7 \pm 1 ,04	0,20 \pm 0,26	
Cisplatine	2,82 \pm 0,11**	50,13 \pm 5,87***	2,73 \pm 0,66*	2,36 \pm 0,55*	0,35 \pm 0,05*	
Cisplatine +Quercétine	1,02 \pm 0,90*	10,81 \pm 7,90*	1 ,42 \pm 0,20*	1,23 \pm 0,15*	0,11 \pm 0,10*	
Cisplatine + propolis	0,66 \pm 0,43**	6,47 \pm 1 ,48	1,71 \pm 0,42*	1,43 \pm 0,40*	0,27 \pm 0,06*	
Paramètres	Phosphatase alcaline (UI/l)	CPK (UI/l)	LDH (UI/l)	Protéine totaux g/l	TGO (UI/l)	TGP (UI/l)
Groupes						
Témoin	103,3 \pm 40,41	2610 \pm 151,01	1701,33 \pm 502,125	151,33 \pm 4,16	307,33 \pm 93,08	68,33 \pm 2,52
Cisplatine	124 \pm 1*	2951,66 \pm 703,76*	2567,66 \pm 455,49*	100 \pm 5,77*	651,66 \pm 88,16**	111,66 \pm 25,92*
Cisplatine +Quercétine	61,66 \pm 26,72*	1813,66 \pm 1067,94	1465 \pm 374,23*	121,66 \pm 5,85*	246 \pm 86,74**	58,33 \pm 15,88*
Cisplatine + propolis	56 \pm 29,71*	1584,33 \pm 793,65*	1665 \pm 1022,45*	125 \pm 24,02*	215 \pm 69,15**	86,66 \pm 5,13*

L'injection d'une dose unique du CDDP (5mg/kg) a provoqué une forte augmentation ($P < 0,001$) du taux de l'urée et de la créatinine ($2,82 \pm 0,11$ g/l; $81,13 \pm 5,87$ mg/l respectivement) par rapport au groupe témoin. Cependant, le prétraitement par la propolis a révélé une diminution significative ($P < 0,01$) de l'urée et de la créatinine ($0,66 \pm 0,43$ g/l; $6,47 \pm 1,48$ mg/l respectivement) par rapport à celui mesuré chez le groupe recevant le CDDP seul ($2,82 \pm 0,11$ g/l; $81,13 \pm 5,87$ mg/l respectivement).

Pour l'activité enzymatique des transaminases et des PAL, on a constaté chez le groupe recevant le CDDP seul une augmentation remarquable de leurs concentrations (TGO : $651,66 \pm 88,16$ UI/l; TGP ; $111,66 \pm 25,92$ UI/l ; PA: 124 ± 1 UI/l respectivement) par rapport au groupe témoin (TGO : $307,33 \pm 93,08$ UI/l; TGP : $68,33 \pm 2,52$ UI/l; PA $103,3 \pm 40,41$ UI/l respectivement). Cependant le prétraitement par la propolis a amélioré fortement leurs concentrations.

On a enregistré une élévation significativement ($P < 0,05$) des taux sériques de LDH ($2567,66 \pm 455,49$ UI/l) et de CPK ($2951,66 \pm 703,76$ UI/l) chez les rats prétraités par le CDDP par rapport au groupe témoin. Cependant le prétraitement par la propolis a révélé une diminution ($P < 0,05$) de LDH ($1665 \pm 1022,45$ UI/l) et de CPK ($56 \pm 29,71$ UI/l) par rapport à celui mesuré chez le groupe recevant le CDDP seul.

On a remarqué une augmentation légère des taux de la bilirubine chez les rats traités par le CDDP (bilirubine totale $2, \pm 0,66$ mg/l ; bilirubine direct $1,7 \pm 0,55$ mg/l ; bilirubine indirect $0,2 \pm 0,05$ mg/l) par rapport au groupe témoin (bilirubine totale $2,7 \pm 0,91$ mg/l ; bilirubine direct $2,3 \pm 1,04$ mg/l ; bilirubine indirect $0,35 \pm 0,26$ mg/l. Le prétraitement par la propolis n'a pas révélé un changement par rapport au groupe CDDP.

Concernant le taux des protéines totales, on a enregistré un taux faible chez les rats traités par le CDDP qui est significativement amélioré chez les traités par la propolis et la quercétine.

En pathologie, une augmentation des taux sériques des transaminases, de la créatinine kinase, et de la LDH est due à des lésions hépatiques et myocardiques qui se manifestent par une augmentation de la destruction cellulaire normale ou une cytolyse pathologique des cellules cardiaque et (Westhuyzen *et al.*, 2012).

Nos résultats montrent une augmentation des taux sériques de LDH, CPK, et des transaminases chez les rats traités par le CDDP. L'élévation du LDH associée à l'élévation du CPK représente le premier indicateur de la myopathie. Cette élévation peut être attribué à l'altération des enzymes antioxydantes dans le tissu cardiaque après traitement par CDDP pour plusieurs raisons ; altération des acides nucléiques, dommage mitochondriaux et inhibition des enzymes.

Le prétraitement par l'extrait éthanolique de la propolis a atténué l'effet délétère de CDDP sur l'activité sérique de LDH, CPA, et transaminases en diminuant leurs activités ce qui prouve l'effet préventif de la propolis. Ces résultats sont en accord avec la littérature de (Lahouel *et al.*, 2004)

PAL est une enzyme généralement mesurée pour indiquer l'obstruction des canaux biliaires. Des niveaux élevés de PAL existent dans les cellules qui se divisent rapidement ou celle dans le métabolisme est active. Ces cellules comprennent l'épithélium des voies biliaires et du foie, granulocytes de la circulation sanguine, le tubule proximal du rein (Westhuyzen *et al.*, 2012; Herget *et al.*, 2004).

Dans cette étude le dysfonctionnement hépatique et rénal est confirmé chez le groupe traité par le CDDP par rapport au témoin. Cette augmentation de PAL attribuée à la fuite de ces enzymes du cytosol vers le sang suite à une élévation de la perméabilité membranaire des cellules hépatiques et rénales (Orabi *et al.*, 2013).

La Créatinine provient du catabolisme de la créatine d'origine musculaire. Elle est librement filtrée par le glomérule et constitue un bon marqueur endogène de la filtration glomérulaire. C'est une substance qui n'est pas réabsorbée et complètement excrétée par le rein et dont la sécrétion tubulaire ne dépasse pas le 1%.

L'urée est un composé organique augmente avec une situation de catabolisme ou un apport protéique important et qui baisse sous régime pauvre en protéines. L'urée est soumise à une réabsorption tubulaire importante, dépendant pour l'essentiel de la quantité d'eau libre présente dans le néphron, son excrétion est de plus irrégulière (Bunel, 2015).

Dans notre étude, le traitement par le CDDP a provoqué une néphrotoxicité. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par des études antérieures (Barrera *et al.*, 2003) ; Fatima et Mahmood, 2007 ; Pedraza-Chaverri *et al.*, 2008). Les résultats obtenus montrent clairement que le CDDP a entraîné une altération de la fonction rénale révélée par l'augmentation des niveaux de ses marqueurs dans le sérum (urée et créatinine) qui est probablement due à l'interaction du CDDP avec la membrane cellulaire conduisant à modifier sa perméabilité et à la perte de l'intégrité fonctionnelle du rein (Soudani *et al.*, 2010). Le prétraitement par la propolis a amélioré partiellement les effets toxiques induits par la CDDP. Des études précédentes avait démontré l'activité importante des extraits du propolis à lutter contre le stress oxydant et a piéger les radicaux libres (Ajith *et al.*, 2007 ; Masuda *et al.*, 2004).

II.2. Dosages tissulaires

II.2.1. Dosage des paramètres du stress oxydant dans le tissu rénal

II.2.1.1. Evaluation de la peroxydation lipidique (MDA)

Les premières cibles des ROS sont des lipides, notamment se présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leurs degré élevé d'insaturation (Pamplona *et al.*, 2000 ; Hulbert, 2005) .

L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux même très réactifs. Elle fournit également une grande variété de produits qui servent comme marqueurs de la peroxydation lipidique dont le MDA qui est le plus utilisé (Echtay *et al.* , 2003).

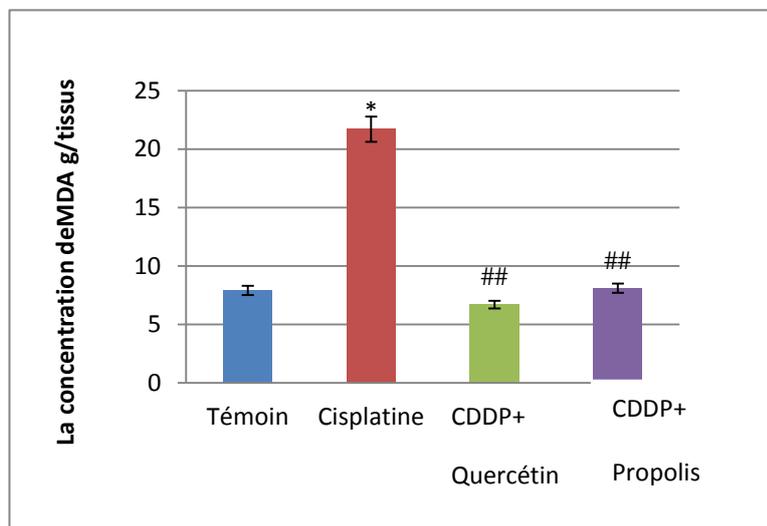


Figure 12 : Variations des concentrations en MDA dans le tissu rénal.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #: relatif au Cisplatine)

Pour évaluer la toxicité du CDDP, après 5 jours de l'injection d'une dose de 5mg/Kg par voie IP, on a essayé d'étudier le taux de MDA. Nos résultats ont montré clairement une élévation significative du MDA, ce qui explique alors le lien entre l'administration du CDDP et la lipoperoxydation, et par conséquent les dégâts au niveau des tissus par la formation excessive des radicaux libres.

D'après les résultats obtenus et qui sont illustrés dans la (figure11), nous avons constaté une élévation significative ($P < 0,05$) du taux de MDA chez les rats recevant le CDDP ($21,73 \pm 3,82$ nmol/mg) par rapport au groupe témoin ($7,96 \pm 1,59$ nmol/mg).

Par contre une diminution hautement significative ($P < 0.01$) du taux du MDA a été constatée chez le lot traité par la quercétine et le CDDP ($6,73 \pm 1,30$ nmol/mg) par rapport au lot traité par le CDDP seul ($21,73 \pm 3,82$ nmol/mg).

Cependant, il se trouve diminué de façon hautement significative ($P < 0,01$) dans le groupe d'animaux prétraités par l'extrait de la propolis ($8,16 \pm 2,02$ nmol/mg), qui semble apporter une protection des cellules rénales contre la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres formés par le CDDP.

Plusieurs études ont suggéré qu'une seule injection de CDDP à des doses de 5-10 mg / kg de poids corporel chez le rat provoque une réduction marquée du taux de filtration glomérulaire, En outre, le traitement entraîne une augmentation significative des niveaux rénaux de MDA par rapport au niveau témoin. Certains chercheurs ont signalé qu'il existe une association entre le MDA et la toxicité rénale aiguë induite par le CDDP, cette toxicité implique activement le stress oxydatif (Iraz *et al.*, 2006). Les composants cellulaires y compris les lipides, les protéines et l'ADN, sont directement affectés par les ROS (Hosseinzadeh *et al.*, 2005). Les radicaux libres produits par l'administration du CDDP endommagent les composants lipidiques de la membrane cellulaire par peroxydation et dénaturent les protéines conduisant à une inactivation enzymatiques.

Dans la présente étude, le prétraitement avec la propolis a inhibé l'augmentation de la peroxydation lipidique induite par le CDDP dans le tissu rénal. Le mécanisme moléculaire responsable de ces effets reste largement inconnu, mais son action fixatrice efficace à la fois de l'anion hydroxyle et de l'anion superoxyde peut être impliquée. Ces résultats sont conformes à ceux publiés (Ateşşahin *et al.*, 2007). Donc la supplémentation en propolis diminue l'incidence et la sévérité de la néphrotoxicité (Atessahin *et al.*, 2005).

II.2.1.2. Evaluation du taux de GSH cytosolique

Le GSH est un antioxydant non enzymatique, constitue la première ligne de défense contre les ROS, c'est un tri-peptide dont la concentration intracellulaire est importante puisqu' elle est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} mol/L. La fonction thiol qu'il porte lui confère un rôle antioxydant qu'il exerce vis-à-vis de nombreuses espèces oxygénées, en particulier vis-à-vis de l'eau oxygénée et des radicaux hydroxyles (Raja *et al.*, 2007) .

Les résultats de l'évaluation des concentrations de GSH dans le tissu rénal dans les différents groupes sont illustrés dans la figure ci-dessous :

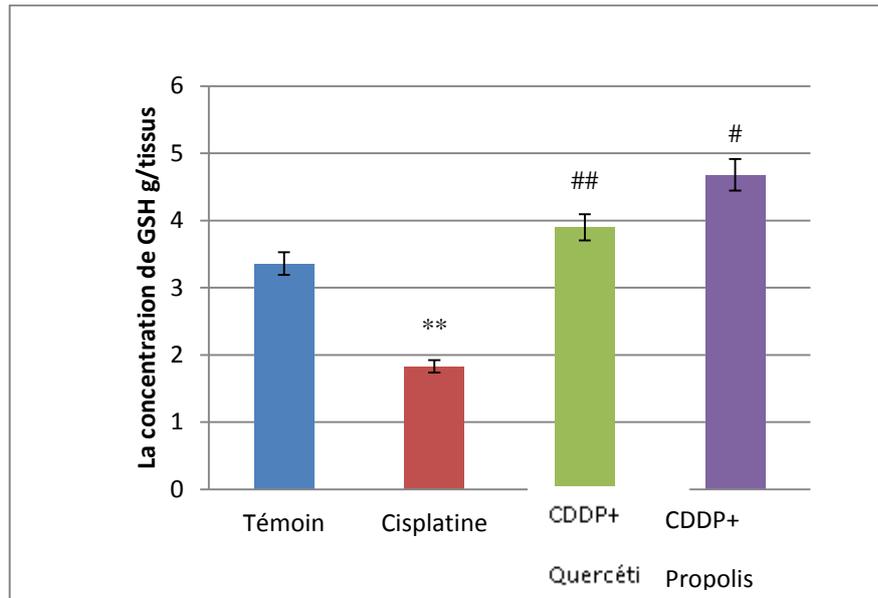


Figure 13: Variation de taux de GSH dans le tissu rénal.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #:relatif au Cisplatine)

Notre étude a montré une baisse hautement significative ($P < 0.01$) du taux de GSH rénal chez le groupe recevant le CDDP ($1,83 \pm 0,34$ mM) par rapport au groupe témoin ($3,36 \pm 0,47$ mM).

Chez les rats prétraités par l'extrait de la propolis pendant 8 jours avant l'administration du cisplatine on a enregistré une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) de GSH ($4,68 \pm 1,04$ mM) par rapport au groupe recevant le CDDP ($1,83 \pm 0,34$ mM).

Par contre une augmentation significative ($P < 0.05$) de glutathion réduit (GSH) est constatée chez les rats prétraités par la quercétine ($3,9 \pm 0,60$ mM) par rapport au groupe recevant le CDDP seul ($1,83 \pm 0,34$ mM).

Le GSH joue un rôle multifactoriel dans le mécanisme de défense antioxydante, c'est un piègeur direct des radicaux libres, un Co-substrat nécessaire pour l'activité de la GST. Par conséquent, les changements de l'état redox du GSH peuvent être considérés comme un indicateur particulièrement sensible du stress oxydant (Raja *et al.*, 2007). La diminution du taux de GSH chez le groupe (CDDP) par rapport au groupe témoin est due semble-t-il à une diminution du renouvellement du GSH par le GPX. Par contre, le prétraitement par la propolis stimule la régénération de GSH à partir de GSSG. Nos résultats sont en accord avec ceux Stahl *et al.* (2003), Sueish *et al.* (2008). Mustafa *et al.* (2006) qui a examiné l'effet protectif de l'acide caffeique sur la toxicité induite par le CDDP. De plus, le GSH est un substrat chef pour les enzymes antioxydants, sa diminution peut être liée à sa consommation accrue par ces enzymes (Zhou *et al.*, 2001). Cet effet montre sans doute

le pouvoir protecteur de la propolis en général. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Bengadouer *et al.*, 2014).

II.2.1.3. L'évaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

II.2.1.3.1. Evaluation de l'activité cytosolique de la GST

Le GST est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes, ces enzymes sont très importantes dans la protection des cellules contre les espèces réactives de l'oxygène (Renuka *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus de dosage de GST dans le tissu rénal sont illustrés dans la figure (13).

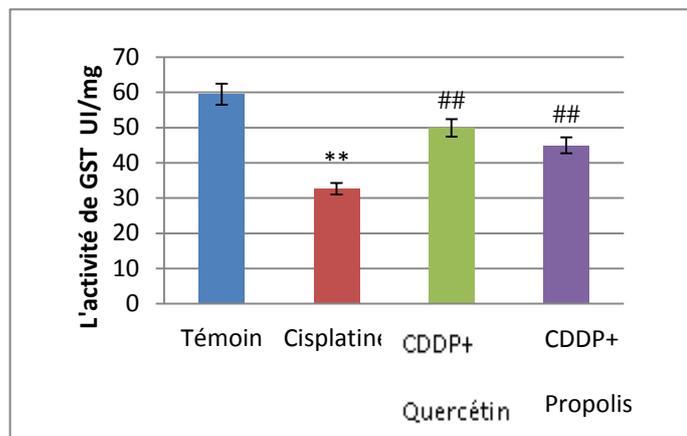


Figure14 : Variation de l'activité de la GST dans le tissu rénal.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #:relatif au Cisplatine)

L'activité de la GST diminue de façon hautement significative ($P < 0,01$) chez le groupe de rats recevant le CDDP seul ($32,77 \pm 1,07$ UI/mg) par apport au groupe témoin ($59,58 \pm 8,15$ UI/mg). Le prétraitement par la quercétine a donné une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) de l'activité de GST ($49,96 \pm 3,47$ UI/mg) par apport au groupe recevant le CDDP seul ($32,77 \pm 1,07$ UI/mg).

Le groupe prétraité par la propolis a marqué une augmentation hautement significative $P < 0,01$ de l'activité de GST ($45,02 \pm 1,35$ UI/mg) par apport au groupe recevant le CDDP seul ($32,77 \pm 1,07$ UI/mg).

II.2.1.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT

Le peroxyde dihydrogène produit par la SOD est ensuite éliminé par une transformation en H_2O . La figure ci- dessous illustre l'activité enzymatique de la CAT chez les différents groupes.

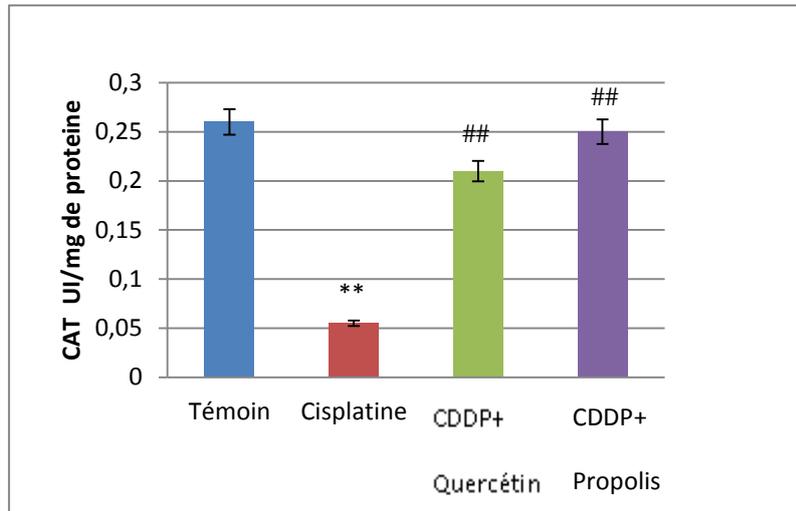


Figure15 : Variation de l'activité de la catalase dans le tissu rénal.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #: relatif au Cisplatine)

Une diminution hautement significative ($P < 0,01$) est enregistrée chez le groupe de rats recevant le CDDP seul ($0,05 \pm 0,03$ UI/mg) par rapport à celle mesurée chez le groupe témoin ($0,26 \pm 0,05$ UI/mg). La mesure de l'activité de la CAT chez le groupe des rats prétraité par la quercétine a montré une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) du ($0,21 \pm 0,01$ UI/mg) par rapport au groupe recevant le CDDP seul ($0,05 \pm 0,03$ UI/mg)

Le prétraitement des rats par la propolis a entraîné une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) de l'activité de la CAT ($0,21 \pm 0,09$ UI/mg) par rapport au groupe recevant le CDDP seul ($0,05 \pm 0,03$ UI/mg). Puisque le CDDP est connu pour provoquer un stress oxydant dans les cellules rénales par l'inhibition du système de défense des enzymes antioxydantes, la glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la CAT constituent mutuellement une équipe de soutien de défense contre les ROS (Soliman *et al.*, 2010 ; Soudani *et al.*, 2011). Des petites déviations dans leurs concentrations physiologiques pourraient avoir des effets considérables sur la résistance des lipides cellulaires, des protéines et de l'ADN aux dommages oxydatifs induits par le CDDP (Bagchi *et al.*, 2002). Nos résultats ont montré une diminution de l'activité de la CAT rénale et de l'activité de la GST chez les rats traités par le CDDP (5 mg/kg). La diminution des activités de la CAT dans notre étude peut être due à son inhibition causée par l'accumulation intracellulaire des ROS, la même explication a été donnée par Kalayarasan *et al.* (2008). Selon Pigeolet *et al.* (1990), la diminution de l'activité enzymatique de la catalase peut refléter une réduction de la capacité des mitochondries et des microsomes d'éliminer le H_2O_2 . Les GST forment une famille d'enzymes cytoplasmiques présentes dans les cellules du tubule proximal (a-GST) ou distal (p-GST). La

diminution enregistrée de l'activité de la GST chez le groupe recevant le CDDP prouve une surproduction des ROS en aboutissant à une atteinte rénale aigue. La consommation de GSH par la GST peut être aussi explicative de cette diminution, et quand il y a augmentation de sa consommation dans le but de détoxifier les molécules toxique, son taux va diminuer et l'enzyme souffre des carences on GSH qui se manifeste par une diminution de son activité (Hossam *et al.*, 2005).

Nous avons observé une restauration des activités des enzymes antioxydantes chez les rats traités par le CDDP et retraités par la propolis ce qui suggère l'effet protecteur de cette source polyphénolique contre les dommages oxydatifs induits par le CDDP. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Kalayarasan *et al.* (2008) qui a examiné l'effet de l'acide ellagique sur la néphrotoxicité de CDDP.

II.2.2. Dosage des paramètres du stress oxydant dans le tissu hépatique

II.2.2.1. Evaluation de la peroxydation lipidique (MDA)

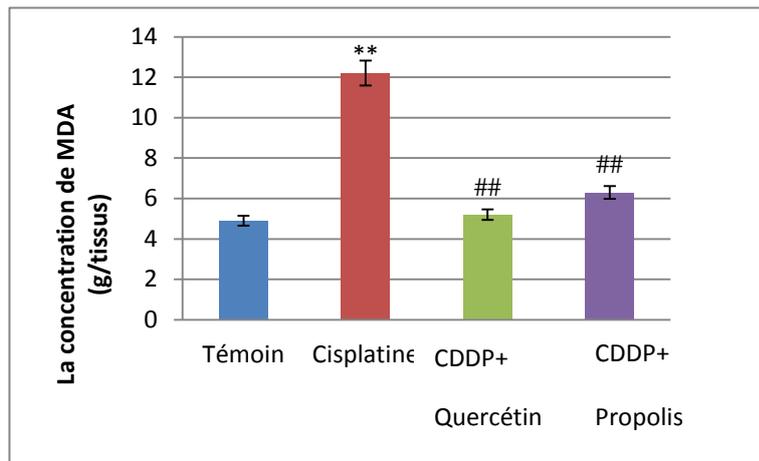


Figure16 : Variations des concentrations tissulaires en MDA dans le tissu hépatique.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #:relatif au Cisplatine)

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté une élévation hautement significative ($P < 0,01$) du taux de MDA chez les rats recevant le CDDP ($12,21 \pm 1,68 \text{ nmol/mg}$) par rapport au groupe témoin ($4,90 \pm 2,007 \text{ nmol/mg}$).

Par contre une diminution hautement significative ($P < 0.01$) du taux du MDA a été constatée chez le lot prétraité par la quercétine ($5,26 \pm 2,003 \text{ nmol/mg}$) et le lot prétraité par la propolis ($6,33 \pm 1,15 \text{ nmol/mg}$) en comparant avec le lot traité par le CDDP seul ($12,21 \pm 1,68 \text{ nmol/mg}$)

La peroxydation lipidique contient une série de réaction radicalaires en chaîne et est également associée à plusieurs types de dommages biologiques (Kuhlmann *et al.*, 1997; Antunes *et al.*, 2000). Dans diverses recherches qui ont étudiés l'effet du stress oxydant au niveau des tissus, les peroxydes lipidiques sont signalés à augmenter, ils sont formés par l'attaque des radicaux libres sur les résidus d'acides gras polyinsaturés produisant finalement le malondialdéhyde mutagène et cancérigène (Scibior *et al.*, 2013).

Dans notre étude, nous avons noté une augmentation des niveaux du MDA hépatique après l'administration de CDDP, ce dernier génère les ROS, comme l'anion superoxyde et les radicaux hydroxyles et stimule la peroxydation lipidique. Cela conduit à des dommages oxydatifs des composants cellulaires. Les mêmes résultats ont été obtenus par Soudani *et al.* (2011) sur hépatotoxicité de CDDP .

Cependant, le traitement par la propolis pourrait empêcher l'altération induite par le CDDP probablement par élimination des toxiques à partir du corps, empêchant ainsi la poursuite des dommages provoqués par cet anticancéreux. La présence des polyphénols et des flavonoïdes dans la propolis pourrait être responsable de l'activité antioxydante et hépatoprotectrice (Ajith *et al.*, 2007).

II.2.2.2. Evaluation du taux de GSH cytosolique

Les résultats de l'évaluation des concentrations de GSH dans le tissu hépatique dans les différents groupes sont illustrés dans la figure ci-dessous

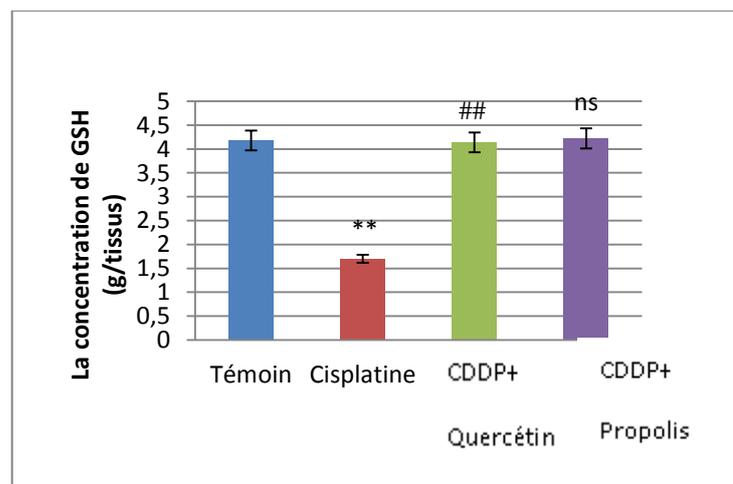


Figure17 : Variation des taux de GSH dans le tissu hépatique.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #: relatif au Cisplatine)

Notre étude a montré une baisse hautement significative ($P < 0.01$) du taux de GSH du tissu hépatique chez le groupe recevant le CDDP seul ($1,7 \pm 0,67$ mM) par rapport au groupe témoin ($4,18 \pm 1,35$ mM),

Chez les rats prétraités par l'extrait de la propolis on a enregistré une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) de GSH ($4,22 \pm 1,76$ mM) par rapport au groupe CDDP seul ($1,7 \pm 0,67$ mM).

Par contre une augmentation non significative ($P > 0,05$) de glutathion réduit (GSH) est constatée chez les rats prétraités par la quercétine ($4,14 \pm 0,89$ mM) par rapport au groupe recevant le CDDP seul ($1,7 \pm 0,67$ mM).

Le stress oxydant dans les cellules ou les tissus se réfère à renforcer la production d'espèces réactives de l'oxygène, les ROS générés sont efficacement piégés par le système enzymatique antioxydant comme la GPx et la GR, ainsi que les antioxydants non enzymatiques comme le GSH, la vitamine A, C et E (Schlorff *et al.*, 1999). Le GSH est le plus abondant thiol de basse masse moléculaire crucial du mécanisme de défense antioxydante, fonctionne comme un capteur de radicaux libres réactifs direct (Romão *et al.*, 2006).

Dans notre étude expérimentale, les résultats montrent une diminution des niveaux de glutathion chez les rats traités par le CDDP. Le traitement des rats par la propolis suivi par le CDDP a montré une amélioration importante où le taux de GSH revient presque à la normale. La déplétion du taux de GSH hépatique est expliquée par la participation du foie, à l'élimination des peroxydes lipidiques et des électrophiles responsables des dommages tissulaire (Saka *et al.*, 2002) ou de sa consommation dans le processus de piégeage des radicaux libres produits par le CDDP (Bagchi *et al.*, 1995 ; Gunaratnam et Grant, 2008). Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par (Sarwat *et al.*, 2012).

Il est évident que la propolis donné en prévention, semble jouer un rôle clé dans l'atténuation des dommages du stress oxydant en diminuant la peroxydation des lipides, augmentant les niveaux du GSH et maintenant les taux normaux des enzymes antioxydantes, ces résultats sont similaire à ceux des auteurs Naghizadeh *et al.*(2008), Verna *et al.*(2006) qui ont étudié l'effet de gengembre sur la toxicité hépatique et cardiaque.

II.2.2.3. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

II.2.2.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la GST cytosolique

Les résultats obtenus de dosage de GST dans le tissu hépatique sont illustrés dans la figure ci-dessous :

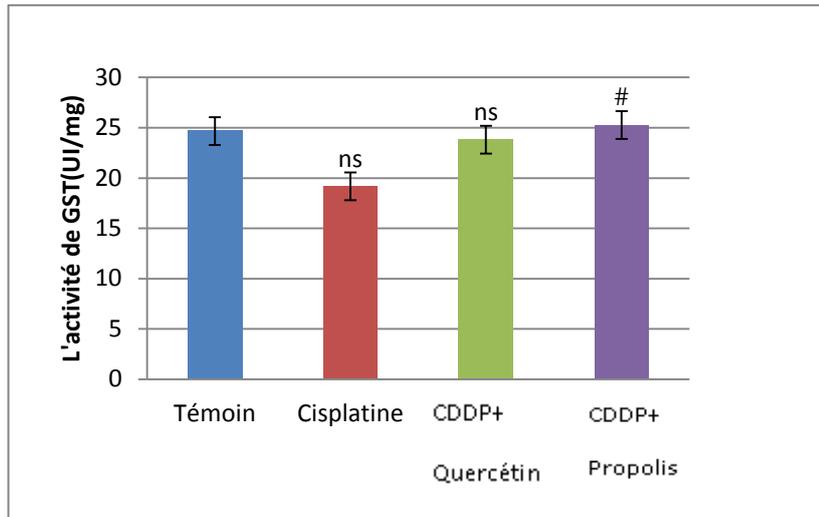


Figure 18 : Variation de L'activité de GST dans le tissu hépatique.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #:relatif au Cisplatine)

L'activité de la GST présente une diminution non significative ($P > 0,05$) chez le groupe de rats recevant le CDDP seul ($17,31 \pm 1,50$ UI/mg) par apport au groupe témoin ($24,68 \pm 4,41$ UI/mg).

Le prétraitement des rats par la quercétine a donné une diminution non significative ($P > 0,05$) de l'activité de la GST ($23,80 \pm 3,87 \pm$ UI/mg) par apport au groupe CDDP seul ($19,19 \pm 3,01$ UI/mg)

Cependant, le groupe prétraité par la propolis a marqué une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'activité de la GST ($23,12 \pm 1,18 \pm$ UI/mg) par apport au groupe recevant le CDDP seul ($19,19 \pm 3,01$ UI/mg).

II.2.2.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT

Les résultats de l'activité enzymatique de la CAT chez les différents groupes sont représentés dans la figure suivante :

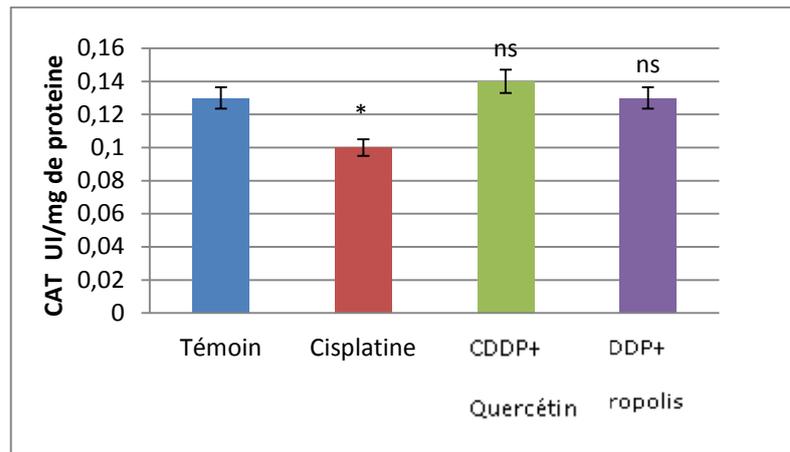


Figure 19 : Variation de l'activité de CAT dans le tissu hépatique.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0,05$ représente une différence significative, (**) $p < 0,01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0,001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #:relatif au Cisplatine)

Une diminution significative ($P < 0,05$) est enregistrée chez le groupe de rats recevant le CDDP seul ($0,08 \pm 0,01$ UI/mg) par apport à celle mesurée chez le groupe témoin ($13 \pm 0,02$ UI/mg).

La mesure de l'activité de la CAT chez le groupe des rats prétraité par la quercétine a montré une augmentation non significative ($0,14 \pm 0,12$ UI/mg) par apport au groupe recevant le CDDP seul ($0,08 \pm 0,01$ UI/mg)

Par contre, le prétraitement par la propolis a entraîné une augmentation non significative ($P > 0,05$) de l'activité de la CAT ($0,13 \pm 0,13$ UI/mg) par apport au groupe recevant le CDDP seul ($0,08 \pm 0,01$ UI/mg).

La CAT et la GST protègent les cellules contre les ROS. Dans cette étude, une diminution des activités de ces antioxydants clés ont été trouvés dans le tissu hépatique. L'augmentation du MDA dans le foie des rats traités par le CDDP peut être liée à une diminution de l'activité de la CAT qui catalyse l'élimination du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Emre *et al.* (2014) qui ont examiné l'effet de quercétine comme un flavonoïdes sur la diminution de stress oxydant induit par le CDDP. Le GSH joue un rôle important dans la neutralisation et la détoxification des xénobiotiques catalysées par la GST qui a présenté des taux hépatiques normaux (phénomène de détoxification) (El-shenawy, 2010).

II.2.3. Dosage des paramètres de stress dans le tissu cardiaque

II.2.3.1. Evaluation du taux de peroxydation lipidique MDA

D'après les résultats obtenus et qui sont illustrés ci-dessous:

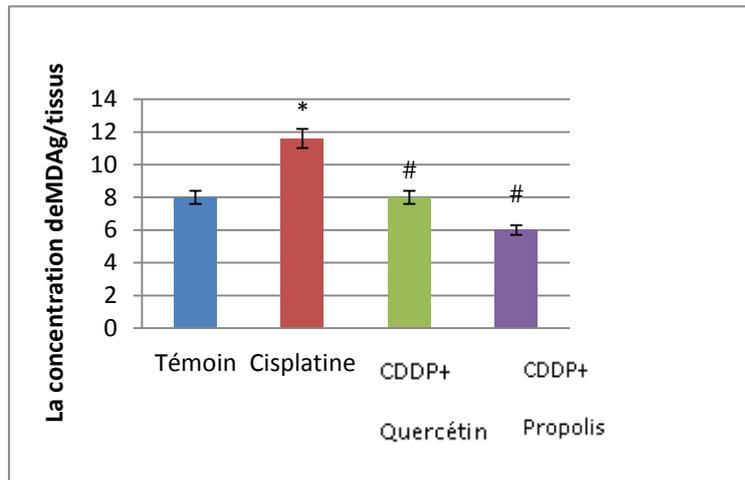


Figure 20: Variations des concentrations tissulaires en MDA dans le tissu cardiaque.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #:relatif au Cisplatine)

Nous avons constaté une variation significative ($P < 0,05$) du taux de MDA chez les rats recevant de CDDP ($11,66 \pm 0,57$ nmol/mg) par rapport au groupe témoin ($10,66 \pm 2,08$ nmol/mg)

Par contre une diminution non significative ($P > 0,05$) du taux du MDA a été constatée chez le lot prétraité par la quercétine et le CDDP ($8,66 \pm 0,47$ nmol/mg) contre au lot traité par le CDDP seul ($11,66 \pm 0,57$ nmol/mg).

Quant à, il se trouve une diminution de façon significative ($P < 0,05$) dans le groupe d'animaux prétraité par l'extrait de la propolis ($6,33 \pm 0,57$ nmol/mg) contre au lot traité par le CDDP seul ($11,66 \pm 0,57$ nmol/mg).

II.2.3.2. Evaluation du taux de GSH cytosolique

Les résultats de l'évaluation des concentrations de GSH dans le tissu cardiaque dans les différents groupes sont illustrés dans la figure ci-dessous :

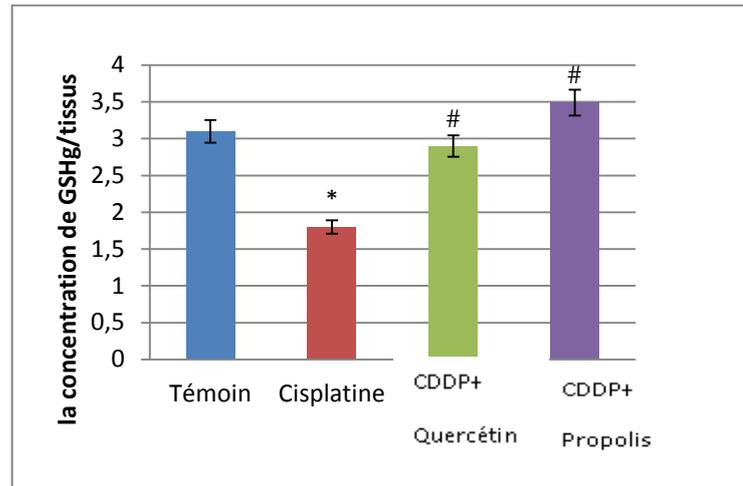


Figure 21 : Variation de taux de GSH dans le tissu cardiaque.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #:relatif au Cisplatine)

Notre étude a montré une diminution significative ($P < 0.05$) du taux de GSH du tissu cardiaque chez le groupe recevant le CDDP ($1,7 \pm 0,26$ mM) par rapport au groupe témoin ($3,16 \pm 0,45$ mM).

Une augmentation significative ($P < 0.05$) de glutathion réduit (GSH) est constatée chez les rats recevant le CDDP et prétraités par la quercétine ($2,8 \pm 0,03$ mM) par rapport au groupe recevant le CDDP seul ($1,7 \pm 0,26$ mM).

Chez les rats prétraités par l'extrait de la propolis pendant 8 jours avant l'administration de CDDP, on a enregistré une augmentation significative ($P < 0.05$) de GSH ($3,49 \pm 1,41$ mM) par rapport au groupe réservant le CDDP ($1,7 \pm 0,26$ mM).

II.2.3.3. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydant

II.2.3.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la GST

Les résultats obtenus de dosage de GST dans le tissu cardiaque sont illustrés dans la figure ci-dessous :

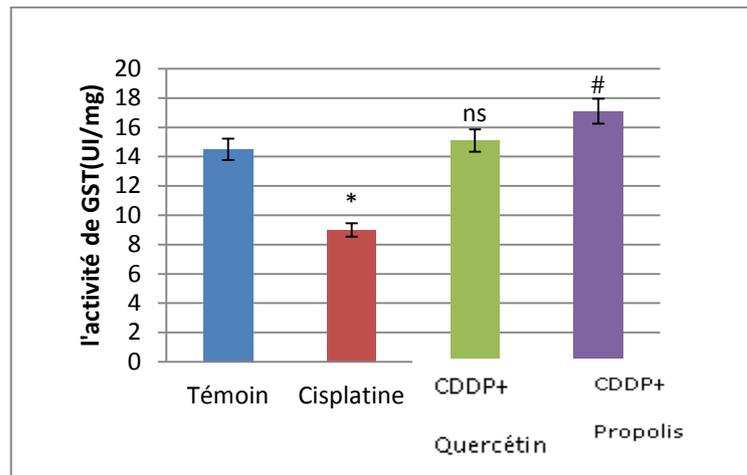


Figure 22: Variation de L'activité de GST dans le tissu cardiaque.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0.05$ représente une différence significative, (**) $p < 0.01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0.001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #:relatif au Cisplatine)

L'activité de la GST a diminué significativement ($P < 0,05$) chez le groupe de rats recevant le CDDP seul ($9,1 \pm 1,52$ UI/mg) par apport au groupe témoin ($14,51 \pm 0,68$ UI/mg).

Le prétraitement d'un groupe des rats par la quercétine a donné une augmentation non significative ($P > 0,05$) de l'activité de GST ($15,09 \pm 1,18$ UI/mg) par apport au groupe recevant le CDDP seul ($9,1 \pm 1,52$ UI/mg).

Cependant, le groupe prétraité par la propolis a marqué une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'activité de GST ($17,12 \pm 1,4$ UI/mg) par apport au groupe recevant le CDDP seul ($9,1 \pm 1,52$ UI/mg).

II.2.3.3.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la CAT

Les résultats de l'activité enzymatique de la CAT chez les différents groupes sont représentés dans la figure suivante :

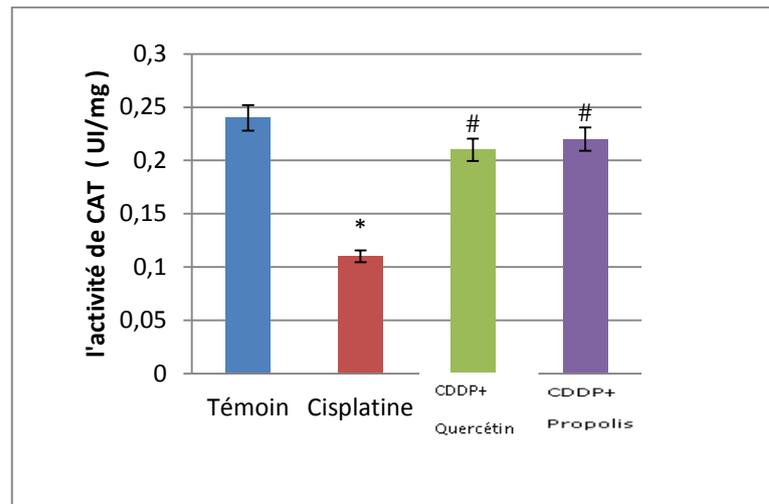


Figure 23: Variation de l'activité de CAT dans le tissu cardiaque.

Les valeurs sont données en moyenne \pm Ecartype. Test de student : (*) $p < 0,05$ représente une différence significative, (**) $p < 0,01$ représente une différence hautement significative et (***) $p < 0,001$ représente une différence très hautement significative. (*: relatif au témoin, #: relatif au Cisplatine)

Une diminution significative ($P < 0,05$) est enregistrée chez le groupe de rats recevant le CDDP seul ($0,23 \pm 0,07$ UL/mg) par rapport à celle mesurée chez le groupe témoin ($0,21 \pm 0,15$ UI/mg).

La mesure de l'activité de la CAT chez le groupe des rats prétraité par la quercétine a montré une augmentation significative ($P < 0,05$) du ($0,19 \pm 0,10$ UI/mg) par rapport au groupe recevant le CDDP seul ($0,21 \pm 0,15$ UI/mg).

Le prétraitement d'un groupe des rats par la propolis a marqué une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'activité de CAT ($0,23 \pm 0,07$ UI/mg) par rapport au groupe recevant le CDDP seul ($0,21 \pm 0,15$ UI/mg)

Dans cette présent étude, les résultats ont montré une augmentation de MDA dans le tissu cardiaque. Le développement d'un stress oxydant induit par le CDDP peut expliquer cette peroxydation lipidique. Cette sensibilité au CDDP est liée a un déficit relatif des défenses antioxydantes des myocytes cardiaques et l'abondance des mitochondrie qui sont très riches on lipides polyinsaturés, cible direct des ROS (Carvalo *et al.*, 2014).

Le prétraitement par la propolis ou la quercétine a diminué le taux de MDA ce ci prouve que la propolis ou la quercétine semblent apporter une protection contre la cardiotoxicité. Ces résultats sont en accord a ceux des auteurs (Fadillioglu *et al.*, 2003 ; Ateşşahin *et al.*, 2006) .

Des études ont montré une diminution des niveaux de GSH cardiaque après traitement par le CDDP. Toutefois, dans la présente étude le GSH cardiaque a diminué par rapport au groupe témoin. Cet état peut être expliqué par le fait que la synthèse du GSH a été inhibée dans les

myocytes exposées au stress oxydatif. Tian *et al.*, (2001) ont suggéré que dans des conditions de stress oxydatif fort, il peut y avoir une inhibition des enzymes régulant la biosynthèse du GSH et par la suite du cycle oxydoréductase modulée par les enzymes antioxydantes, notamment les GPX qui régénèrent le GSSG au GSH. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Martinis *et al.* (2001) qui ont examiné la toxicité cardiaque de CDDP chez sur un modèle de rats.

La diminution de l'activité enzymatique de la CAT et de la GST peut être due à l'excès de l'anion superoxyde suite à une réduction de l'activité de la SOD (Houssam *et al.*, 2005) ou à une carence en NADPH au cours du stress oxydatif induit par l'exposition au CDDP chez les rats traités, sachant que le NADPH est nécessaire pour l'activation de la CAT. Nos résultats sont corroborés par ceux d'El-shenawy (2010) qui a démontré une diminution de la GST après une exposition au CDDP due au fait que les myocytes sont cibles au stress oxydant induit par les ROS (Pietta *et al.*, 2000).

Le prétraitement par la propolis a restauré l'activité des enzymes antioxydantes cardiaques grâce à sa richesse en polyphénols. Les résultats sont en accord avec ceux de Linares *et al.* (2008) qui ont examiné l'effet d'acide ellagique sur la toxicité cardiaque du CDDP.

Conclusion

Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que le traitement par le cisplatine a induit une toxicité rénale ainsi qu'une toxicité hépatique et 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 au système antioxydant enzymatique et non enzymatique avec augmentation de la peroxydation lipidique. Cela conduit à des altérations au niveau tissulaires.

Le prétraitement par l'EEP a réduit remarquablement la toxicité du cisplatine par amélioration des taux des paramètres sériques, renforcement du système antioxydant enzymatique et non enzymatique 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 apprécier le mécanisme de la toxicité du cisplatine et pour mieux comprendre l'effet protecteur des polyphénols de la propolis.

Liste des références

List des références

- Abdullah** Ozkoket Charles L. Edelstein .Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury.*Hindawi Publishing Corporation*.**2014**; 10.1155.
- Akbas SH**, Yegin A, Ozben T. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues.*ClinBiochem*, 2Naghizadeh B., Boroushaki, M T., Mashhadian N V. and TaghiMansouri S M., Protective Effects of Crocin against Cisplatin Induced Acute Renal Failure and Oxidative Stress in Rats. *Iranian Biomedical Journal*, **2008**.12 (2): 93-100. 005 ; 38(11) : 1009-14
- Altuntas A**, Yilmaz HR, AltuntasA,Uz E, Demir M, Gokcimen A, Aksu O, DilekSenolBayram D et TugrulSazerM.Caffeic Acid Phenethyl E ster Protects against Amphotericin B Induced Nephrotoxicity in Rat Model . *Biomed.Res .Int*. **2014**; 2014:8.
- Alyane M**, Kebsa w, Benguedouar L, BoussananeHn, Rouibeh H, Lahouel M,.Cardioprotective effects and mecanism of action of polyphénols extracted from propolis -against doxorubicin toxicity .*Pak J Pharm Sel*. **2008**; 21(3) : 201-209 .
- Atessahin A**, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A .Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*.**2005**; 212, 116-23.
- Ateşşahin A**, Şahna E, Türk G et al. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats.*J Pineal Res*. **2006**;41:21–7.
- Bagchi D**, Hassoun EA, Bagchi M, Muldoon D, Stohs SJ. Oxidative stress induced by chronic administration of sodium dichromate (Cr VI) to rats. *Comp Biochem Physiol*. **1995**;110C:281–287.
- Bagchi D**¹, Bagchi M, Stohs Sj, Ray SD, Sen CK, Preuss HG,Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci*.**2002**; ;957:260-70
- Bahorun T** , Gressier B, Trotin F ,Brunet C, Dine T ,Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, LuyckyM,Gazin M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations .*Arzneimittel – Forschung* .**1996**;46:1086- 1089.
- Bankova V**, De Castro S. L, Marcucci M. C .Propolis : recent advances in chemistry and plant origin,. *Apidologie* .**2000**;31: 3-15.
- Barrera, S.** & Valenzuela, L..Construction Evaluation of a Sand Dam of Great Height.Symposium on Major Challenges in Tailings Dams, CIGB-ICOLD.*June, Montreal, Canada*. 2003.
- Benguedouar L**, BoussenaneH.N,Kebsa W, Alyane M, RouibahH and Lahouel M. Efficiency ofpropolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats .*indian j exp boil* .**2008**; 46:122-119.
- Boizot N**, Charpentier JP. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organsd'un arbre forestier.*Le Cahier des Techniques de l'Inra* .**2006** ;79 -82.

- Borrelli F**, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasson F, Ienti A . Phytochemical compounds involved in the anti- inflammatory effect of propolis extract. *Filtoterapia.*, **2002**;73:53-63.
- Bouayed J**, BOHN T. Exogenous antioxidants–Double-edged swords in cellular
- Boutabet K**, Kebsa W, Alyane M, Lahouel M. Polyphenolic fraction of algrian propolis protects rat Kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian J Nephrol.* **2011**;2 :101-106.
- Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of orotein – dye binding. *Anal biochem.* **1976**; 72:248-254.
- Brand WW**, Cuveleir M, Berset C, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie .*Food Science and Technology.* **1995**;28 :25-30.
- Bruneton J**. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales, 4 Ed, Éditions médicales internationales , Paris. **2009** ;1288.
- Bruneton J**. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} éd, Paris : Editions médicales internationales .*édition Tes & Doc Lavoisier.* **1999** ; pp 1120.
- Bunel V** . Recherche de nouvelles substances naturelles d'intérêt dans la prévention de la fibrose rénale d'origine médicamenteuse. université de brouxel . **2015** .
- Cao, L.M.D.**; Joshi, P.M.D.; Sumoza, D.M.D. Renal salt-wasting syndrome in a patient with cisplatin-induced hyponatremia: Case report. *Am. J. Clin. Oncol.* **2002**;25, 344–346.
- Cardinault N**, Cayeux M-O, Percie P . La propolis : origine , composition et propriétés. *Phytothérapie* . **2012** ;10 :298-304.
- Carvalho FS**, Burgeiro A, Garcia R, Morino AJ, Carvalho RA and Oliveira PJ. doxorubicin induced failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* **2014**; 34(1) :106-135.
- Chen CN**, Weng MS, Wu CL, and Lin JK. Comparison of radical scavenging activity , cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources . *Ecam.* **2004** ;1 :175-85
- Chen G**, Huynh M, Fehrenbacher L, West H, Lara PN Jr. Yavorkovsky LL, Russin M, Goldstein D, Gandara D, Lau D. Phase II trial of irinotecan and carboplatin for extensive or relapsed small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2009**; 27:1401–1404.
- Chirino Y.I.**, PEDRAZA-CHAVERRI J Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin induced nephrotoxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology.* **2009**;61, 223–242
- Cilenti, L.**; Kyriazis, G.A.; Soundarapandian, M.M.; Stratico, V.; Yerkes, A.; Park, K.M.. Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2003**;14, 1–10.- B. cisplatin-induced cell death in renal cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2005**; 288, F371–F379.
- Clairborne A** . Catalase activity , In: Greenwald R.A. (Ed), CRC handbook of methods for oxygen radical research . *CRC Press Boca Raton FL.* **1985** ;p:190-198.

- Collin S**, Callemien D et Nizet S. Extraction et analyse des polyphénols In: polyphénols et procédés (Collin S et Crouzet J) . *Lavoisier* .**2011**;P :55-60.
- Corinne Isnard-Bagnis a**, Bruno Moulin b, Vincent Launay-Vacher a, Hassan Izzedine a, Isabelle Tostivint a, Gilbert Deray a. Toxicité rénale des anticancéreux .*Néphrologie&Thérapeutique* **2005**;101–114
- Cullen, K.J.**; Yang, Z.; Schumaker, L.; Guo, Z. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer.*J.Bioenerg. Biomembr.***2007**; 39, 43–50.
- D’Archivio M**, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*.**2007**;43:348-361.
- Daleprane J.B** and Abdalla D.S. Emerging Role of Propolis :Antioxidant ,Cardioprotective , and Antiangiogenic Actions .*Evid-Based Compl Alt* .**2013**;8:135-175.
- Dasari S** , Tchounwou B P. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, **2014**; 0: 364–378.
- De Martinis BS**, Bianchi MD. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats.*Pharmacol Res* **2001**;44:317–20.
- Del Rio D**, Costa L, Lean M, Crozier A, Polyphenols and health : What compounds are involved?.*Nut.Met.Cardio.D*.**2009**;20:1-6.
- Desoize, B.**; Madoulet, C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.***2002**; 42, 317–325
- Donadieu Y**. *La Propolis*, Editions Dangles, Paris.**2008** ; p :90 p.
- Dos Santos NA**, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Arch Toxicol.*2012; 86: 1233-1250.
- DU X. et al.** Comparison between copper and cisplatin transport mediated by human copper transporter 1 (hCTR1) .*Metallomics* .**2012**;4, 679-685.
- El-Beshbishy HA**, Bahashwan SA, Aly HA, Fakher HA. Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes.*Eur J Pharmacol***2011**; 668: 278284. 2
- Ellman GL**. Plasma antioxidants ,*ArchBiochemBiophys* .**1959**;82:70-77.
- Emre Yanikkerem1***, Gokcen Koker2 . Knowledge, Attitudes, Practices and Barriers Towards HPV Vaccination among Nurses in Turkey: a Longitudinal Study.*Asian Pac J Cancer Prev*. **2014**;15 (18), 7693-7702
- Kandemir F. M.**, Benzer F., Yildirim N. C. and N. Ozdemir. Compensatory effects of curcumin on cisplatin-induced toxicity in rabbit testis.*Journal of Medicinal Plants Research***2011**;Vol. 5(3), pp. 456-461, 4 ,

- Fadillioglu E**, Erdogan H, Sogut S, Kuku I. Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *J Appl Toxicol* **2003**;23:71
- Fang C**, Behr M, Xie F, Lu S, Doret M, Luo H, et al. Mechanism of chloroform-induced renal toxicity: non-involvement of hepatic cytochrome P450-dependent metabolism. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2008**;227:48–55.
- Florea A.M**, Büsselberg D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers*. **2011** ;3 : 1351-1371.
- Frezza M**. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr Pharm* ,**2010** ; 16(16): 1813–1825.
- Georgé S**, Brat P, Alter P, Amiot JM. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* .**2005**;53:1370-1373.
- Georgiev V**, Ananga A and Tsoolova V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients*. **2014**;21;6(1):391-415.
- Gianmaria F**, Ferrazzano I, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A, Plant Polyphenols and Their Anti-Carcinogenic Properties. *Molecules* .**2011**;16:1486-1507.
- Gilroy A.M**, MACPHERSON et ROSS L.M.. Atlas d'Anatomie.- 4ème édition.- Paris : MALOINE. **2010** ; Chap.13, Organes internes, p.158-189.
- Gonzalez T**, Corcho I, Ramirez D, Rodriguez S, Ancheta O, Merino N, Gonzalez A, Pascual C, Hepatoprotective Effects of propolis Extract on Carbon Tetrachloride – induced Liver Injury in Rats. *Phytother Res*. **1995**;9:114-117.
- Günes, D.A.**; Florea, A.M.; Splettstoesser, F.; Büsselberg, D. Co-application of arsenic trioxide (As₂O₃) and cisplatin (CDDP) on human SY-5Y neuroblastoma cells has differential effects on the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) and cytotoxicity. *Neurotoxicology*. **2009**;30, 194–202
- Habig WH**, Pabst MJ, Jakoby WB, Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*. **1974**;249:7130-7139.
- Hadj Salem J**. Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes nitrarietusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. *Université de Lorraine* ;**2009**.
- Herget-Rosenthal S**, Poppen D, Husing J, Marggraf G, Pietruck F, Jakob HG, et al. Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis. *Clin Chem* **2004**;50:552–8.
- Holzer AK**, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol. Pharmacol*. **2006**; 70:1390–1394.

- Holzer, A.K.;**Samimi, G.; Katano, K.; Naerdemann, W.; Lin, X.; Safaei, R.; Howell, S.B.The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **2004**;66, 817–823.
- Houssam M,** Arafa PHD, Mouhamed F, Abd-ellah PHD, Hafez F and Hafez MD.Abatement by naringenin of doxorubicin induced cardiac toxicity in rats .*J Egypt Nat Cancer Inst* .**2005**;17 (4) :291-300.
- Hutchison, F.N.;** Perez, E.A.; Gandara, D.R.; Lawrence, H.J.; Kaysen, G.A. Renal salt wasting in patients treated with cisplatin. *Ann. Intern. Med.* **1988** ;108, 21–25.
- induced renal dysfunction and oxidative stress in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.***2007**; 100, 372-6.
- Iqbal M,** Som DS, YasumasaO , Masayoshi F and Shigero O. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolising enzymes male mice : possible role in protection against chemical carcinogenesis and .*Pharmacol toxicol* .2003; 92:33-38.
- Pedraza-Chaverri José ***, Noemí Cárdenas-Rodríguez, Marisol Orozco-Ibarra, Jazmin M. Pérez-Rojas, Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and Chemical Toxicology* **2008**;46:3227–3239
- Kelly K. J.,** S. M.Meehan, R. B. Colvin,W.W.Williams Jr., and J.V. Bonventre, “Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody,” *Kidney International*, vol. 56, no. 3, pp. 922–931, **1999**.
- Kacimi Samia** et MESLI Imène. Place des Biomarqueurs en aux precoces dans le suivi de la chimiothérapie anticancéreuse .**2014** ;Chap.1, Rein, p 2-5.
- Kang KS,** Kim HY, Yamabe N, Nagai R, Yokozawa T. Protective effect of sun ginseng against diabetic renal damage. *Biol Pharm Bull.***2006**; 29: 1678-1684
- Karie S,** Launay-Vacher V, Deray G, Isnard-Bagnis C. Drugs renal toxicity.*NephrolTher.***2010**; 6:58–74.
- Kaushal G.;**Kaushal, V.; Hong, X.; Shah, S. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells.*Kidney Int.* **2001**;60, 1726–1736.
- Kelland L** .The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Publishing Group.***2007**; 10.1038
- Kimoto H.H** ,Masao M.S .T, Hideki M, ShiraT.Post initiation effects of a super critical extract of propolis I a rat two- stage carcinogenesis model in female . *Cancer Lett* .**1999**;147:221-227.
- Kokaleci A,** Marina B, Pepel S, Analysis of propolis from the continental and adreatic regions of Croatia.*Acta pharm.* **2003**;53:275-285.

- Kolb, R.;** Ghazi, M.; Barfuss, D. Inhibition of basolateral transport and cellular accumulation of CDDP and *N*-acetyl-L-cysteine-cDDP by TEA and PAH in the renal proximal tubule. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2003**; *51*, 132–138.
- Kumazawa S,** Hamasaka T and Nakayama T. Antioxydant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry.* **2004**; *84*: 329-339.
- Kurek-Górecka A,** Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M and Swierczek-Zieba G. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules.* **2013**; *20*; *19*(1):78-101..
- Lahouel M,** Boulkour S, Segueni N, Filastre J.P. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine , du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathol Biol.* **2004** ; *52* :314-322.
- Lahouel M,** Boutabet K, Kebsa W, Alyan M. Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress . *African journal of pharmacy and pharmacology* . **2010** ; vol 4(10) ,712-72.
- Lin X,** Okuda T, Holzer A, Howell SB. The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Pharmacol.* **2002**; *62*:1154–1159.
- Linares J F.,** Gustafsson I., Baquer and Martinez J L., Antibiotics as Intermicrobial signaling agents instead of weapons. *PNAS*. December. **2008**; *103*(51): 19489.
- Liu CF,** Lin CH, Lin CC, Lin YH, Chen CF, Lin CK, and Lin SC. Antioxidant natural products protect against Econazole-induced liver injuries. *Toxicology.* **2004**; *196*: 87-93.
- Lopez, F.C.,** Bankova, V., Sforcin, J. M .Effect of three vegetal sources of propolis on macrophages activation. *Phytomedicine* **2003**; *10*, 343-343.
- Sung M. J.,** D. H. Kim, Y. J. Jung et al., “Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury.” *Kidney International.* **2008**; vol. 74, no. 12, pp. 1538–1547.
- Marcucci M. C.** Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* **1995**; *26*, 83-99.
- Maria, S. F.,** L. M. Russell, B. J. Turpin, and R. J. Porcja, FTIR measurements of functional groups and organic mass in aerosol samples over the Caribbean, *Atmos. Environ.* **2002**; *36*, 5185–5196.
- Marieb E.** Anatomie et physiologie humaines. 6th ed. Paris: Pearson Education; **2005**.
- Masud J,** Husniyah AR, Laily P, Britt S.. Financial Behavior and Problems among University Students: Need for Financial Education *J. Pers. Financ.* **2004**, *3*(1): 82-96.
- Meziti A ,** Activité antioxydants des extraits des grains de *Nigella sativa* L , étude *in vitro* et *in vivo* . Université de Batna ; **2009** .

- Miguel M.G.** Chemical and biological properties of propolis from the western countries of the Mediterranean basin and Portugal. *Int J PharmPhrmSci.* **2013**;5:403-409.
- Monica A,** et al. Resveratrol Attenuates Cisplatin Renal Cortical Cytotoxicity by Modifying Oxidative Stress. *Toxicol In Vitro.* **2014**; 28(2): 248–257.
- Moundir N.** Les polyphénols de la propolis Algérienne . Université Mouhamed Boudiaf , M'sila, **2005**.
- Mustafa al'Absi,** Bongard S. Neuroendocrine and behavioral mechanisms mediating the relationship between anger expression and cardiovascular risk: assessment considerations and improvements. *J Behav Med.* **2006**;29(6):573-91.
- Nagwani S,** Tripathi YB. Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity by PTY: A herbal preparation. *Food Chem Toxicol.* **2010**; 48: 2253-2258.
- Nguyun SY,** BOUROUINA REDHA et ALLIN-PFISTER Anne-Claude.- *Manuel d'anatomie et de phy-siologie.*- 4ème édition.- Paris : Editions LAMARRE. **2008** ; Chap.3, L'abdomen, p.38-53.
- Nitha B,** Janardhanan KK. Aqueous-ethanolic extract of morel mushroom mycelium *Morchella esculenta*, protects cisplatin and gentamicin induced nephrotoxicity in mice. *Food Chem Toxicol.* **2008**; 46: 3193-3199.
- Noël L-H.** Atlas de pathologie rénale. Paris: Flammarion Médecine-Science; 2008.
- of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant.* **2003**;18:543–51.
- Okhawa H,** Ohishi N and Yagi K, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Add Biochem.* **1979**;95:315-358.
- Olivero, O.A.;** Chang, P.K.; LopezLarrazza, D.M.; SeminoMora, M.C.; Poirier, M.C. Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **1997**; 391, 79–86.
- Pabla N,** Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* **2008** ; 73: 994-1007
- Pabla, N.;** Murphy, R.F.; Liu, K.; Dong, Z. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **2009** ;296, F505–F511.
- Pandey KB** and Rizvi SI, Plant polyphénols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Long.* **2009**;2(5) : 270-278.

- Paula Antunes***, Rui Santos, Luí's Jordaõ , The application of Geographical Information Systems to determine environmental impact significance. *Environmental Impact Assessment Review* **21,2001**; 511–535.
- Peyrou, M.**; Hanna, P.E.; Cribb, A.E. Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicol. Sci.* **2007** ;99, 346–353.
- Pietta P G.**, 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products* , **2000**; 63(7): 1035–1042.
- Pigeolet, E.**, P. Corbisler, A. Houbion, D. Lamber and C. Michiels. Glutathione peroxidases, superoxide dismutase and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.* ,**1990**; 51: 283-297.
- Rabiller Johanna.** Exoloration des difficultés dans la prise de traitements au long cours chez le patient transplanté rénal : comment le rendre acteur de sa santé.**2013** ;chap.1, Rappels anatomiques et physiologiques des reins,p:20-29.
- Raja S,** Nazeer Ahmed KFH, kumarV.MukherjeeK,bandyopadyay A and mukherjee, pk.antioxydant effect of Cytisusscoparius against carbon tetrachloridetreated liver injury in rats. *J ethnopharmaeol.***2007**;109 : 41-47.
- RashedLA,**Hashem RM, Soliman HM. Oxytocin inhibits NADPH oxidase and P38 MAPK in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother***2011**; 65: 474-480. 16
- redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev***2010**; 3: 228-237
- Renuka B,** Rajurkar Z.H, Govind T.G. Studies on levels of glutathione –S- transferase ,its isolation and purification from Helicoverpaarmigera . *Current Science* .**2003**;85:1355-1360.
- Ronald P,** Miller A. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity .*Toxins* .**2010** ; 10.3390.
- Sanchez-GonzalezP. D.**, F. J. Lopez-Hernandez, J. M. Lopez- Novoa, and A. I. Morales, “An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity.”*CriticalReviews in Toxicology.***2011**;vol. 41, no. 10, pp. 803–821.
- Sarawoot P.**, Chuchard P., Dutsadee C. andPrasit S. Amelioration of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats by Curcumin and α -Tocopherol. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*December**2013**; 12 (6): 973-979
- Sarni M.P,** CheynierV.Les polyphénols en agroalimentaire , Ed *Lavoisier, science et technologie.***2006** ;p:2-10.
- Segueni N,** Khadraoui F, Moussaoui F, Zellagui A, Gherraf N, Lahouel M, Rhouati S, Volatil constituents of Algerian propolis .*Ann BiolRes* .**2012** ;2:103-107.

- Segueni N.** Contribution à l'étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis .**2011** ;Chap .1, propolis,p12.
- Shi W,** Wang Y, Li J, Zhang H, Ding L. Investigation of ginsenosides in different parts and ages of Panax ginseng. *Food Chem.***2007**; 102: 664-668
- Silva, C.R.,** GreggiAntunes, L.M. and Bianchi, M.D. Antioxidant action of bixin against cisplatininduced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats.*Pharmacol. Res.***2001**; 43: 561-566
- Singleton V.L.,** Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteureagent.*Methods of Enzymology.***1999**;299: 152-178.
- Stahl, W.** and Sies, H. Antioxidant activity of carotenoids.*Mol.Aspects Med.***2003.** 24: 345-351
- Stupp R,** Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, BrandesAA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N.Engl.J.Med.* **2005**; 352:987–996.
- Sueishi, K.,** Mishima, K., Makino, K., Itoh, Y, Tsuruya, K., Hirakata, H. and Oishi, R. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur. J.Pharmacol.* **2002**;451: 203-208
- Sulaiman Gh,** Al-Smmarae Kh, Ad'hiah. Anti-tumour Properties of Iraqi Propolis : *in vitro* and *in vivo* investigation of anti- tumour effects of Iraqi propolis in human cancer cell lines *in vitro* and in nude mice xenografts. *LAP Lamdert Academic publishing .Iraq*,**2012**.
- Ichimura T.,** C. C. Hung, S. A. Yang, J. L. Stevens, and J. V. Bonventre, “Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury.” *American Journal of Physiology: Renal Physiology.* **2004**; vol. 286, no. 3, pp. F552– F563.
- Tapas A.R ,** Sakarkar D.M, Kakde R.B. Flavonoids as nutraceuticals *Trop. J .Pharm, Research.***2008**;7 :10 89-1099.
- Thomas F,** Chatelut E. Les dérivés du platine. *La Revue Francophone de Formation en Oncologie.***2007**; 9: 741–745
- Tortora G,** Grabowski S. Principes d'anatomie et de physiologie. 3rded. Louvain-la-Neuve: De Boeck.**2001**.
- Townsend, D.M.,** Tew, K.D.; He, L.; King, J.B. Hanigan, M.H. Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed. Pharmacother.***2009** ;63, 79–85.
- Tranchand .B.** Guide pratique de pharmacocinétique clinique en oncologie. Frison –Roche .**1997**; Chap.4,p.130-132 .

- Valérian B.** Recherche de nouvelles substances naturelles d'intérêt dans la prévention de la fibrose rénale d'origine médicamenteuse .**2015** ;chap.3,Le cisplatine,p :liii-lvii .
- Venukumar MR** and Latha MS. Antioydan activity of Curculigoorcheoides in carbontelrachlore de induced hepatopathyinrats .*Ind J Clin Bio chem.***2002**;17 :80-87.
- Verma R K.** and Verma S K., Phytochemical and termiticidal study of Lantana camara var. aculeata leaves. *Fitoterapia.* 77, **2006**;pp 466–468
- Wagh VD.** Propolis: A Wonder bees product and its Pharmacological potentials .*Advences in pharmacological Sciences.***2013**; 2013:11.
- Weijl NI,** Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev* **1997**;23:209–40.
- WestA,** A. Koblansky, and S. Ghosh.“Recognition and,signaling by toll-like receptors.*Annual Review of Cell and Developmental Biology.***2006**;vol. 22, pp. 409–437.
- WesthuyzenJ,** Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ. Measurement
- Yann Gueguen,** Caroline Rouas ,Franc,ois A. Leblond, Les biomarqueurs d’atteinte renale.Nephrologie &Therapeutique . **2012** ;146–155.
- Yao, X.;** Panichpisal, K.; Kurtzman, N.; Nugent, K. Cisplatin nephrotoxicity: A review. *Am. J.Med. Sci.* **2007**;334, 115–124.
- Yvon Gervaise.** Analyse des antioxydants naturels dans les matièrespremières et les produits, Pris.**2004**.
- Zhang H.T** ,Luo H, Wu J, Lan L.B ,Fan K.D, Chen X .Y,Wen M, Liu H.M. Galangininduces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via the mitochondrial pathway. *world J Gastroenterol* .**2010**;27 :3377-3384.
- Zhang, G.** Ramesh, S. Uematsu, S. Akira, andW. B. Reeves, “TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity,” *Journal of the American Society of Nephrology*, **2008**;vol. 19, no. 5, pp. 923–932,
- Zhou S,** Palmira CM and Wallace KB. Doxorubicin – induced persistent oxydative stress to cardiac myocyt. *Toxicol letters.***2001**;,121 :151-171.

Annexes

Annexe 1

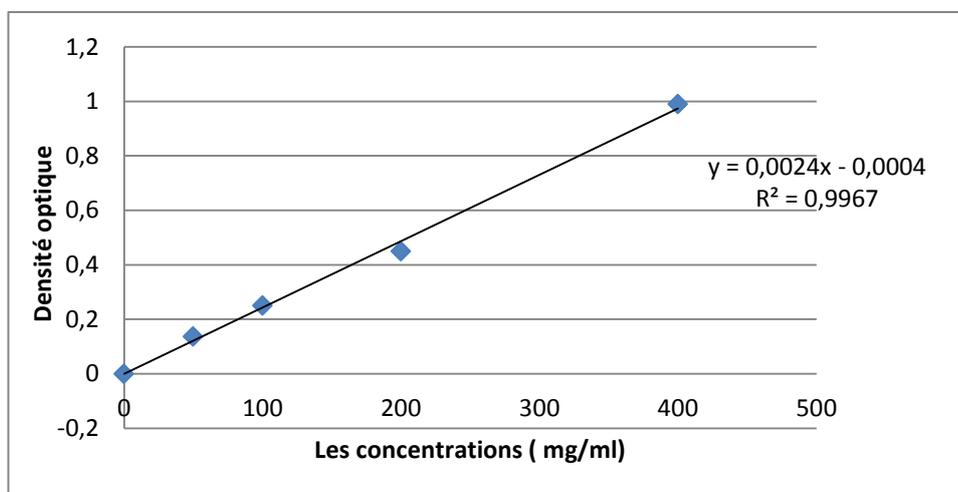


Figure 01 : Courbe étalon de l'acide gallique (Moyenne de trois essais).

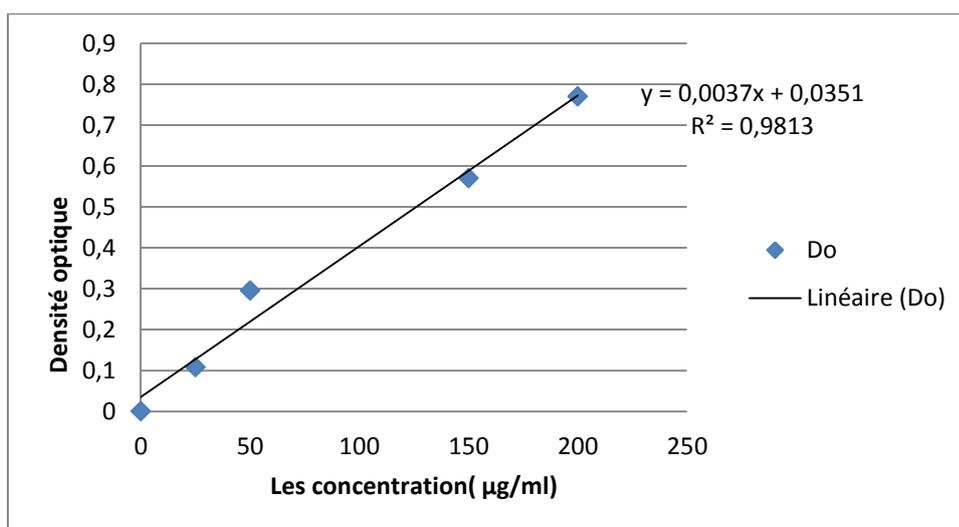


Figure 02 : Courbe étalon de la quercétine (Moyenne de trois essais).

Annexe 1

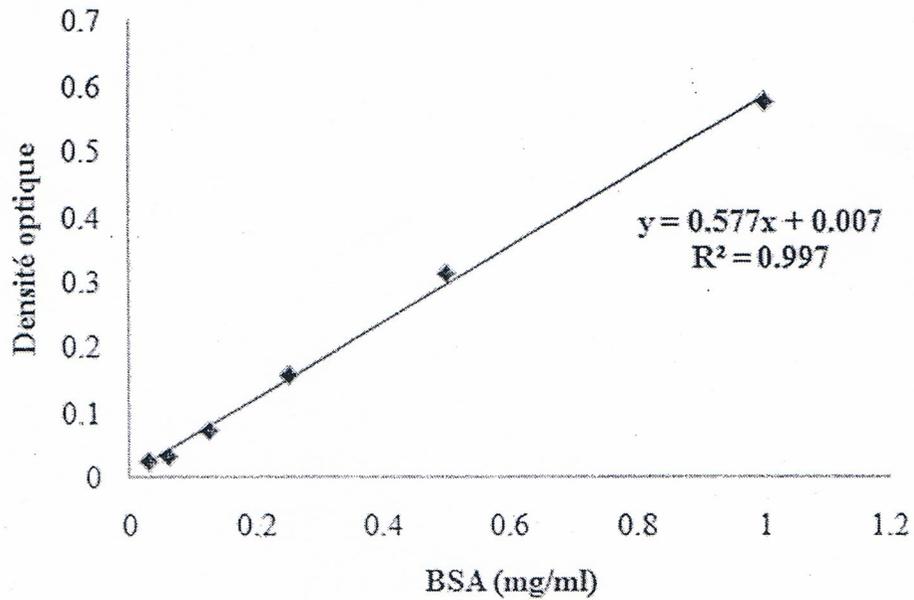


Figure 3 : Courbe étalon du dosage des protéines (BSA comme standard), (Moyenne de trois essais)

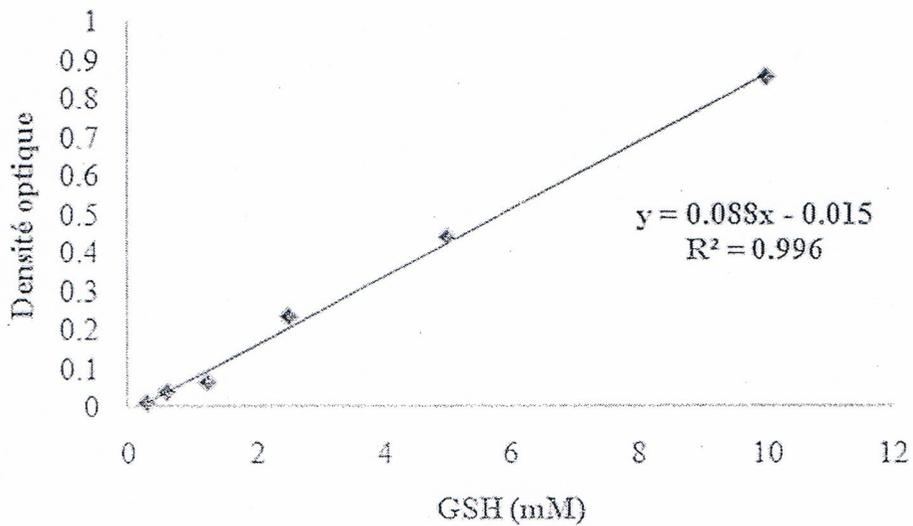


Figure 4 : Courbe étalon du GSH avec le réactif DTNB, (Moyenne de trois essais)

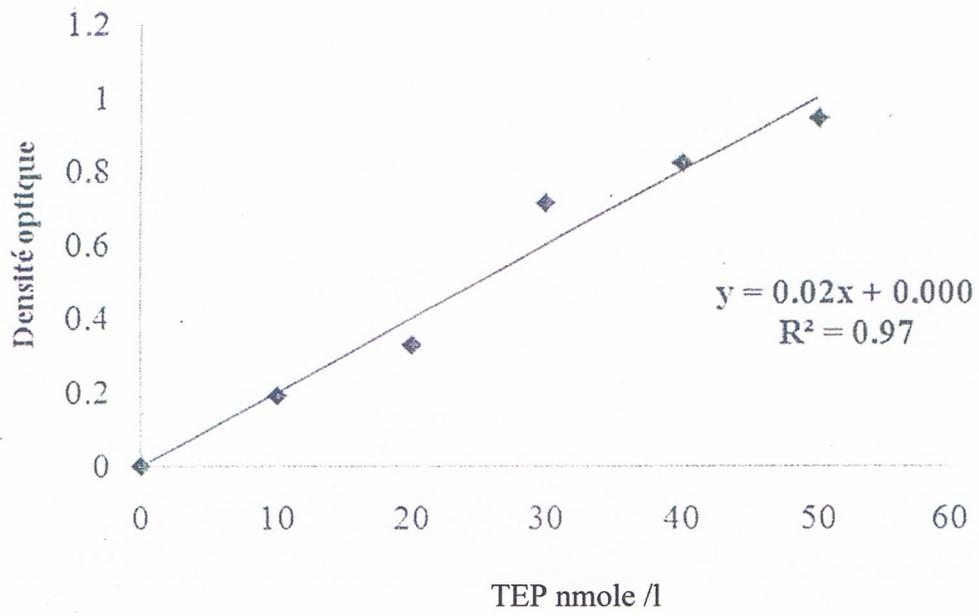


Figure 05: Courbe étalon du TEP comme standard , (Moyenne de trois essais).

Annexe 02

Tableau 01 : Evaluation de l'activité antiradicalaire des différents de l'EEP de Kaous et quercétine à différentes concentrations vis-à-vis le radical libre DPPH°.

	50µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml
EEP Kaous	38,05±5,26	46,36±6,43	59,092±5,11	66,88±11.67
Quercétine	41,59±8,36	53,42±15,55	61,55±6,19	67.45±7,51

Tableau 02 : Dosage des paramètres du stress oxydant dans le tissu rénal

Paramètres Groupes	[GSH] (nmol/mg)	[MDA] (nmol/L)	Activité de GST(UI /mg)	Activité de CAT (UI /mg)	[Protéines] (mg/ml)
Témoin	3,36 ± 0,47	7,96 ± 1,59	59,58 ± 8,15	0,26 ± 0,05	0,15 ± 0,0005
Cisplatine	1,83 ± 0,34**	21,73 ± 3,82*	32,77 ± 1,07**	0,05 ± 0,03**	0,13 ± 0,002**
Cisplatine +Quercetine	3,9 ± 0,60*	6,73 ± 1,30**	49,96 ± 3,47**	0,21 ± 0,01**	0,14 ± 0,001**
Cisplatine + propolis	4,68 ± 1,04**	8,16 ± 2,02**	45,02 ± 1,35***	0,21 ± 0,09*	0,14 ± 0,001**

Tableau 03 : Dosage des paramètres du stress oxydant dans le tissu hépatique.

Paramètres Groupes	[GSH] (nmol/mg)	[MDA] (nmol/L)	Activité de GST(UI /mg)	Activité de CAT (UI /mg)	[Protéines] (mg/ml)
Témoin	4,18 ± 1,35	4,90 ± 2,007	32,01 ± 7,45	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,008
Cisplatine	1,7 ± 0,67*	12,21 ± 1,68**	17,31 ± 1,50*	0,08 ± 0,01*	0,11 ± 0,007**
Cisplatine +Quercetine	4,14 ± 0,89	5,26 ± 2,003**	23,80 ± 3,87*	0,14 ± 0,12	0,14 ± 0,005**
Cisplatine + propolis	4,22 ± 1,76**	6,33 ± 1,15**	23,12 ± 1,18**	0,13 ± 0,13	0,14 ± 0,01*

Tableau 04 : Dosage des paramètres du stress oxydant dans le tissu cardiaque.

Paramètres Groupes	[GSH] (nmol/mg)	[MDA] (nmol/L)	Activité de GST(UI /mg)	Activité de CAT (UI /mg)	[Protéines] (mg/ml)
Témoin	3,49 ± 0,43	10,66 ± 2,08	14,51 ± 0,84	0,21 ± 0,15	0,12 ± 0,009
Cisplatine	2,8 ± 0,005*	11,66 ± 0,57	9,51 ± 1,86*	0,20 ± 0,08	0,10 ± 0,0005*
Cisplatine +Quercetine	2,8± 0,03	10,33 ± 0,57*	15,09 ± 1,18**	0,19 ± 0,10	0,14 ± 0,02*
Cisplatine + propolis	3,49 ± 1,41	6 ,33 ± 0,57***	17,12 ± 6,7	0,23 ± 0,07	0 ,12 ± 0,008**

<i>Dirigé par : Rouibeh Hassiba</i>	<i>Présenté par : Lahoues Asma Makhlouf Walida Belhadi Amina</i>
<i>Effet protecteur de la propolis sur la néphrotoxicité, l'hépatotoxicité et la cardiotoxicité induite par le cisplatine.</i>	

Résumé : Le cisplatine est l'un des agents cytotoxiques le plus actif dans le traitement du cancer. La présente étude est conçue pour déterminer leurs effets toxiques sur le tissu rénal, hépatique et cardiaque ainsi que le possible effet protecteur des polyphénols de la propolis. Le groupe 1 (contrôle) a reçu l'eau distillée. Le groupe 2 a reçu une dose unique de CDDP 5mg /Kg par voie intrapéritonéale. Le groupe 3 a reçu 100mg / kg de la propolis per os pour 8 jours suivie de 5mg /kg CDDP. Le groupe 4 a reçu 10mg/kg de la quercétine per os pour 8 jours suivie par le CDDP (5mg/kg, IP). A la fin de la période du traitement, le taux du MDA et du GSH, l'activité enzymatique de la GST et de la CAT ont été déterminés aux niveaux du rein, du foie et du cœur. Le cisplatine a diminué le taux de GSH, l'activité enzymatique de la GST et de la CAT en comparaison avec le control essentiellement au niveau du rein. Il a augmenté le taux de MDA et des paramètres sériques. Le prétraitement par la propolis a diminué le taux de MDA, a augmenté celui de GSH, de l'activité enzymatique de la CAT et de la GST ainsi qu'il a amélioré les paramètres sériques. En conclusion, la propolis peut être utilisée en association avec le anticancéreux en chimiothérapie pour protéger les tissus du stress oxydatif et les dommages induits.

Mot clés : Cisplatine, stress oxydatif, néphrotoxicité, propolis, hépatotoxicité, cardiotoxicité

Abstract: Cisplatin is one of the most active cytotoxic agents in cancer treatment. The present study was designed to determine its kidney, liver and heart toxicity as well as the possible protective effects of propolis polyphenols. Group 1 (control) received distilled water. Group 2 received a single dose of CDDP at 5mg / Kg intraperitoneally. Group 3 received 100mg / kg of propolis per os for 8 days and CDDP (5mg / kg IP). Group 4 received 10mg / kg of quercetin per os for 8 days and CDDP (5 mg / kg IP). At the end of the treatment period, rats were killed, MDA and GSH levels, GST and CAT activities were determined in kidney, liver and heart tissues. Cisplatin decreased GSH amounts, enzymatic activity of GST and CAT when compared to control especially in kidney tissue. It increased MDA levels and serum parameters. Pretreatment with propolis decreased MDA level, increased GSH amount, GST and CAT activities and ameliorate serum parameters. In conclusion, propolis may be used in combination with anticancer drugs in chemotherapy to protect tissues of oxidative stress damages.

Key words: Cisplatin, oxidative stress, propolis, nephrotoxicity, hepatotoxicity, cardiotoxicity

ملخص : سيسبلاتين هو واحد من العوامل السامة للخلايا الأكثر نشاطا في علاج السرطان. وقد تم تصميم هذه الدراسة لتحديد سمية الكلى والكبد و القلب فضلا عن آثار وقائية ممكنة من مادة البوليفينول الموجودة في العكبر. المجموعة 1 (الشاهد) تلقت الماء المقطر. وتلقت المجموعة 2 جرعة واحدة من CDDP (5ملغ / كغ). وتلقت المجموعة 3 جرعة (100 ملغ / كغ) من العكبر في نظام التشغيل لمدة 8 أيام متبوعة (5ملغ / كغ) من CDDP. المجموعة 4 (10ملغ / كغ) من كيرسيتين في نظام التشغيل لمدة 8 أيام و(5 ملغ / كغ) من CDDP بعد نهاية فترة العلاج، تم قتل الفئران ، واستأصال كل من الكلى الكبد و القلب فلو حظ انخفاض في **CAT,GSH,GST** في المجموعة المحقونة بالسيسبلاتين مقارنة بالمجموعات الأخرى على مستوى النسيج الكلوي الكبد والقلبي وارتفاع في **MDA** خصوصا في نسيج الكلى. ، اما الجردان المعالجة بالعكبر والمحقونة بالسيسبلاتين فلو حظ انخفاض في **MDA** وارتفاع **CAT,GSH,GST** مقارنة بالمجموعات الأخرى. السيسبلاتين يسبب ضررا على مستوى النسيج الكلوي الكبد والقلبي وهذا الخلل يحسن من خلال المعالجة بالعكبر. وفي الأخير العكبر يستعمل مع السيسبلاتين في المعالجة الكيميائية وذلك للوقاية من أضرار الاجهاد التاكسدي الذي يسببه السيسبلاتين.

الكلمات الرئيسية : سيسبلاتين، الاجهاد التاكسدي، العكبر، السمية الكلوية، السمية الكبدية، السمية القلبية.