

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique Et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى

UNIVERSITE MOHAMMED ES-SEDDIK BEN YAHIA

Faculté de Sciences de la nature et de la vie  
Département De Biologie moléculaire et cellulaire

كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية



Mémoire de fin d'études

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

Option : Pharmacologie Expérimentale

Thème

**Effet protecteur de l'extrait de propolis  
contre le stress potentiel induit par  
l'amphotéricine B liposomale**

Membre de Jury

Présidente : M<sup>me</sup> AZZOUZ Wassila

Examineur: Mr. BOUHOUS Mostefa

Encadreur : Dr. ALYANE Mohamed

préparé par :

Boudebza Rima

Chaker Sara

Chaib Siham

**Remerciement**

*Avant toute chose, nous remercions tout d'abord **ALLAH** le tout puissant, qui nous a donné la force, le courage, la volonté, et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Notre reconnaissance et profonde gratitude vont à notre encadreur **Dr. ALYANE Mohamed** qu'il a l'honneur d'avoir guider et assister tout au long de ce travail ; nous le remercions pour tous ses conseils, sa disponibilité, son sérieux dans le travail.*

*Nous remercions aussi notre examinateur **Mr. BOUHOUS Mostefa** d'avoir accepté de juger le contenu du présent mémoire.*

*Nous tenons à exprimer nos grandes considérations à **M<sup>me</sup> AZZOUZ Wassila**, pour avoir accepté de prendre part au jury de soutenance, tout le plaisir est pour nous ; nous la remercions pour sa grande gentillesse et sa disponibilité.*

*Des chaleureux remerciements pour les ingénieurs de laboratoire de pharmacologie expérimentale (Université de Jijel) en particulier : **M<sup>me</sup> Sefriou Houria, M<sup>me</sup> Taleb Rim**, Nous remercions vivement la doctorante Rayane Karima pour son aide précieuse sans oublier tous ceux qui nous ont aidé au niveau de laboratoire de toxicologie, Nous remercions aussi tous les collègues et l'équipe qui nous accompagne dans le laboratoire de pharmacologie expérimentale, pour leurs remarques et conseils, mais aussi pour l'ambiance amicale et studieuse qu'ils ont su créer.*

*Nous ne serions bien sûr jamais arrivées là sans l'aide et le soutien de nos familles ; à nos parents et à nos frères et sœurs. Merci d'avoir soutenues dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci pour tout. Nous espérons vous rendre le bonheur que vous nous apportez.*

## Sommaire

Introduction générale .....	1
<b>Analyse bibliographique</b>	
<b>I. Chapitre 01 : l'amphotéricine B liposomale</b>	
I.1 Généralité.....	2
I.2 La structure d'Amphotericine B liposomale (AmBisome).....	2
I.2.1 Amphotericine B .....	3
I.2.2 Les liposomes.....	4
I.3 Propriétés Physico-chimiques d'Amphotericine B liposomale .....	4
I.4 Mécanisme d'action.....	5
I.5 Pharmacocinétique .....	6
I.6 Toxicité d'AmBisome.....	6
<b>II. Chapitre 2 : le stress oxydatif</b>	
II.1 Généralité .....	7
II.2 Définition des radicaux libres .....	7
II.3 Les différents radicaux libres oxygénés .....	7
II.3.1 L'anion superoxyde ou $O_2^\circ$ .....	7
II.3.2 Le peroxyde d'hydrogène.....	8
II.3.3 Le radical hydroxyle $\bullet OH$ .....	8
II.3.4 Le peroxydinitrite.....	8
II.4 Les marqueurs du stress oxydatif.....	9
II.4.1 Oxydation des protéines.....	9
II.4.2 Peroxydation lipidique.....	10
II.5 Systèmes de défense antioxydants.....	10
II.5.1 Antioxydants enzymatiques.....	10
II.5.2 Antioxydants non enzymatiques.....	11

## **Matériels et méthodes**

<b>Partie 1 : Etude in vitro.....</b>	<b>13</b>
<b>1. Dosage des polyphénols.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Dosage des flavonoïdes totaux .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Etude du pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de propolis.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Analyse qualitative par CCM .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Analyse quantitative.....</b>	<b>14</b>
<b>Partie 2 : Etude in vivo.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Animaux et conditions d'hébergement.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Traitement des rats.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Dosages tissulaires.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) ou test TBARS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Dosage du glutathion .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique.....</b>	<b>17</b>
<b>4. Analyse statistique.....</b>	<b>18</b>

## **Résultats et discussion**

<b>1. Dosage des polyphénols totaux.....</b>	<b>19</b>
<b>2. Activité anti-radicalaire.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Dosage tissulaire .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Test TBARS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Taux glutathion (GSH).....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique.....</b>	<b>25</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>28</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>29</b>

### **La liste des abréviations**

AmB : Amphotéricine B libre

GSH : Glutathion réduit

MDA : Malondialdehyde

CAT : Catalase

ROS : *Reactive Oxygen Species*

IC50 : La concentration inhibitrice 50

DPPH : *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*

CCM : Chromatographie sur couche mince

EDTA: Ethylène diamine tétraacétate

DTNB: 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)

TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances (substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique)

TBA : Acide thiobarbiturique

IP : Intrapéritoniale

**La liste des figures**

<b>Figures :</b>	<b>pages :</b>
Figure 1 : Coupe schématique d'un liposome porteur d'amphotéricine B intercalée à l'intérieur de sa membrane.....	3
Figure 2 : Structure chimique de l'amphotéricine B .....	4
Figure 3 : représente le mécanisme d'action d'Amphotericine B sur des cellules fongique.....	5
Figure 4: Altération des constituants membranaires par les radicaux libres.....	9
Figure 5 : Histogramme représentant la teneur en polyphénols (a) et en flavonoïdes (b) dans l'extrait de propolis.....	19
Figure 6 : Représentation d'analyse qualitative par CCM de l'extrait de propolis avec les références (quercétine, l'acide gallique et le mélange de l'acide gallique avec la quercétine).....	20
Figure 7 : Représentation du taux d'inhibition radicalaire de la propolis et la quercétine en fonction du temps.....	21
Figure 8 : représente le taux d'inhibition en fonction du temps de la propolis et la quercétine.....	22
Figure 9. Variation des taux du MDA après administration de l'AmBisome seule ou en association avec un traitement par l'extrait de propolis.....	23
Figure 10. Variation des taux du GSH après administration de l'AmBisome seule ou en association avec un traitement par l'extrait de propolis.....	24
Figure 11 : variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique.....	26



**Introduction**

L'amphotéricine B (AmB) est un antibiotique de la famille des polyenes, largement utilisé pour le traitement des maladies fongiques. Il a un effet toxique sur les cellules en faisant des complexes avec les stérols membranaires, qui forme ensuite des pores dans la membrane cytoplasmique ce qui augmente de façon importante la perméabilité membranaire (Altuntas *et al.*, 2014). Pour améliorer l'efficacité de ce médicament et de réduire ses effets toxiques aigus et chroniques, plusieurs formulations lipidiques ont été développées, y compris AmBisome, une formulation liposomale d'amphotéricine B (Deray *et al.*, 2002). Dans l'AmBisome®, l'amphotéricine B est encapsulée dans des liposomes uni-lamellaires et intercalée dans une bicouche lipidique. Ce vecteur est composé de cholestérol et de phospholipides (Adler-moore *et al.*, 2008). Les liposomes sont des vésicules sphériques fermées, créés en mélangeant des proportions spécifiques de substances amphiphiles comme les phospholipides et le cholestérol de sorte qu'ils se disposent en plusieurs bicouches membranaires (Anonyme, 2011)

Cependant, le développement de ces formes galéniques reste incapable d'éviter totalement l'apparition des effets toxiques induits notamment au niveau des reins et du foie, ce qui nécessite l'utilisation des agents de protection.

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. La plupart des complications induites par le stress lors de l'utilisation de médicaments apparaissent suite à une diminution des défenses antioxydantes et augmentation de production mitochondriale de radicaux.

Vu la diversité et la gravité des complications qu'induit le stress oxydant, plusieurs équipes de chercheurs se sont investies dans la recherche de nouveaux antioxydants en vue de lutter contre le stress oxydant et ses pathologies associées. Parmi les sources de ces nouveaux antioxydants, on trouve la propolis, produit de l'abeille dont les activités anti-oxydantes sont avérées (Alyane *et al.*, 2008 ; Lahouel *et al.*, 2010).

La présente étude se propose d'explorer le stress oxydant généré par l'AmB liposomale (AmBisome) et l'effet protecteur de l'extrait de la propolis.





**Analyse Bibliographique**

**Chapitre 1 : Amphotéricine B**  
**Liposomale**

## I.1. Généralité

Les médicaments antifongiques sont des substances naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques, capables d'inhiber ou d'arrêter la croissance des champignons sans être toxiques pour l'homme (Sasseville *et al.*, 2006) et ils sont utilisés pour lutter contre les infections locales ou profondes à champignons microscopiques (Mimoz *et al.*, 2000).

L'AmB, chef de file chronologique des antifongiques systémiques, reste la première en efficacité, qui est largement utilisé pour le traitement des infections fongiques (Altuntas *et al.*, 2014). Sa découverte remonte au tout début des années 50 et est associée à la découverte de plus de 200 autres molécules apparentées, toutes isolées à partir d'un microorganisme du genre *Streptomyces* plus particulièrement par l'espèce *Streptomyces nodosus*. Ce type de microorganisme synthétise naturellement les polyènes (Rocheleau, 1992).

L'arrivée des formes lipidiques d'AmB, qui résulte de l'association de l'AmB avec des liposomes constitués de phospholipides ont représenté des étapes importantes dans l'amélioration de l'efficacité, mais également de la tolérance des antifongiques systémiques. Ces préparations liposomales sont utilisées comme des transporteurs de l'AmB dans l'organisme (Jill *et al.*, 2002).

La formulation liposomale d'AmB ou Ambisome est significativement mieux tolérée que la formulation conventionnelle, tant sur le plan des manifestations immédiates que sur le plan de la néphrotoxicité. Les effets indésirables ayant une traduction clinique sont rares sous Ambisome (Plats *et al.*, 2005)..

## I.2. Structure d'Amphotéricine B liposomale (AmBisome)

Ambisome est un antifongique de la famille des polyènes macrocycliques dans la formulation duquel l'AmB est intercalée dans la membrane du liposome (figure 1) et stabilisée par un complexe de transfert de charges avec le distearoylphosphatidylglycerol (DSPG) et par la présence de cholestérol (Plats *et al.*, 2005).

Dans la structure liposomale, l'AmB est associée à 4 molécules (phosphatidylcholine de soja hydrogénée, DSPG, cholestérol,  $\alpha$ -tocophérol), suivant un rapport molaire précis. Ce liposome est de type SUV (small unilamellar vesicles), d'une taille moyenne de 70 nm (Plats *et al.*, 2005).

Les dimensions particulières des liposomes d'AmBisome correspondent aux niveaux thérapeutiques de divers foyers d'infection fongique à l'intérieur du corps (Jill *et al.*, 2002, Heinemann *et al.*, 1997).

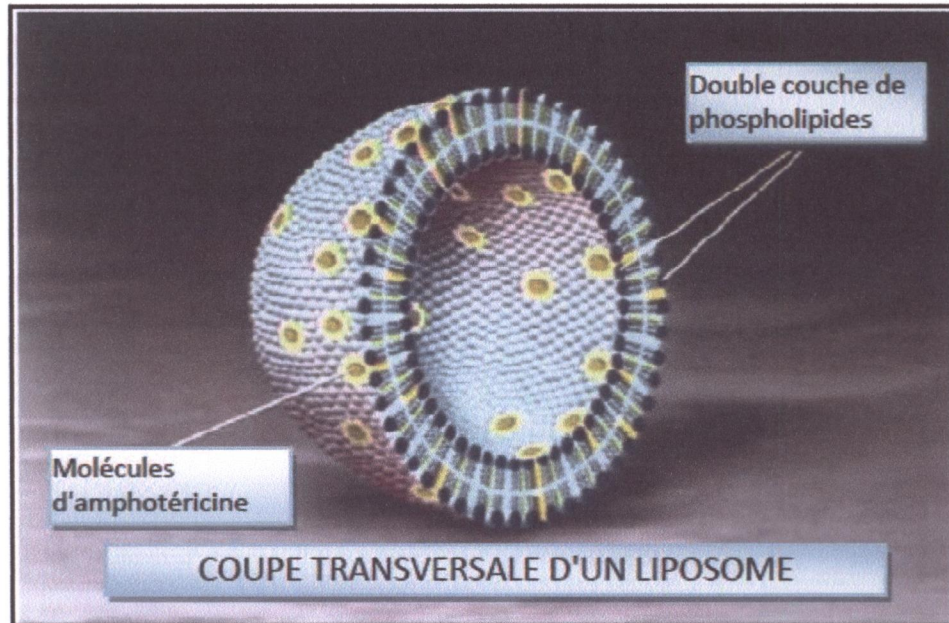


Figure 1 : Coupe schématique d'un liposome porteur d'amphotéricine B intercalée à l'intérieur de sa membrane (Anonyme, 2011).

### 1.2.1. Amphotericine B

La structure chimique de l'AmB a été élucidée par cristallographie aux rayons X à partir d'un dérivé N-iodoacétylé (Rocheleau., 1992). De formule moléculaire  $C_{47}H_{73}NO_{17}$  et un poids moléculaire de 924,09 (Anonyme., 2012), elle comporte deux parties: une partie commune à tous les macrolides polyéniques, le grand cycle lactonique, responsable de son caractère amphiphile, et la partie spécifique.

Le cycle lactonique de 37 atomes de carbone (figure 2) comprend une région hydrophile et une région hydrophobe. La région hydrophile consiste en un segment hydroxyl-substitué (C1-C1s) dont trois groupements hydroxyles équatoriaux sont placés sur les carbones en position 8, 15 et 35 et quatre autres, ayant une configuration axiale, en position 3,5,9 et11. La région polyénique hydrophobe, parallèle au segment hydrophile (C20-C33), est constituée d'un segment heptaénique (sept doubles liaisons) qui confère à la molécule sa rigidité.

La partie spécifique de la molécule est concentrée dans la région polaire et comprend un groupement carboxyle sur la chaîne aliphatique en position C13 sur le segment hydrophile et un sucre aminé, le D-mycosamine, en configuration de chaise, relié avec l'hydroxyle du C19 par un lien  $\alpha$  glycosidique (Rocheleau., 1992).

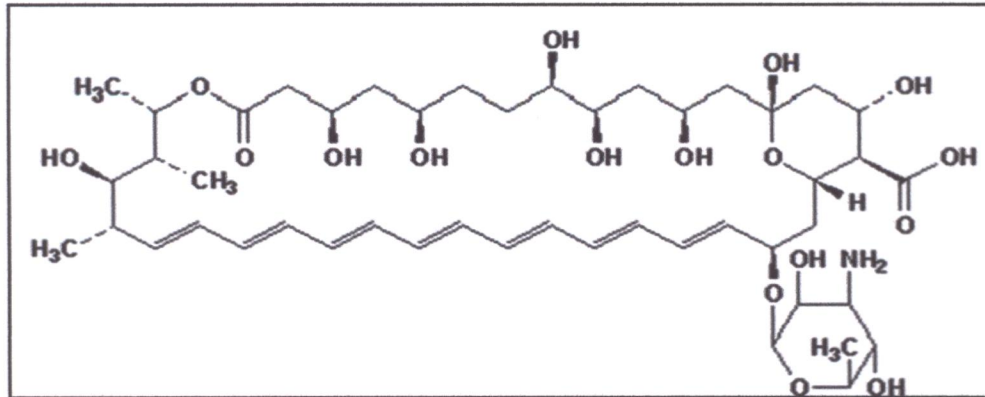


Figure 2 : Structure chimique de l'amphotéricine B (Hillery, 1997)

### 1.2.2. Les liposomes

Les liposomes ont été découverts dans les années 1960 par un scientifique anglais, Alex Bangham. Les premières recherches sur l'encapsulation de principes actifs (PA), quant à elles, datent de plus de 20 ans, illustrant les difficultés scientifiques et techniques à surmonter avant qu'un concept thérapeutique puisse devenir une réalité clinique.

Le terme de liposome ne s'applique qu'à l'entité comprenant une vésicule et une composition à base de phospholipides.

Les liposomes font partie des systèmes supramoléculaires organisés de molécules tensioactives. Ce sont des microvésicules constituées d'une ou plusieurs bicouches de nature phospholipidique entourant un espace interne aqueux (Plats *et al.*, 2005)

Les lieux d'incorporation d'un PA au sein des liposomes dépendent essentiellement de ses propriétés physicochimiques: les PA hydrosolubles seront localisés dans la phase interne aqueuse des liposomes; les molécules amphiphiles seront insérées dans la bicouche phospholipidique (cas de l'AmB), et les molécules liposolubles seront enchassées dans la matrice hydrophobe de la paroi liposomale (Plats *et al.*, 2005).

### 1.3. Propriétés Physico-chimiques de l'AmB

L'AmB est un heptaène, se présente sous forme d'une poudre jaune insoluble dans l'eau et dans l'alcool, soluble dans les solvants organiques (Lemke *et al.*, 2005). Elle est facilement mise en

suspension dans un soluté glucosé isotonique à 5%, réalisant ainsi une suspension colloïdale et non une solution injectable (Anonyme, 2012).

La poudre sèche est stable à 4°C en suspension dans un milieu aqueux, il existe une discrète diminution d'activité au bout de 24 h. L'exposition à la lumière dégrade légèrement la molécule. Ces deux paramètres sont négligeables en thérapeutique humaine (Bellocchio, 2005)

#### I.4. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de l'AmB sur les cellules fongiques ou animales restent encore mal compris (Mimoz *et al.*, 2000 ; Gray *et al.*, 2012). L'étape initiale d'efficacité ou de toxicité consiste en une interaction avec les stérols des membranes plasmatiques ; la molécule d'AmB a une longueur de 24Å, soit approximativement la moitié de l'épaisseur d'une demi-bicouche lipidique (figure 3), s'introduit verticalement dans une membrane (Rocheleau,1992) et où forme des pores qui perturbent la perméabilité membranaire (Mimoz *et al.*, 2000), ce qui entraîne par la suite une fuite des constituants cytoplasmiques, en particulier au niveau des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  ce qui conduit finalement à la mort cellulaire (Janina, 1990). La formation de ces pores provient de sa liaison à stérols incorporés dans les membranes cellulaires: l'ergostérol et le cholestérol (Baginski *et al.*, 2002).

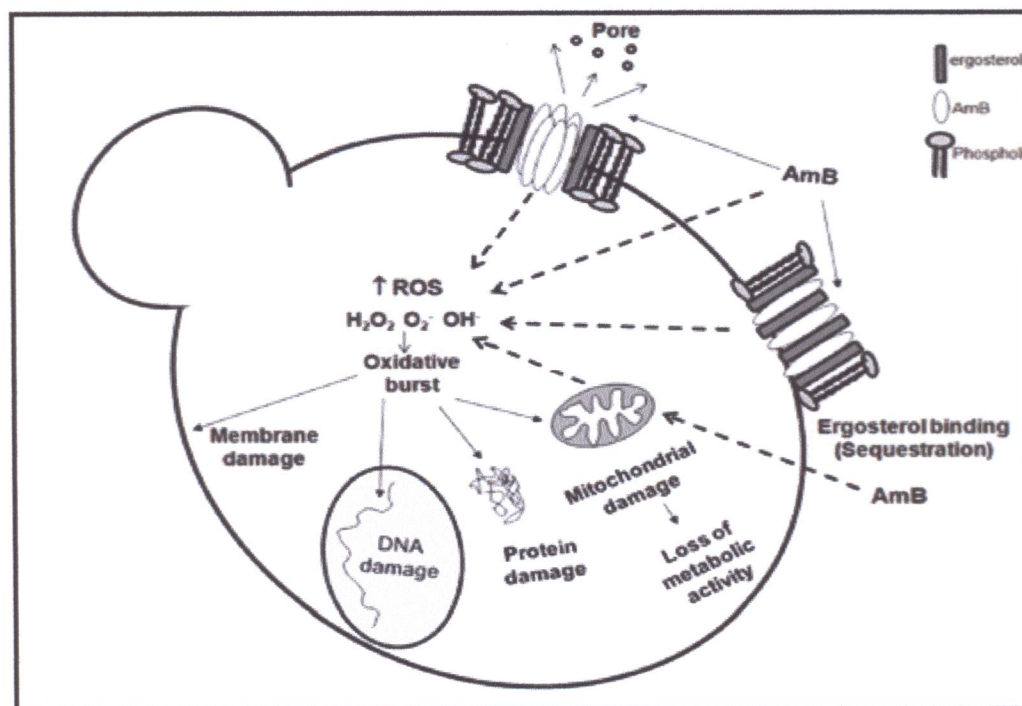


Figure 3 : représente le mécanisme d'action d'Amphotéricine B sur des cellules fongiques (Mesa-Arango *et al.*, 2012)

La sélectivité de l'AmB pour la cellule fongique par rapport à la cellule hôte proviendrait d'une affinité beaucoup plus marquée pour les membranes contenant de l'ergostérol, composant majeur de la membrane fongique, que pour celles contenant du cholestérol, essentiellement présent dans les membranes de mammifères (Baginski *et al.*, 2002)

### I.5. Pharmacocinétique

Ambisome est administré en perfusion intraveineuse stricte de 30 à 60 minutes contre 4 h en moyenne avec la forme libre. Les paramètres pharmacocinétiques de cette spécialité sont très différents de ceux de l'AmB conventionnelle :

- ✓ pic plasmatique plus élevé (x 4 à 6), de même que pour l'AUC (x 2), sa petite taille retardant l'élimination par le foie et la rate;
- ✓ volume de distribution (Vd) et clairance plasmatique réduits, en raison d'un temps de résidence prolongé avec une absence de filtration glomérulaire;
- ✓ demi-vie moyenne de 6 à 10 heures. La demi-vie plasmatique de Fungizone® (amphotéricine B), quant à elle, est de 14 jours ;
- ✓ quelle que soit la dose, les taux minimaux restent constants au cours du temps montrant l'absence d'accumulation d'AmB après des administrations répétées, ce qui n'est pas le cas après administration d'AmB conventionnelle, dont le foie semble être le site de stockage le plus important et qui peut être détectée dans les urines plus de 4 semaines après la dernière perfusion (Plats *et al.*, 2005).

### I.6. Toxicité d'AmBisome

AmBisome présente deux principaux effets toxiques, une toxicité aiguë et une toxicité chronique, affectant notamment les reins (Antoniadou *et al.*, 2005).

Des travaux (Adler Moore *et al.*, 2002) ont montré que l'incubation d'AmBisome à 37°C pendant 2h avec des globules rouges avec des concentrations allant jusqu'à 100 mg/L, entraîne l'hémolyse de 5% contre 92% d'hémolyse avec l'AmB libre à une concentration de 1mg/L. Ces résultats suggèrent que seulement 1% d'AmB était libéré d'AmBisome pendant l'incubation.

la dose intraveineuse d'AmBisome causerait la mort de 50% des animaux à des effets toxiques (DL50) a été trouvée 175 mg / kg (Jon *et al.*, 2008).

En fin, il importe de savoir que, les voies de métabolisation de l'AmB après l'administration d'AmBisome ne sont pas connues (Yernault et Demedts, 1997)

## **Chapitre 2 : Stress Oxydatif**



## II.1. Généralité

Contrairement à l'idée répandue par les premières études portant sur la toxicité des radicaux libres, la production d'espèces radicalaires est un phénomène permanent au sein des organismes vivants. L'essentiel de cette production physiologique (pouvant devenir pathologique) est associé au métabolisme cellulaire de l'oxygène et aux réactions d'oxydo-réduction (Cadenas et Davies, 2000 ; Halliwell et Gutteridge, 2007; Mracek *et al.*, 2009).

Malgré leur caractère dangereux, l'organisme les maîtrise par un ensemble de molécules pièges dont les vitamines antioxydantes et d'enzymes comme les superoxydes dismutases et les peroxydases. Malheureusement ce système de contrôle peut se dérégler, dans un type cellulaire ou un tissu précis, par suite d'une surproduction massive ou d'un effondrement des défenses endogènes par suite de carences en micronutriments antioxydants ou d'anomalies génétiques des enzymes antioxydants. : «le stress oxydant va donc résulter d'un déséquilibre de la balance anti et pro-oxydants» (Favier, 1997 ; Pincemail *et al.*, 1999).

## II.2. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Ce sont des espèces chimiques, capables d'existence indépendante, qui peuvent être formées par la perte ou le gain d'électrons à partir d'un composé non radical. Ce sont des espèces chimiques instables, très réactives donc une demi-vie très courte (Goudable et Favier, 1997).

Les radicaux libres peuvent être exogènes, produites par des agents physiques (rayons X et lumière UV) et/ou par des agents chimiques. (Hamadi, 2010) ) Lorsqu'ils sont d'origine endogène, ils sont produits en majorité, au niveau des chaînes respiratoires mitochondriales des cellules des organismes aérobie (Tessier et Marconnet, 1995) lors des réactions d'oxydoréduction qui reposent sur des interactions entre donneurs d'électrons (réducteurs) et des accepteurs d'électrons (oxydants) (Pincemail *et al.*, 2002).

## II.3. Les différents radicaux libres (RL)

### II.3.1. L'anion superoxyde ou $O_2^\circ$

Un des sites de production du plus simple et du plus courant des radicaux libres oxygénés, l'anion superoxyde, est la mitochondrie dans l'organisme au repos (Aurousseau, 2002). On estime qu'environ 2% à 5% de l'oxygène utilisé par la chaîne respiratoire mitochondriale fait l'objet d'une réduction monovalente, qui s'accompagne d'une production d'anion superoxyde  $O_2^\circ$ , ce qui représente environ 250 g/j chez l'homme (Vergely et Rochette, 2003).

L'anion superoxyde résulte de la réduction de l'oxygène par différentes oxydases, en particulier par les NADPH-oxydases microsomiales et plasmatiques, la NADH-déshydrogénase mitochondriale (complexe I de la chaîne respiratoire) et par des composés de type quinones/ semi quinones naturelles, ubiquinone de la chaîne respiratoire (complexe III de la chaîne respiratoire) (Huet et Duranteau, 2008).

### **II.3.2. Le peroxyde d'hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), que l'on retrouve dans « l'eau oxygénée », est produit par la dismutation spontanée ou induite (enzymatique) de l'anion superoxyde (Liu et al., 2002 ; Brookes et al., 2004) ou par la réduction bivalente de l'oxygène par les oxydases (xanthine oxydase, glutathion oxydase, la monoamine oxydase) (Nivière et Fontecave, 1995).

Par ailleurs le peroxyde d'hydrogène a la propriété de traverser les membranes biologiques, propriété que ne possède pas l'anion superoxyde. Le peroxyde d'hydrogène possède un fort pouvoir oxydant, participant indirectement à la toxicité de l'oxygène (Babior, 2000).

### **II.3.3. Le radical hydroxyle •OH**

Le radical hydroxyle est produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence de catalyseurs minéraux (fer ou cuivre). (Nivière et Fontecave, 1995 ; Arousseau, 2002 ; Vergely et Rochette, 2003).

Le radical hydroxyle possède une très grande réactivité dans les milieux biologiques, pouvant se « combiner » avec presque tous les composants cellulaires, par échange d'électron, addition sur des doubles liaisons ou arrachement d'un atome d'hydrogène. (Huet et Duranteau, 2008 ; Rochette, 2008)

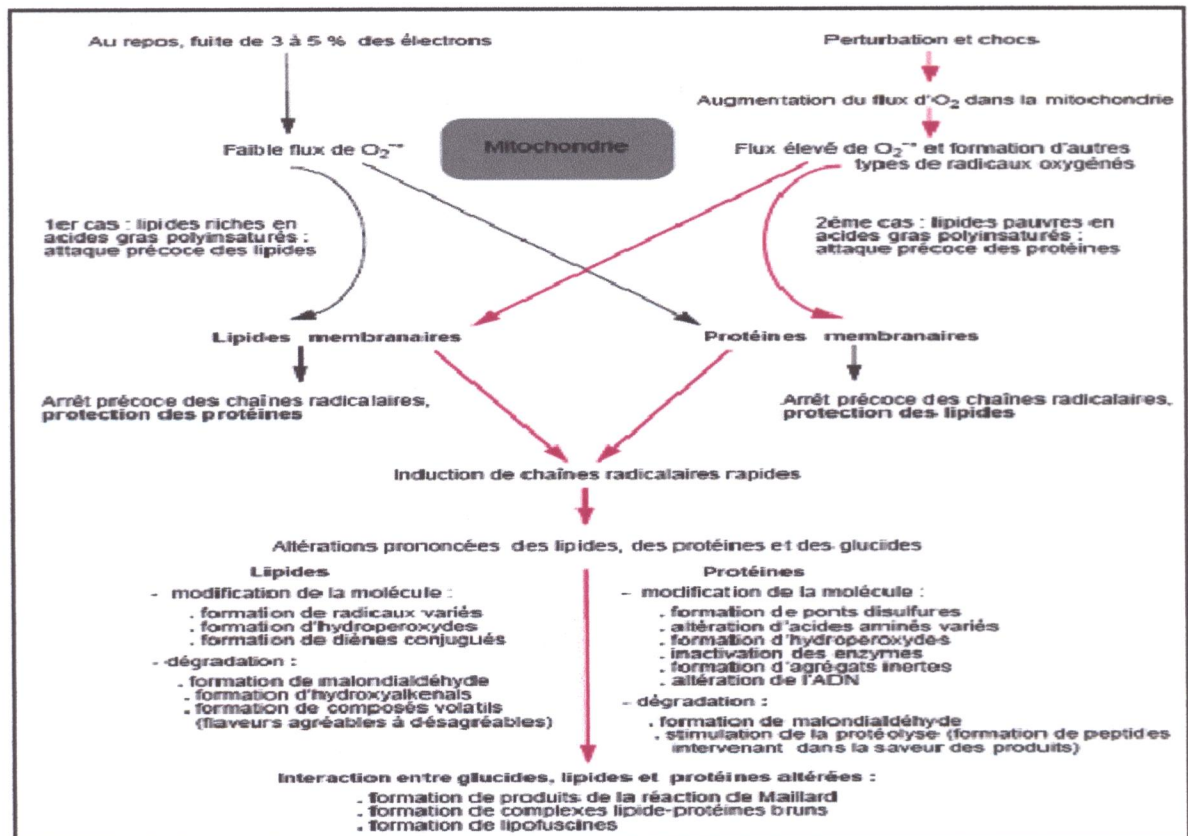
### **II.3.4. Le peroxyde d'azote**

L'anion superoxyde peut réagir directement avec la forme réactive azotée NO (ou monoxyde d'azote), pour donner le peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ), puissant agent prooxydant (Morena et al., 2002)

Le Peroxyde d'azote provoque des lésions tissulaires très graves en plus de l'oxydation des LDL. Il est capable d'oxyder les protéines et les bases azotiques des brins d'ADN par une grande similarité avec le radical hydroxyle (Hamadi, 2010)

## II.4. Les marqueurs du stress oxydatif

Les radicaux libres oxygénés peuvent interagir avec des protéines, de l'ADN, des lipoprotéines et des acides gras polyinsaturés (Figure 5) pour former des dérivés oxydés pouvant être décelés dans des échantillons biologiques comme le plasma, le sérum ou l'urine (Pincemail *et al.*, 1999).



**Figure.5: Altération des constituants membranaires par les radicaux libres (Aurousseau, 2002).**

### II.4.1. Oxydation des protéines

La fonction et l'activité des protéines peuvent être affectées par altération de leur structure complexe, en particulier par oxydation (Hamadi, 2010).

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des ROS. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng *et al.*, 2007)

Il importe de savoir que les deux principaux marqueurs biologiques de l'oxydation des protéines sont la formation de carbonyles protéinés et de groupes nitrotyrosines. Les carbonyles protéinés sont formés lorsque les espèces réactives de l'oxygène attaquent les résidus d'acides aminés (Hamadi ,2010).

#### **II.4.2. Peroxydation lipidique**

Les acides gras polyinsaturés (RH) comme les acides linoléiques ou arachidonique sont les cibles privilégiées des ROS. Dans une première étape, ils se transforment en peroxydes lipidiques (ROOH) (Pincemail *et al.*, 1999). Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Les hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution : être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes acides et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). (Favier, 2003).

L'attaque des phospholipides membranaires modifiant la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux (Hamadi ,2010).

### **II.5. Systèmes de défense antioxydants**

Les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat, et dont les produits de la réaction entre l'oxydant et l'antioxydant ne doivent pas être toxiques et ne branchent pas la réaction radicalaire (Midou, 2011)

#### **II.5.1 Antioxydants enzymatiques**

- *Les superoxydes dismutases (SOD)*

Les superoxydes dismutases sont des enzymes antioxydantes les plus importantes dans la défense contre le stress oxydatif. Elles catalysent la dismutation du superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (Hamadi ,2010) et permettent ainsi d'éliminer les radicaux superoxydes mais provoquent l'apparition de peroxyde d'hydrogène diffusible et dangereux à distance.

- *Les Catalases :*

La catalase est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques. Elle est principalement située dans les peroxysomes de

tous les types cellulaires de mammifères où  $H_2O_2$  est généré par les différentes oxydases (Hamadi , 2010) .

### II.5.2 Antioxydants non enzymatiques

Les antioxydants naturels doivent être considérés comme des protecteurs indispensables; ils sont classés en tenant compte de leur structure chimique et de leur localisation extracellulaire ou intracellulaire. Ils existent sous la forme de vitamines (A, C, E, acide folique) de métaux (sélénium, zinc) (Rochette, 2008) et de composés phénoliques (Midoun , 2011).

- *La vitamine E*

D'un point de vue biologique, deux isomères sont particulièrement intéressants, l' $\alpha$ - et le  $\gamma$ -tocophérol (Hamadi ,2010 ; Haleng *et al* ., 2007) qui se retrouvent en quantité variable dans les huiles (soja, maïs, olive) et dans les noix et noisettes.

Le caractère hydrophobe de cette vitamine lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines, où elle joue un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant (Hamadi ,2010).

- *La vitamine C (acide ascorbique)*

C'est l'un des principaux antioxydants hydrosolubles présent dans les fluides intra- et extracellulaires. La vitamine C peut directement réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme  $HO\bullet$  ou  $O_2\bullet$ . Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (Midoun , 2011) pour aider à prévenir l'oxydation des lipides (Hamadi , 2010).

- *Le glutathion*

Le glutathion est un tripeptide, dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques. En situation de stress oxydant, son rôle protecteur et détoxifiant réside principalement dans sa fonction de co-substrat des glutathion peroxydases. Mais il fait aussi l'objet d'interactions synergiques avec d'autres composants du système de protection antioxydante (Hamadi ,2010).

- *Le  $\beta$ -carotène*

Le  $\beta$ -carotène est apporté par l'alimentation, il est doué de plusieurs propriétés : précurseur de la vitamine A, et capteur de l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène. Avec les autres

caroténoïdes, il a le pouvoir de terminer les réactions en chaîne de lipoperoxydation. Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante : il s'oppose à la cytotoxicité et à la génotoxicité de nombreux agents (Goudable et Favier, 1997).

- *Les flavonoïdes*

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des ROS (Haleng *et al.*, 2007). Ils agissent par deux mécanismes d'action soit par :

- ✓ chélation des métaux de transition comme le fer et le cuivre (quercétine, catéchine).
- ✓ capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes (Midoun, 2011).

Parmi les sources les plus connues des flavonoïdes, on trouve la propolis qui est un produit de la ruche.

En effet, la propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, (Jean, 2007) collectée par les abeilles à partir des bourgeons et des exsudats des arbres et des plantes. Cette substance est ensuite mélangée avec du pollen et des enzymes secrétées par les abeilles (Nair, 2014) qui l'utilisent pour colmater les fissures et les trous de leur ruche, et pour embaumer les cadavres des abeilles et d'autres insectes (Jean, 2007).

La composition chimique de la propolis est très complexe et variable, elle est représentée par plus de 150 composés (Nair, 2014). Cette variabilité dépend de la diversité géographique, de la flore locale, et aussi de la variation saisonnière (Potkonjak *et al.*, 2012 ; Jean, 2007). En général, la propolis est constituée de résines (50%), de cires (30%), de pétroles essentiels (10%), de pollen (5%) et 5% de divers composés organiques ou minéraux (Derevici *et al.*, 1964).

Selon Wagh et Borkar (2012), la propolis rassemble plus de 300 constituants appartenant aux groupes des flavonoïdes, des acides benzoïques et leurs dérivés, les dérivés d'aldéhyde benzoïque, des composés phénoliques, des composés terpéniques, des acides gras aliphatiques, de sucres et d'acides aminés.

La propolis est connue depuis longtemps pour ses propriétés antibiotiques, antifongiques, antigerminatives, antimutogènes, anesthésiques et cicatrisantes. C'est la raison pour laquelle on la trouve très souvent associée à d'autres produits avec des résultats satisfaisants en thérapeutique humaine et vétérinaire, en dermatologie, gynécologie, stomatologie (Derevici *et al.*, 1964) et dans le traitement de diverses maladies tels que les problèmes cardiovasculaires, le cancer, les ulcères (Ferhoum, 2010).



## **Matériel et méthodes**



Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire de pharmacologie, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de l'Université de Jijel. Il a porté sur l'étude de l'effet protecteur de la propolis contre les effets oxydatif généré par l'AmB liposomale ou AmBisome.

### **Partie 1 : Etude *in vitro***

La propolis utilisée dans ce travail a été récoltée dans la wilaya de Jijel au sein de la «Coopérative Apicole de Kaous, Jijel» par les apiculteurs et l'extraction de composés actifs a été effectuée au sein du laboratoire de recherche de toxicologie Moléculaire « LTM ».

#### **1. Dosage des polyphénols**

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin Ciocalteu (McDonald *et al.*, 2001).

Un aliquote dilué dans l'eau distillée de chaque extrait (100µL) est mélangé à 500µL de réactif de Folin Ciocalteu (dilué au 1/10<sup>ème</sup>). Après 5min, 400µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75g/l dans de l'eau distillée) sont ajoutés au mélange réactionnel suivi d'une incubation à l'abri de la lumière pendant 30min. L'absorbance est déterminée au spectrophotomètre à 765nm.

La quantité de composés phénoliques totaux a été déterminée par l'étalon réalisé avec différentes concentrations d'acide gallique dans le méthanol: eau (50:50, v/v) (0-200 µg/ml). Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

#### **2. Dosage des flavonoïdes totaux (Yi *et al.*, 2007)**

1ml de l'échantillon (préparé dans le méthanol avec les dilutions convenables) est ajouté à 1ml de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2% dans le méthanol). Le mélange est vigoureusement agité et l'absorbance est lue à 430nm après 10min.

Une courbe d'étalonnage établie (quercétine : 0 - 40 µg/ml), réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons, servira à la quantification des flavonoïdes. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg Eq Q/mg d'ext).



### 3. Etude du pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de propolis

L'activité anti-radicalaire de l'extrait de propolis a été évaluée *in vitro*, par le test au DPPH°. Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical stable possédant, en solution, une absorption caractéristique à 517nm qui lui confère une coloration violette. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH° est réduit par un capteur de radicaux libres (Brand-Williams et al., 1995).

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont portés par rapport à un antioxydant de référence, à savoir la quercétine et l'acide gallique. Deux approches ont été employées pour évaluer le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de propolis :

#### 3.1. Analyse qualitative par CCM (Takao et al., 1994)

Pour dépister l'activité anti-radicalaire de l'extrait de propolis, une CCM (silica gel, support -aluminium, 10x5cm, Merck) a été effectuée. 10µl (extrait ou étalon) sont déposés via un capillaire, puis la plaque est développée par le système de solvants, n-Butanol - Acide acétique - Eau (30 : 10 : 60 v/v/v).

Après migration, le chromatogramme a été séché, puis révélé à l'aide d'une solution de DPPH° (0.1% dans le méthanol). Les constituants de l'extrait présentant une activité anti-radicalaire apparaissent sous forme de spots de couleur Jaune-blanc sur fond violet.

#### 3.2. Analyse quantitative

La méthode décrite par Tepe et al., (2006) a été employée. Différentes concentrations comprises variant de 0mg/ml jusqu'à 50 mg/ml de l'extrait aqueux sont testés.

Des volumes (50 µl) de chaque extrait aqueux contenant des composés actifs ont été incubés avec 2 ml d'une solution méthanolique de DPPH° (3 mg de DPPH° dans 100 ml de méthanol) pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante. Les absorbances ont été enregistrées à 518 nm.

### Calcul du pourcentage d'inhibition (% I) et de la concentration inhibitrice 50 (IC<sub>50</sub>)

L'effet piègeur est déterminé en pourcentage de réduction du DPPH° en prenant le 100% du control (DPPH° seul) selon la relation suivante:

$$\%I = \left( \frac{A_C - A_E}{A_E} \right) \times 100$$

$A_C$  : Absorbance du contrôle (tube contenant du DPPH en présence de méthanol et absence de tout composé actif).

$A_E$  : Absorbance de l'essai.

La concentration inhibitrice minimale (IC<sub>50</sub>) est estimée par extrapolation à I = 50% en traçant la courbe, % I = f (concentration).

## Partie 2 : Etude *in vivo*

### 1. Animaux et conditions d'hébergement

Des rats de souche *Wistar albinos*, fourni par l'Institut Pasteur d' Alger sont inclus dans l'étude.

Dès leur réception, les rats sont répartis aléatoirement par groupe de 5 dans des cages rectangulaires standard et laisser pendant une semaine avant de le début du traitement (d'acclimations). Une pesée des rats est réalisée avant le traitement.

### 2. Traitement des rats

Les animaux ont été répartis en 3 lots chacun de 5 rats:

- ✓ *Lot 1*: lot témoin négatif : animaux recevant pendant 5 jours par voie orale (per os) l'eau de robinet.
- ✓ *Lot 2*: animaux recevant pendant 4 jours par voie orale l'eau de robinet. L'AmBisome à la dose de 5mg/kg est administré au 5<sup>ème</sup> jour, par voie intrapéritoniale (IP).
- ✓ *Lot 3*: animaux recevant quotidiennement par gavage l'extrait de la propolis 100mg/kg/j pendant 5jours. L'AmBisome à la dose de 5mg/kg est administré au 5<sup>ème</sup> jour par IP.

24 heures plu tard, les rats sont euthanasiés par inhalation des vapeurs du chloroforme, puis la paroi abdominale est ouverte, les reins sont prélevés, pesés et congelés à -20°C pour réaliser les dosages tissulaires.

### 3. Dosage tissulaires

#### 3.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) ou test TBARS (Ohkawa et al., 1979)

##### Principe

La réaction de dosage du MDA, décrite par *Kohn* et *Liversedge*, en 1944, précisée par *Patton* et *Kuntz* en 1951, repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment absorbant à 532nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol. La réaction colorée, observée avec le TBA, mesure non seulement le MDA préexistant, mais aussi le MDA formé de manière artéfactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et de ceux générés au cours même de la réaction. Le résultat du dosage du MDA par le TBA est donc la somme du MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec le TBA en milieu acide et à chaud. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du MDA s'est substituée la notion de « substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique » (thiobarbituric acid reactive substances ou TBARS) (*Lefèvre et al.*, 1998 ; *Laguerre et al.*, 2007).

##### Déroulement de l'expérience

Les reins sont plongés et lavés dans du NaCl 0.9% glacé (4°C) pour éliminer le sang puis coupé en morceaux et abondamment rincé à nouveau pour éliminer un maximum de sang et les morceaux de rein sont ensuite finement broyés dans un Potter en verre avec du KCl 1.15% (1 g tissu/ 9 ml KCl 1.15%).

À 0.5 ml de l'homogénat brut est ajoutés 0.5 ml de TCA 20% et 1 ml de TBA (0.67% dans NaOH 50 mM). Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15min, refroidi à l'eau de robinet pour stopper la réaction puis 4 ml de n-butanol sont ajoutés et le tout est centrifugé pendant 15 minutes à 3000rpm. L'absorbance du surnageant est lue à 534nm contre un blanc fait avec 0.5ml d'eau distillée de la même façon que l'échantillon.

La valeur de TBARS est définie comme étant la quantité de MDA, exprimée en  $\mu\text{M}$ , présente dans 1g d'échantillon.

#### 3.2. Dosage du glutathion (*Sedlak et Lindsay, 1967*)

##### Principe

Pour l'évaluation du taux de glutathion réduit chez les rats, nous avons utilisé la méthode de *Sedlak et Lindsay*, (1967) utilisant le réactif d'Ellman. Il s'agit d'une réaction chimique évoluant en une seule étape suivie d'une détection colorimétrique.

Le réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou DTNB est réduit par les groupes thiol (SH) pour donner une mole d'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque par mole de SH. L'acide mercaptobenzoïque est un anion ayant une intense coloration jaune et par conséquent peut être utilisé pour évaluer les groupes thiols (SH).

### ***Déroulement de l'expérience***

0.4 g de rein sont coupés et homogénéisés dans 8ml EDTA 0.02M. A 0.5 ml de l'homogénat sont ajoutées 1.5 ml de tampon Tris 0.2M (pH8.2 dans EDTA 0.02M) et 0.1ml de DTNB 0.01M en méthanol absolu. Le volume est complété à 10ml par du méthanol absolu, puis incubé pendant 15min à température ambiante. Le mélange est centrifugé à 3000rpm pendant 15min. L'absorbance du surnageant est lue à 412 nm contre le blanc (0.5 ml eau distillée + 1.5 ml 0.2M Tris + 0.1 ml DTNB 0.01M).

### ***3.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique***

#### ***Préparation de la fraction cytosolique***

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par Iqbal *et al.*, (2003). Pour cela, 0.5g du rein sont coupés et homogénéisés avec trois (03) volumes de tampon phosphate (0,1 M; pH 7,4) contenant du KCl (1,17 %) à l'aide d'un homogénéisateur de DOUNCE. L'homogénéisation est réalisée à 4°C. L'homogénat obtenu est centrifugé à 2000rpm pendant 15 minutes à 4°C (centrifugeuse 55702 BIOBLOCK SCIENTIFIC; Italy) pour séparer les débris nucléaires. Le surnageant obtenu est centrifugé à 9600rpm pendant 30 minutes à 4°C (Centrifugeuse Sigma 1-14; Germany), et le surnageant final est utilisé comme source enzymatique.

#### ***Principe de mesure***

L'activité catalasique a été mesurée selon la méthode de Claiborne, (1985) par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après addition de l'extrait cellulaire, mesurée à 240 nm pendant 1 min à 25°C, cette diminution étant due à la dismutation du peroxyde d'hydrogène par la catalase.

#### ***Déroulement du dosage***

Dans un volume final de 2ml de tampon phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1M, pH7.2), on ajoute 0.950ml de peroxyde d'hydrogène (0,019 M). La réaction est déclenchée par addition de 0.025 ml de la source d'enzyme (le cytosol). L'absorbance est lue à 240 nm chaque minute pendant deux minutes.

La catalase étant une enzyme à cinétique non michaélienne, donc non saturable, l'activité catalase sera estimée en calculant la constance de vitesse de premier ordre de disparition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Aebi, 1982).

La constance de vitesse de disparition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (k) est définie telle que :

$$K = \frac{\left( \frac{2.3033}{T} \text{Log} \left( \frac{A_1}{A_2} \right) \right)}{g \text{ protières}}$$

Avec :

$T \Rightarrow$  Intervalle du temps (min).

$A_1 \Rightarrow$  Densité optique à l'instant  $t_0$ .

$A_2 \Rightarrow$  Densité optique à l'instant  $t_1$ .

#### 4. Analyse statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Le test de Student est utilisé afin de déterminer s'il existe des différences significatives entre les différents groupes d'animaux. Toutes les analyses sont réalisées au seuil de signification de 5% Le logiciel Excel 2007 (microsoft, USA) a été utilisée.



## **Résultats et discussion**

### 1. Dosage des polyphénols totaux

La spectrophotométrie UV/Vis a permis de quantifier le taux des polyphénols présent dans l'extrait de propolis par la méthode de Folin-Ciocalteu.

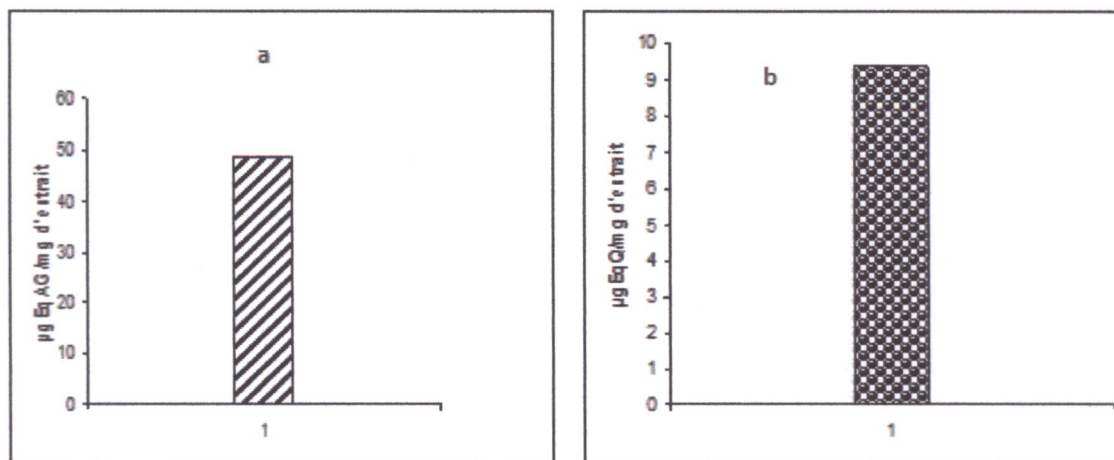


Figure 5 : Histogramme représentant la teneur en polyphénols (a) et en flavonoïdes (b) dans l'extrait de propolis

La figure 5a présente la teneur en phénols totaux déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu dans l'extrait de propolis, teneur exprimée en µg équivalent d'acide gallique/mg d'extrait sec.

Les résultats indiquent que la teneur en polyphénols totaux dans l'extrait éthanolique de propolis est de l'ordre de 48 µgEqAG/mg, cette valeur est en accord avec la littérature (Ferhoum *et al.*, 2012), qui ont montré que la propolis de Dellys présente une teneur de 48,79 µgEqAG/mg. En comparant avec d'autre étude qui a été réalisée sur la propolis du Portugal par Moreira et ses collaborateurs (2008), nous avons constaté que la teneur de notre extrait éthanolique de propolis en polyphénols est plus faible par rapport à ses résultats (151,00 µgEqAG/mg). Ceci s'expliquerait par l'influence de la région géographique sur la composition en polyphénols de la propolis (Ghedira *et al.*, 2009). En outre, le dosage des polyphénols totaux par le test Folin-Ciocalteu implique que toutes les molécules réductrices, comme les sucres réducteurs ou la vitamine C, sont dosées, ce qui par conséquent rend ce dosage non sélectif vis-à-vis des polyphénols en surestimant les valeurs obtenues (Fukushima *et al.* 2009).

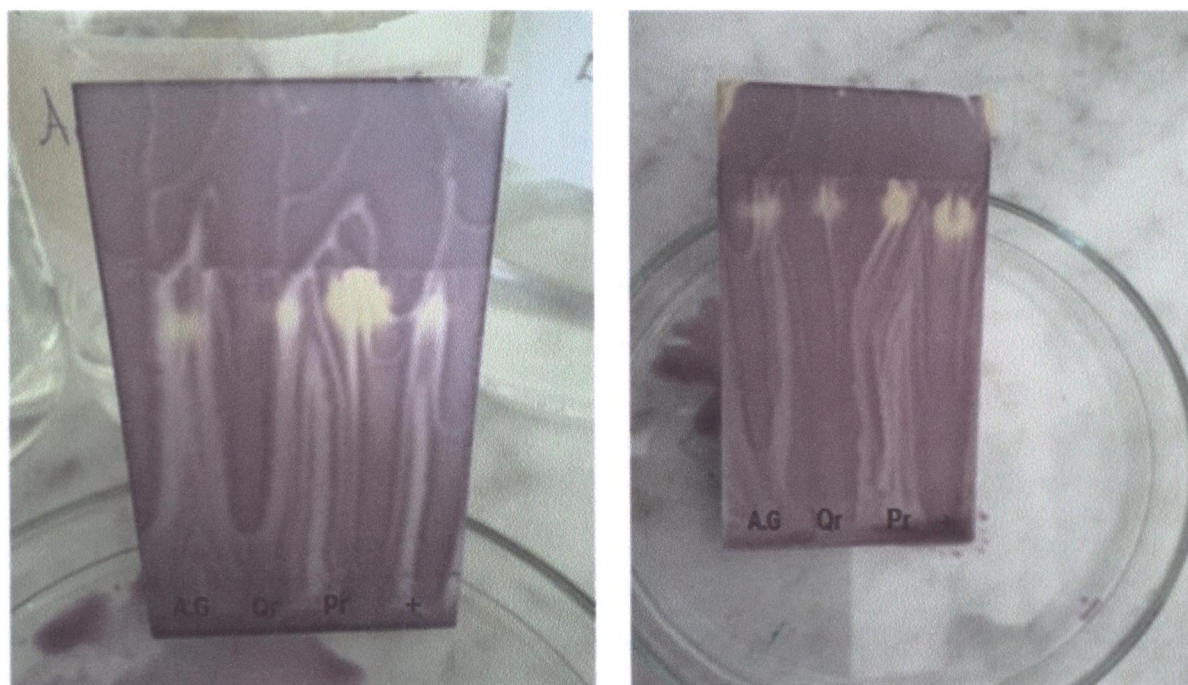
Le dosage des flavonoïdes (Figure 5b) déterminée par la méthode de Dowd a été exprimée µg équivalent de Quercétine /mg d'extrait sec (µg EQ/mg d'extrait).

La teneur en flavonoïdes été de 9.38 µg EQ/mg d'extrait. Cette résultat est proche des résultats obtenus par Ferhoum et ses collaborateurs (2012) qui ont trouvé que la propolis

Saharienne présente 10,03  $\mu\text{g EQ} / \text{mg}$  de propolis brute, et Mitidja 2008 (13,33  $\mu\text{g EQ/mg}$  de propolis brute).

### 2. Activité anti-radicalaire

L'activité anti-radicalaire des deux extraits a été testée sur CCM avec le DPPH°. L'apparition de taches jaune-pâles sur fond violet (Figure 6) montre que l'extrait de propolis renferme des composés capables de piéger des radicaux libres (Cardinault *et al.*, 2012).



Les spots au cours de migration

Les spots à la fin de migration

Figure 6: représentation d'analyse qualitative par CCM de l'extrait de propolis avec les références (quercétine, l'acide gallique et le mélange de l'acide gallique avec la quercitine).

Pour quantifier l'activité anti-oxydante de l'extrait de propolis, nous avons étudié la cinétique de décoloration d'une solution de DPPH° en présence de différentes concentrations d'extrait de propolis. En outre, comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont portés par rapport à un antioxydant de référence, à savoir l'acide gallique et la quercétine (Popovici *et al.*, 2009).



L'étude de la cinétique nous a permis de tracer deux types de courbes, une représente la variation du taux d'inhibition en fonction de la concentration (Figure 7) afin de déterminer l'IC50, et l'autre représente le taux d'inhibition en fonction du temps (Figure 8) afin de calculer le temps nécessaire pour atteindre l'IC50.

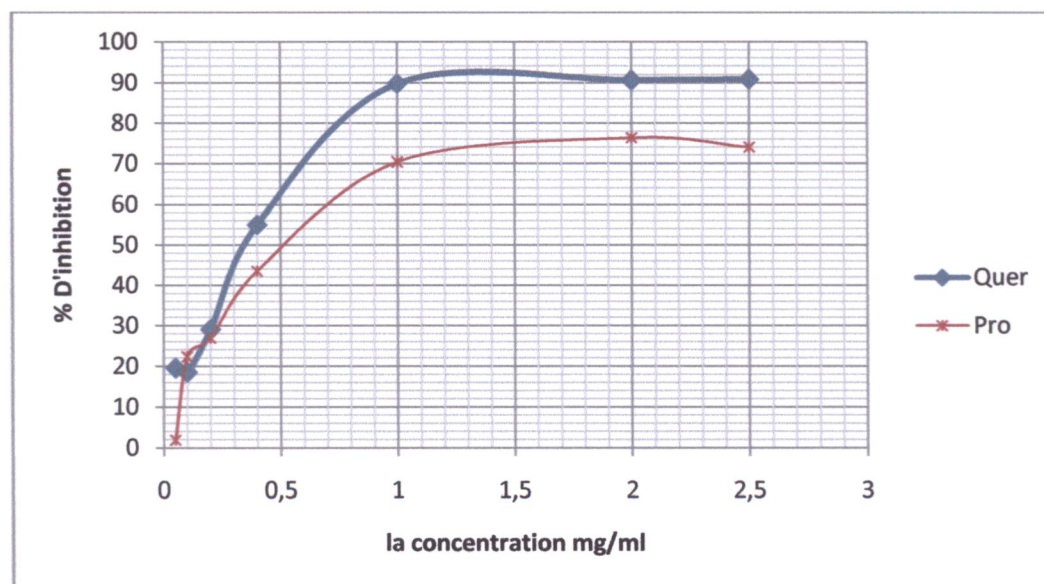


Figure 7. Effet scavenger contre le radical DPPH° de l'extrait éthanolique de propolis à différentes concentrations

Les profils cinétiques obtenus révèlent que l'activité anti-radicalaire est fortement dépendante de la concentration. Plus le composé antioxydant est concentré, plus la baisse de l'absorbance est importante (Moreira *et al.*, 2008).

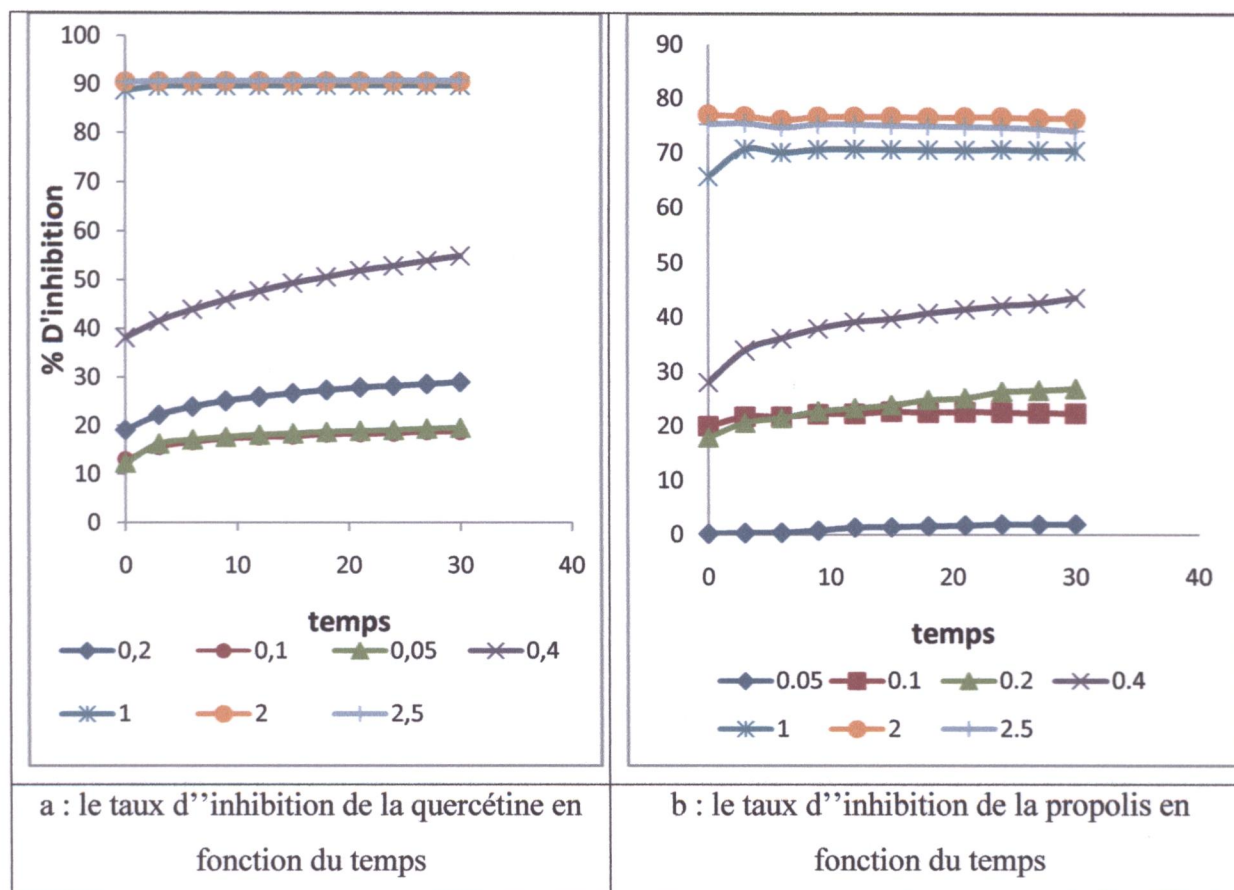


Figure 8 .Représentation du taux d'inhibition radicalaire de la propolis et la quercétine en fonction du temps.

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, la concentration effective de l'antioxydant qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH• dans le milieu réactionnel est déterminée. IC50 de l'extrait de propolis était de 0,48 mg/ml, valeur corroborée par la littérature (Dattatraya *et al.*, 2009), contre (0.35 mg/ml de la quercétine. La propolis représente le composé le moins actif. Ceci s'expliquerait par le fait que la propolis est un mélanges de composés bioactifs est par conséquent il peut y avoir un effet de synergie et/ou négatif (Popovici *et al.*, 2009).

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, le temps nécessaire pour atteindre IC50 a été déterminé afin d'avoir une idée sur la rapidité avec laquelle l'antioxydant élimine les radicaux libres. En effet, il se peut qu'un composé ayant une faible IC50 peut présenter un temps long pour éliminer les ROS.

Nos données montrent que le temps pour atteindre IC50 pour l'extrait de propolis (42 min) est supérieur par rapport à la quercétine (15min). Ainsi, la combinaison du temps avec l'IC50 laisse suggérer que la propolis est moins active qu'un flavonoïde pur. Certains auteurs supposaient que la

capacité de la quercétine à piéger les radicaux libres est en relation directe avec la présence d'une structure O-dihydroxybenzène qui est considérée comme un caractère essentiel pour avoir une activité anti-oxydante importante (Zeghad., 2009).

Cependant, notre étude confirme une certaine corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-radicalaire, mise en évidence dans un grand nombre des travaux (Angelov *et al.*, 2008 ; Makris *et al.*, 2007 ; Berrin *et al.*, 2008).

### 3. Dosage tissulaire

#### 3.1. Test TBARS

La peroxydation lipidique résulte de la dégradation des hydroperoxydes formés au cours de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Guichardant *et al.*, 2006). L'augmentation du taux de ce dernier est considérée comme indicateur du stress oxydatif résultant d'une surproduction de ROS et de la diminution des défenses anti-oxydantes (Favier, 2003).

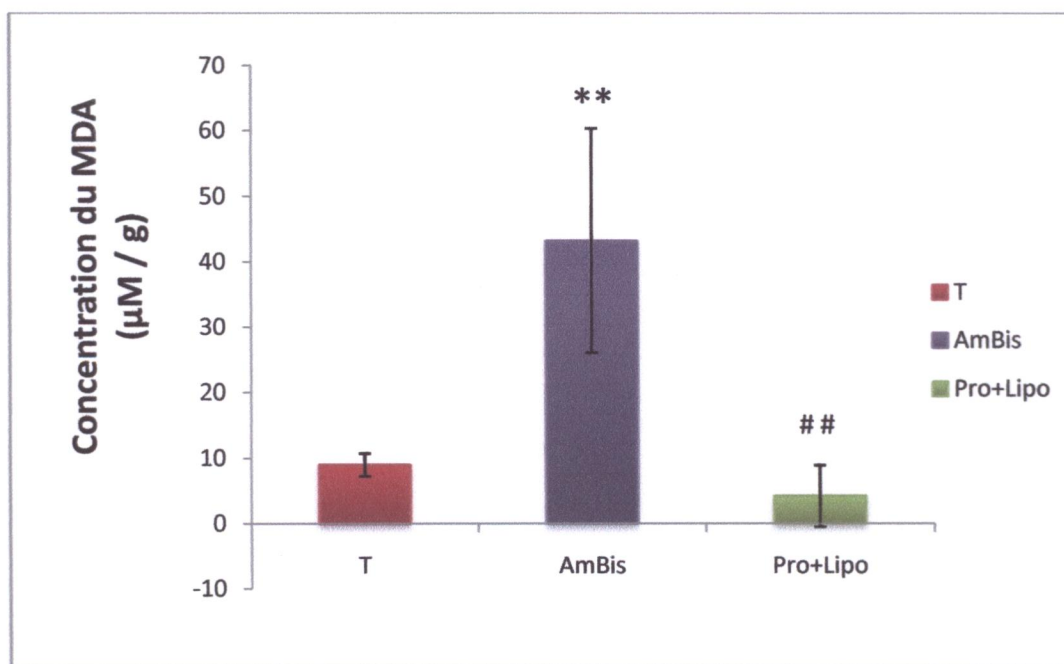


Figure 9. Variation des taux du MDA après administration de l'AmBisome seule ou en association avec un traitement par l'extrait de propolis.

(\*) comparaison avec les animaux témoins, (##) comparaison avec les animaux traités par l'AmBisome Teste de student : (\*\*) ou (##) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ).

La figure 9 représente les variations du taux du MDA. Nous avons enregistré une augmentation très significative ( $p < 0,01$ ) du taux de MDA qui atteint  $43,22 \pm 17,11 \mu\text{M/g}$  chez les rats traités uniquement par l'AmBisome ( $5\text{mg/kg}$ ) par rapport aux taux enregistrés chez les animaux témoins ( $8,99 \pm 1,75 \mu\text{M/g}$ ). Cette augmentation est en faveur d'une production de radicaux libres provoquée par AmBisome dans le tissu rénal (Altuntas *et al.*, 2014).

Par contre, nous avons enregistré une diminution très significative des taux du MDA qui atteint  $4,22 \pm 4,71 \mu\text{M/g}$  chez les groupes d'animaux recevant l'extrait éthanolique de la propolis avant le traitement médicamenteux. Ce qui prouve l'effet préventif de l'extrait de propolis (Sestili, 1998).

Effet antioxydant de l'extrait de propolis peut être attribué aux polyphénols et notamment les flavonoïdes (Figure 6), composés réputés pour être de bons piègeurs de ROS à leur capacité de piéger les radicaux libres (Hsu, 2006). Ces composés agissent comme agents réducteurs et donneurs d'hydrogène, au cours de leur mécanisme de piégeage des radicaux libres (Hennebelle *et al.*, 2004).

### 3.2. Taux glutathion (GSH)

La concentration intracellulaire en glutathion (GSH) est considérée par certains auteurs comme un véritable marqueur de l'état de santé d'un individu (Boutolleau *et al.*, 1997) ; il est le système biologique antioxydant le plus important contre les ROS. (Gardès-Albert *et al.*, 2003)

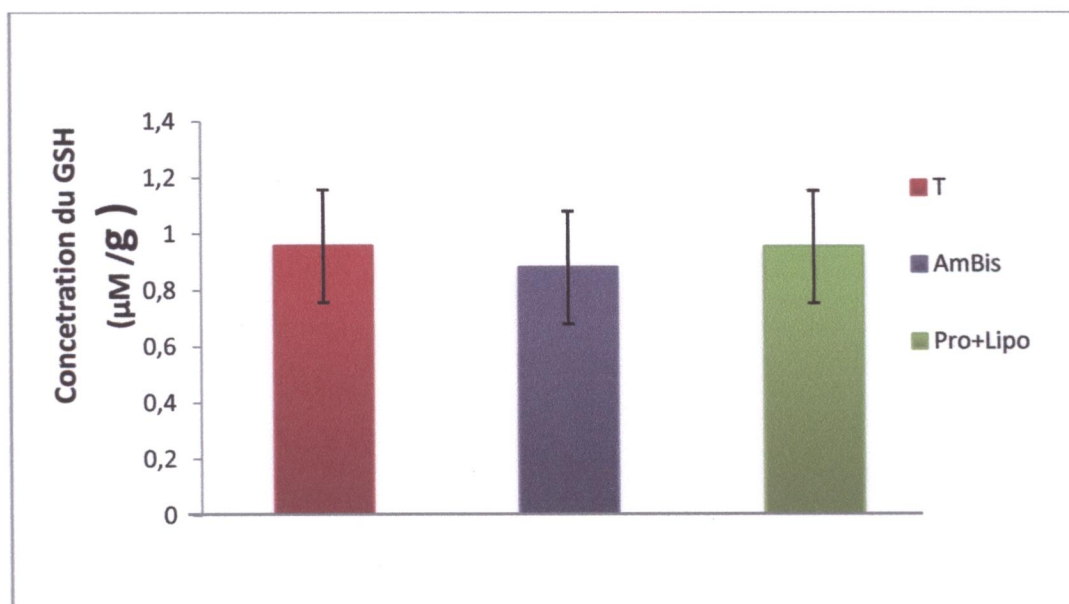


Figure 10. Variation des taux du GSH après administration de l'AmBisome seule ou en association avec un traitement par l'extrait de propolis.

Nos résultats (figure 10), démontre que l'administration d'Ambisome seule, entraîne une déplétion des réserves tissulaires du GSH ( $0,88 \pm 0,31 \mu\text{M} / \text{g}$  du rein) par rapport aux témoins ( $0,95 \pm 0,17 \mu\text{M} / \text{g}$  du rein). Cependant cette diminution est non significative. Cette diminution peut être attribuée à une faible production de ROS.

Le prétraitement des rats par l'extrait de propolis, à permet de normaliser le taux tissulaire de GSH ( $p > 0,05$ ), ce qui démontre l'éventuel effet bénéfique de la propolis, effet pouvant être lié au pouvoir de piègeur de Ros exercé par les polyphénols et essentiellement les flavonoïdes de l'extrait éthanolique (Benguedouar *et al.*, 2007). D'autre part, cet effet peut être du à la capacité de cet extrait à provoquer la synthèse et /ou la génération du GSH après sa consommation à partir de GSSH suite au attaque radicalaire induit par le médicament, pour maintenir son taux normal (Martin, 2003).

En fin, l'absence de différence significative dans le contenu rénal de GSH entre témoins et traités pourrait être due d'une part, à l'intervention compensatrice d'autres systèmes antioxydants en réponse à un stress oxydatif. D'autre part, l'augmentation de la consommation enzymatique et non enzymatique du GSH pour la détoxification des ROS générés par Ambisome entraîne une élévation dans l'expression du gène codant pour l'enzyme  $\gamma$ -glutamyl-cystéine synthétase d'où une augmentation de l'activité de cet enzyme responsable de la restitution du taux cellulaire du GSH (Yin *et al.*, 1998).

### **3.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique**

La catalase (CAT) fait partie des enzymes appartenant au système de défense antioxydant. Elle représente le système le plus performant dans le contrôle de la concentration du peroxyde d'hydrogène et son rôle consiste en la dismutation de deux molécules du  $\text{H}_2\text{O}_2$  afin d'atténuer l'état oxydé (Sorg, 2004).

Les variations de l'activité de la catalase cytosolique au niveau rénale après traitement par l'AmBisome seule ou en association avec l'extrait éthanolique de la propolis sont reportées dans la figure 11.

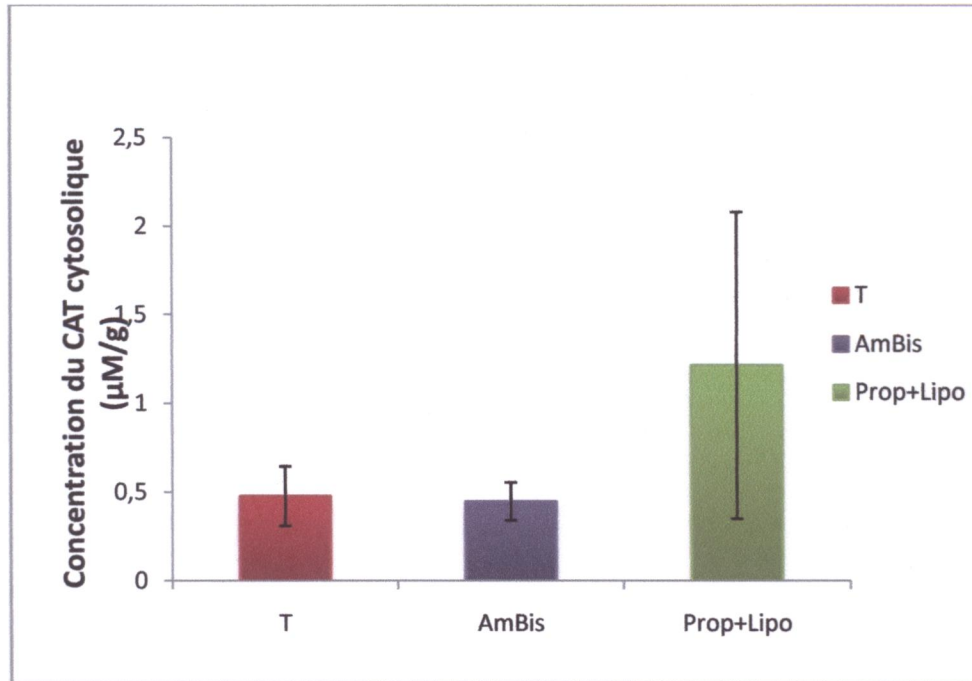


Figure 11 : variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique.

Nos résultats montrent une inhibition de l'activité enzymatique de la catalase ( $0,44 \pm 0,10$   $\mu\text{M/g}$ ) chez les rats traités par ambisome par rapport aux témoins ( $0,47 \pm 0,16$   $\mu\text{M/g}$ ). Cette inhibition est non significative. Cependant, cette inhibition s'expliquerait par l'accumulation de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les tissus suite à une production de ROS (figure MDA) (Sathishskar et subramania, 2005 ; Arafat *et al.* 2005; Koti *et al.* 2009).

Le prétraitement des rats par l'extrait éthanolique de propolis a restauré l'activité de l'enzyme (kebsa, 2006). Nos données sont partiellement en accord avec la littérature (Altuntas *et al.*, 2014) qui ont montré que l'AmB libre inhibe significativement la catalase alors qu'un prétraitement par un polyphénol (acide phényl ester caféique) lève cette inhibition.

L'AmBisome induit une néphrotoxicité légère qui peut être due à l'interaction de ce médicament avec les fonctions mitochondriales. Le métabolisme d'AmBisome nécessite d'abord son internalisation par endocytose par les cellules. Une fois à l'intérieure, l'AmB est libérée du liposome où elle va agir sur les membranes par la formation des pores. En outre, la molécule est métabolisée par le cytochrome P 450 avec génération de métabolites réactif (Inselmann *et al.*,

2000). La combinaison de ces deux phénomènes, entraîne la perte de la fluidité membranaire, la destruction de la microarchitecture membranaire, la peroxydation des acides gras polyinsaturés et la libération massive du MDA (anonyme, 2004). Ces métabolites vont altérer également la chaîne de transfère des électrons conduisons à la production massive des espèces réactives de l'oxygène, ce qui mène à la consommation du GSH, à la destruction des enzymes antioxydants à savoir la CAT cytosolique.



## **Conclusion et Perspectives**





## **Conclusion et perspective**

En dépit des progrès considérables en ces dernières années, les taux de morbidité et la mortalité due aux infections fongiques envahissantes sont toujours inadmissiblement élevés. Pour réduire la toxicité de ces molécules, la vectorisation dans des liposomes est un alternatif qui a donné de bonnes résultats. Ainsi, L'AmB a été encapsulé dans des liposomes de 2<sup>ème</sup> génération pour donner AmBisome, formulation ayant moins d'effets secondaires que l'AmB libre. Cependant, pour une meilleure innocuité du médicament, l'utilisation de molécules antioxydantes s'avère très efficace.

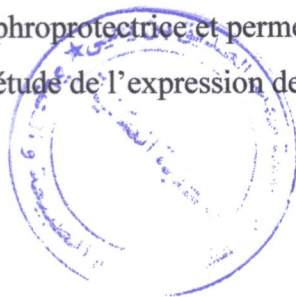
Notre travail, est entrepris dont le but d'explorer le mécanisme de toxicité d'AmBisome à travers le dosage de quelques paramètres du stress et l'utilisation de la propolis pour lutter contre le stress oxydatif. Nos résultats ont démontré que :

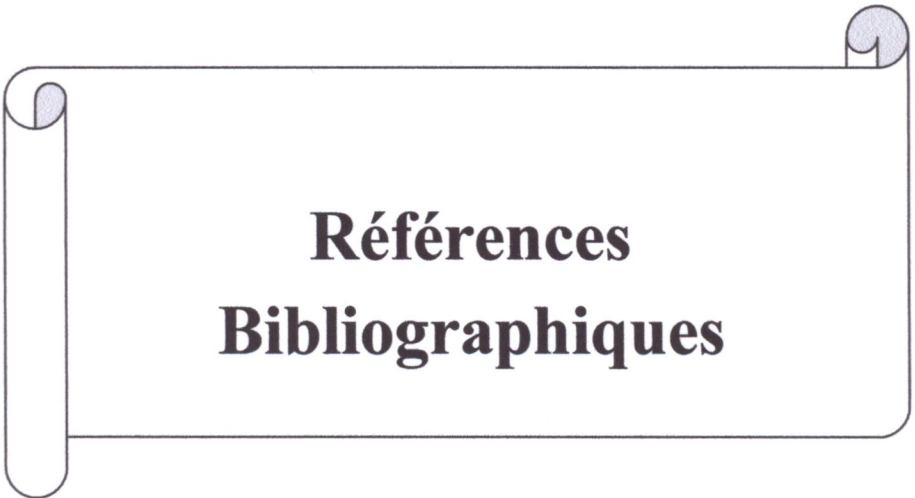
- L'extrait de propolis est riche en composé phénoliques doués d'activité anti-radicalaire.
- In vivo, nos résultats ont montré que l'AmBisome entraîne une néphrotoxicité via le stress oxydatif.
- l'extrait éthanolique de propolis possède un pouvoir antioxydant à travers la normalisation des marqueurs du stress dosés (MDA, GSH, CAT)

La présente étude apporte donc des repenses confirmatives de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de propolis contre le stress potentiel généré par l'administration d'amphotéricine B liposomale. ces résultats nous permettent de proposer la propolis comme traitement adjuvant et protecteur des reins au cour du traitement par l'Ambisome.

Des études complémentaires et approfondies sont nécessaire, pour :

- ✓ une excellente compréhension des mécanismes de toxicité d'AmBisome.
- ✓ La séparation et l'identification des constituants de la propolis afin d'arriver à la molécule néphroprotectrice et permettre l'évaluation de la relation structure –activité.
- ✓ L'étude de l'expression des enzymes de détoxification à l'échelle protéique génétique.





**Références  
Bibliographiques**

**Référence bibliographique**

Adler-Moore J, Proffitt R. T. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002 (49) ,S1 : 21–30.

Adler-Moore J. P, Proffitt R. T. Amphotericin B lipid preparations: what are the differences?. *Clinical Microbiology and Infection* 2008, Volume (14), Sup 4 : 25–36.

Aebi H. In Bergmeyer H.U (ed). *Methods in Enzymatic Analysis*, Weinheim, Verlag Chemie 1982 (3): 273-282.

Altuntas A, Yilmaz H.R, Altuntas A, Uz.E, Demir M, Gökçimen A, Aksu O, Bayram D.S, Sezer M.T. Caffeic Acid Phenethyl Ester Protects against Amphotericin B Induced Nephrotoxicity in Rat Model. *Bio Med Research International*.2014, P.8.

Alyane M., Benguedouar L, Kebsa W, Boussenane H.N, Rouibah H, Lahouel M. Cardioprotective effects and mechanism of action of Polyphenols extracted from Propolis against Doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci*. 2008 (3): 201-209.

Angelov G., Boyadzhiev L., Georgieva S. Antioxydant properties of some Bulgarian wines. *Journal of International Scientific Publication: Materials, Methods and Technologies*.2008, 3(1): 143-150.

Anonyme.Monographie De Produit. amphotéricine B liposomique pour injection 50 mg d'amphotéricine B par fiole. rapport de Gilead Sciences Inc. 2011.

Anonyme.Monographie De Produit. AmBisome(amphotericin B) liposome for injection.rapport de Gilead Sciences Inc. 2012.

Antoniadou A, Dupont B. Formulations lipidiques d'amphotéricine B : où en sommes-nous aujourd'hui . *Journal de Mycologie Médicale*.2005(15):230–238.

Arafa HM, Abd-Ellah MF, Hafez HF. Abatement by naringinin of doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst*.2005 (17): 291-300.

Aurousseau B. Les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage : conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. INRA Productions Animales. 2002 (15): 67-82.

Babior B M. Phagocytes and oxidative stress. American Journal of Medecine.2000 (109): 33-44.

Baginski M, Resat H, Borowski E.Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels. Biochimica et Biophysica Acta. 2002 (1567): 63– 78.

Bellocchio S , Gaziano R , Bozza S , Rossi G , Montagnoli C , Perruccio K , Calvitti M , Pitzurra L, Romani L. Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005

Benguedouar.L, Boussenane.H.N, Kebsa.W, Alyane.M, Rouibah.H, Lahouel.M. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin ) in rats .Indian Journal of Experimental Biology. 2008 (46):112-119.

Berrin B, Goksel T, Derya O. Study on polyphénol content in the seeds of red grape (*Vitis vinifera* L.) varieties cultivated in Turkey and their antioxydant activity. Food chemistry 2008, (209):426-430.

Boutolleau D, Lefèvre G, Étienne J. Glutathione assay with GSH-400 method: interest of derivative spectrophotometry. Annales de Biologie Clinique.1997 (55): 592-600.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LebensmWissTechnology.1995 (28):25-30.

Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. Am. J. Physiol. Cell. Physiol .2004 (287): 817-833.

Cadenas E et Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radical Biology and Medicine.2000 (29): 222-230.

Cardinault N, Cayeux MO, Percie du Sert P. La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*.2012 (10):298–304.

Claiborne A. In Greenwald R.A (Ed). *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* CRC press, Boca Raton.1985, p.283.

Dattatraya G N, Harshada S V, Bhaskar CB. Antioxidant properties of Indian propolis. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*.2009 (4)1: 110 – 120.

Deray G, Mercadal L, Bagnis C. Néphrotoxicité de l'amphotéricine B. *Néphrologie*.2002 (23)3 : 119-122.

Derevici A, Popesco A, Popesco N. Recherches Sur Certaines Propriétés Biologiques De La Propolis.1964 : 191-200.

Favier A. The oxidative stress: interest of its monitoring in clinical chemistry and problems of the choice of an appropriate parameter. *Annales de Biologie Clinique*.1997 (55): 9 -16.

Favier A. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*.2003 (5): 108-115.

Ferhoum, F. Analyse Physicochimiques De La Propolis Locale Selon Les Etages Bioclimatiques Et Les Deux Races D'abeille Locales (*Apis Mellifica Intermissa* et *Apis Mellifica Sahariensis*).Mémoire université Boumerdès.2010 :15-18.

Ferhoum F, Haderbache L, Hachemi M., Mohammedi A. Composition chimique et activité antioxydante de la propolis algérienne. *Proceeding of the 2nd african congress on biology & health*.2012 :11-13.

Freiman A, Sasseville D. Les médicaments antifongiques en dermatologie. *Dermatologie – Conférences scientifiques*.2006 (5) :124-024.

Fukushima Y, Ohie T, Yonekawa Y, Yonemoto K, Aizawa H, Mori Y, Watanabe M, Takeuchi M, Hasegawa M, Taguchi C, Kondo K. Coffee and green tea as a large source of antioxidant polyphenols in the Japanese population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.2009 (57) 4: 1253-1259.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique.2003 91-96.

Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. Propolis. *Phytothérapie* .2009 (7): 100 - 105.

Goudable J, Favier A. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*.1997 (11):115-200.

Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Brice E. Uno BE, Wilcock BC et Burke MD. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2012 (109)7:2234–2239.

Guichardant M, Bacot S, Molière P, Lagarde M. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides (OCL)*.2006(13): 31-34.

Haleng J, Pincemail J, Defraigne JO, Charlier C, Chapelle JP. Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 2007 (62)10: 628-638.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4<sup>ème</sup> édition. Oxford university press, New York.2007 (47):265-266, 567.

Hamadi N. Effet du resveratrol sur les défenses antioxydantes chez les rats rendus diabétiques par l'injection de la streptozotocine, Mémoire de magistère, Université Mentouri Constantine.2010,p.11,13-16,18-21.

Heinemann V, Bosse D, Jehn U, B Hny, K wachholz, Debus A, P Scholz, Kolb H-J, Wilmanns W. Pharmacokinetics of Liposomal Amphotericin B (AmBisome) in Critically Ill Patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.1997, p. 1275–1280

Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*.2004, p.3-6.

Hillery AM. Supramolecular lipidic drug delivery systems: From laboratory to clinic A review of the recently introduced commercial liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B: *Advanced Drug Delivery Reviews*.1997 (24):345-363.

Hsu CY. Antioxidant activity of extract from polygonum aviculare L. *Biological Research*. 2006. (39):281-288.

Huet O , Duranteau J. Dysfonction endothéliale : rôle des radicaux libres. *Réanimation*.2008(17): 387—392.

Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S. Dietary supplement of Curcuma enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol. Toxicol*. 2003 (92) :33-38.

Inselman N, Volkmann A, Heidemann HT. Comparison of the Effects of Liposomal Amphotericin B and Conventional Amphotericin B on Propafenone Metabolism and Hepatic Cytochrome P-450 in Rats. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*.2000,p. 131–133.

Janina B, William G, George S, Gerald M. Amphotericin B: Current Understanding of Mechanisms of Action , *antimicrobial agents and chemotherapy*, Feb.1990, p. 183-188.

Jean MP. *Le guide de l'apiculteur*, Le Vieux-Lavoir, 30 avenue des Ecoles-Militaires - Aix-en-Provence – France.2007

Kebsa W. Evaluation de l'effet de la propolis algérienne sur le stress oxydatif mitochondriale induit par la doxorubicine.Thèse de Magister. Université de jijel.2006.

Kohn H, Liversedge N. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther*.1944 (82): 292-300.

Koti BC, Vishwanathswamy AHM, Wagawade J, Thippeswamy AHM. Cardioprotective effect of lipistat against doxorubicin induced myocardial toxicity in albino rats. *Indian Journal of Experimental Biology*.2009 (47): 41-46.

Laguerre M, Lecomte J, VILLENEUVE P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation : existing methods, new trends and challenges. *Prog Lipid Res*.2007 (46): 244-82

Lahouel M, Boutabet K, Kebsa W, Alyane M. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverse doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*.2010 (10) 4: 712-720.

Lemke A, Kiderlen A F, Kayser O. Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol*.2005 (68): 151–162.

Lefevre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol J P, Therond P, Torrealles J. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substances. *Ann. Biol. Clin* .1998 (56):305–319.

Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*.2002 (80):680-700.

Makris D P, Boskou G, Andrikopoulos N K. Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource Technology*. 2007 (98): 2963-2967.

Martin F, Vannin I, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de Doctorat de l'Université de la Méditerranée, centre de l'immunologie de Marseille-Luminy NCERM U. (2003) 102 : 17-19.

McDonald S, Prenzler P D, Antolovich M, Robards, K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry* . 2001(73): 73 – 84.



Mesa-Arango A C, Scorzoni L et Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front. Microbiol.* 2012(3): 286.

Midoun T. extraction des composés phénoliques et étude de leurs activités antioxydantes par la voltamétrie cyclique. Mémoire de master université Kasdi Merbah Ouargla. 2011, P.31-33.

Mimoz O, Bicêtre D A R. traitements antifongiques, Hôpital Paul Brousse, 94804 Villejuif. MAPAR 2000, P.733-743.

Moreira L, Dias L G, Pereira J A, Estevinho L . Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology.* 2008 (46): 3482–3485.

Morena M, Martin-Mateo M, Cristol J-P, Canaud B. Stress oxydant, hémocompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie.* 2002 (23)5: 201-208.

Mráček T, Pecinová A, Vrbacký M, Drahotka Z, Houštěk J. High efficiency of ROS production by glycerophosphate dehydrogenase in mammalian mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2009(481): 30-36.

Nair S. Identification des plantes mellifères et analyses physicochimiques des miels Algériens. Thèse de doctorat université d'Oran. 2014, P.7,8.

Nivière V, Fontecave M. Biological sources of reduced oxygen species. In: *Analysis of Free Radicals in Biological Systems.* 1995, P.11-19.

Olson J A, Adler-Moore J P, Jensen G M, Schwartz J, Dignani M C, Proffitt R T. Comparison of the Physicochemical, Antifungal, and Toxic Properties of Two Liposomal Amphotericin B Products. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy,* Jan. 2008(52)1: 259–268.

Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne J.O. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin 1999(4) 5: 118-130.

Pincemail J, Bonjean K , Cayeux K, Defraigne J-O. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme.* 2002(16): 233–239.

Plats D, Baudrant M, Ratsimbazafy V. Liposomes et formes pégylées : revue des médicaments disponibles. *Actualités pharmaceutiques hospitalières*. 2005( 3): 46-60.

Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 2009(4): 25-39.

Potkonjak N I, Dragan SV, Miroslav M N, Stanislava Z G, Lato L P, Desanka Z S . Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach , *Food and Chemical Toxicology*. 2012 (50): 3614–3618.

Rocheleau H. Influence D'un Surfactant, L'ester De Mannose Sur Les Propriétés Biologiques De L'amphotericine B. *Mémoire université du Québec à Trois-Rivières*. 1992: 6, 18, 20,23.

Rochette L. Stress oxydant et sepsis.*Reanimation*. 2008 (17) 3: 1-4.

Sasseville D, Freiman A. Les médicaments antifongiques en dermatologie. *Dermatologie – Conférences scientifiques*. 2006 (5): 124-024.

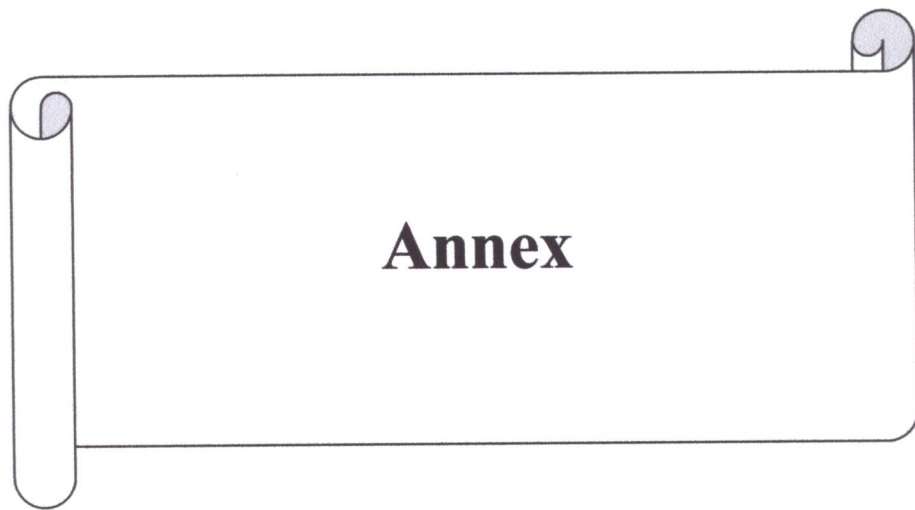
Sathishsekar M, Subramanian R. Antioxidant properties of MomordicaCharantia (bitter gourd) seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2005 (14) 2: 153-158.

Sedlak J, Lindsay R. HEstimation of total, proteinbound, and non-proteinsulfhydryl groups in tissue by Ellman'sreagent. *AnalyticalBiochemistry*. 1968 (25) :192–208.

Sestili P, Guidarelli A, Dacha M, Canton O. Quercétine prevents DNA single strand breaking and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Rad Bio*. 1998 (14): 47-56.

Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. 2004 (327): 649-662.

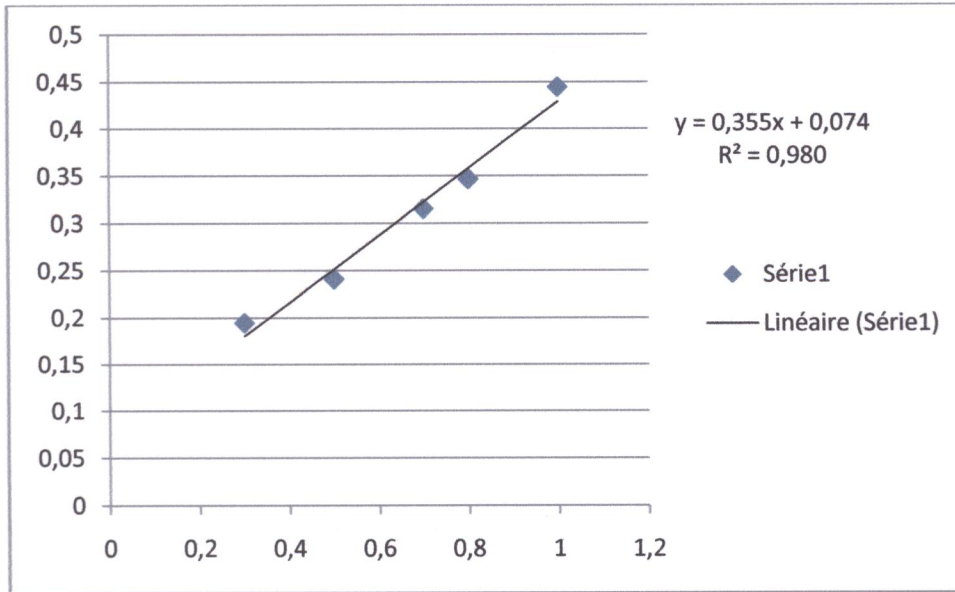
- Takao T, Watanabe N, Yagi I, Sakata K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotech. Bioch.* 1994 (58): 1780-1783.
- Tepe B, Sokmen M, Akpulat H. A et Sokmen, A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* 2006 (95): 200-204.
- Tessier F, Marconnet P. Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & Sports.* 1995 (10) :1-13.
- Vergely C, Rochette L. Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire. *Médecine thérapeutique Cardiologie* 2003 (1): 131-9.
- Wagh V D, Borkar R D, Indian Propolis: A Potential Natural Antimicrobial And Antifungal Agent, *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012 (4):12-17.
- Yernault J, Demedts M. Infections respiratoires pour le spécialiste. 1997,130.
- Yin X ,Wu H , Chen Y , Kang Y.J. Induction of antioxidants by adriamycin in mouse heart. *Biochem. Pharmacol.* 1998 (56): 87-93.
- Zeghad N. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*thymus vulgaris*, *rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Université Mentouri Constantine. 2009,P.75.



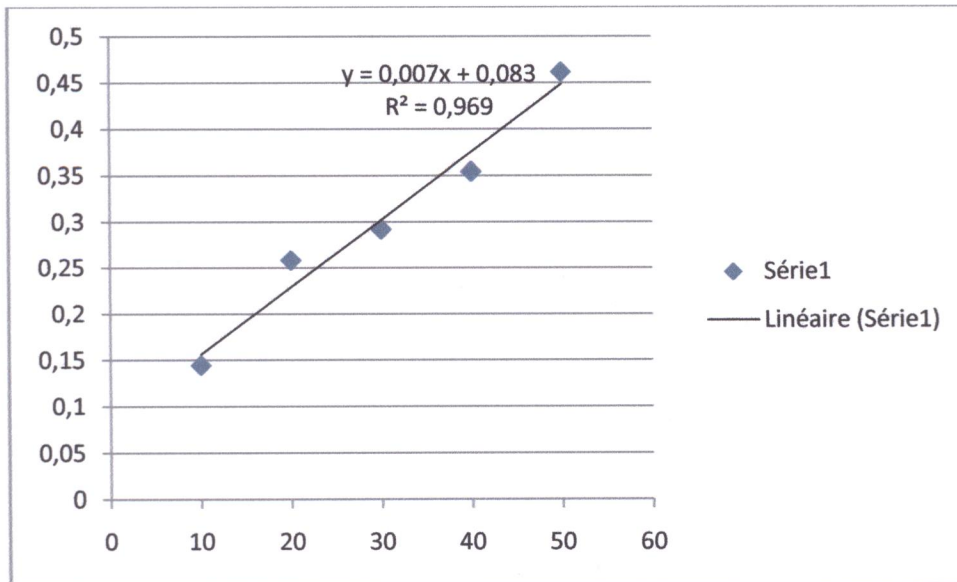
**Annex**

# Annexes

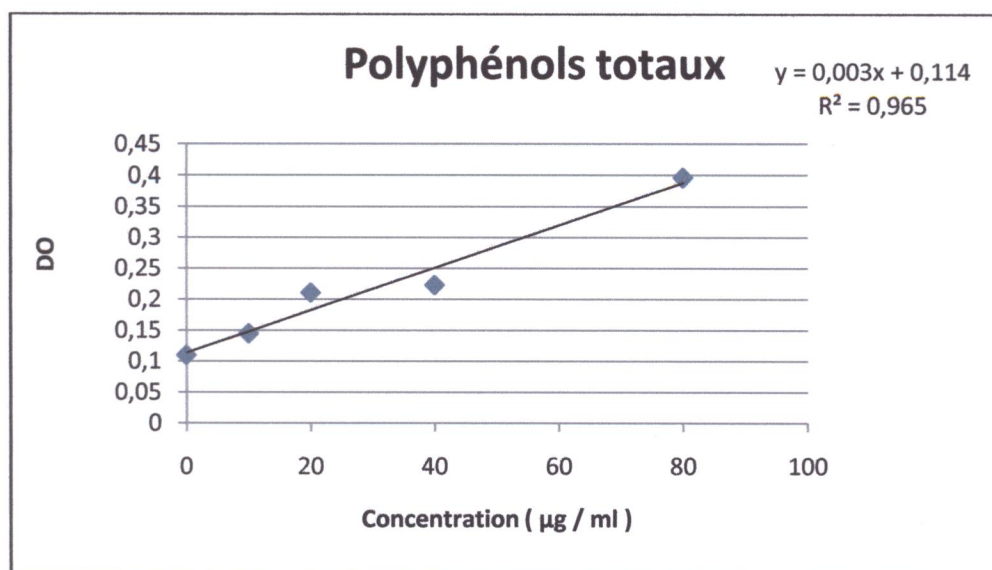
## La courbe d'étalonnage de GSH



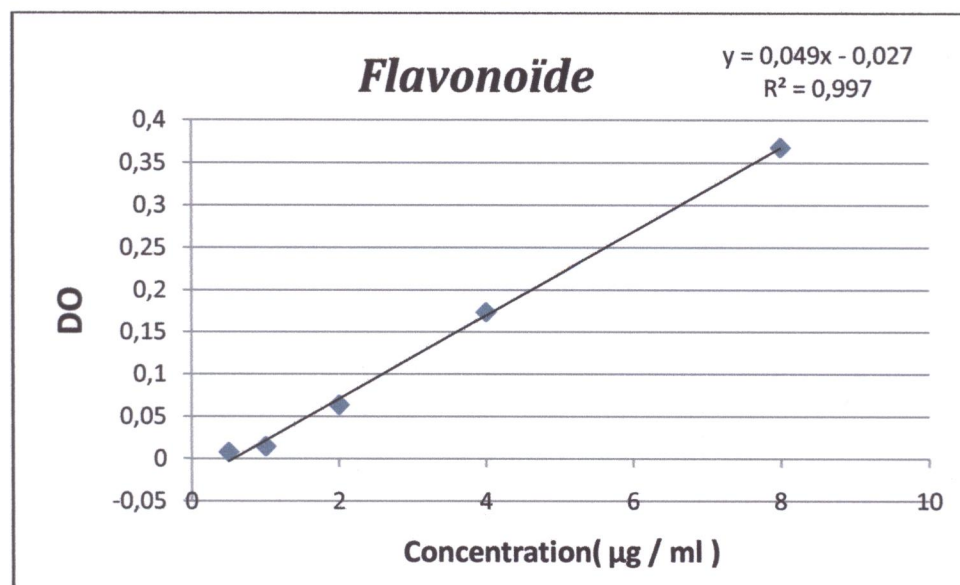
## La courbe d'étalonnage de TBARS



## la courbe d'étalonnage de quercétine



## La courbe d'étalonnage de quercétine



**Effet protecteur de l'extrait de propolis contre le stress potentiel induit par l'amphotericine B liposomale**

**Résumé :** L'amphotericine B liposomale est un antibiotique potentiellement néphrotoxique. Cette toxicité est principalement due à des dommages peroxydatifs (formation des espèces réactifs de l'oxygène ou ROS). Pour augmenter l'innocuité du médicament, plusieurs approches ont été utilisées telles que l'emploi d'antioxydants naturels dont la propolis, composé riche en polyphénols et en flavonoïdes. Le pouvoir antioxydant de l'extrait de propolis est avéré par le test au DPPH. In vivo, nos résultats montrent que la toxicité rénale d'AmBisome est secondaire à la génération de ROS, constat confirmé par le dosage des marqueurs du stress. On a noté une augmentation du MDA, une déplétion de GSH et une inhibition de la CAT). En outre, le prétraitement par l'extrait de propolis a normalisé les différents marqueurs du stress. Ce travail, est en faveur de l'utilisation de la propolis comme agent protecteur contre les effets délétères d'AmBisome

**Mots clés :** Amphotéricine B liposomale, Propolis, polyphénols, Stress oxydant, Néphrotoxicité.

**Summary:** The liposomal amphotericin B is a potential nephrotoxic antibiotic, this toxicity is mainly due to peroxidative damage (production of Reactive oxygen species or ROS). In order to improve the harmlessness of drug, several approaches have been used such as the use of natural antioxidants including propolis rich with polyphenols and flavonoides. The antioxidant capacity of propolis extract was determined using the DPPH assay. In vivo, our results showed that AmBisome possess a secondary renal toxicity with the generation of ROS, report confirmed by the proportioning of the markers of the stress. An increase in MDA, a decrease in GSH and an inhibition of CAT were observed. Moreover, the pre-treatment with propolis extract standardized the various markers of the stress. From this work, it was indicated that propolis can be used as a protective agent against the noxious effects of AmBisome.

**Key words:** liposomal amphotericin B, Propolis, polyphenols, oxidative stress, Néphrotoxicité

**ملخص :** الأمفوتريسين B المغلف داخل الليبوزومات و المسوق تحت اسم AmBisome هو مضاد حيوي و عامل مسمم للكلى, سميته راجعة أساسا إلى تسببه في حدوث تلف بيروكسيدي وإنتاج للجذور الحرة. من أجل تحسين فعالية هذا الدواء قد استخدمت عدة طرق مثل استخدام مضادات الأكسدة الطبيعية, من بينها العكبر و هو مركب غني بالبوليفينول و الفلافونويدات. نشاط العكبر المضاد للراديكالية تم التأكد منه بإجراء اختبار DPPH°. النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة تظهر بوضوح تسمم الكلى الناتج عن الـ AmBisome من خلال إنتاج الجذور الحرة و هذا ما يؤكد ارتفاع نسبة الإجهاد التأكسدي (MDA) وانخفاض نظام الدفاع الأنزيمي المضاد للأكسدة (CAT) وغير الإنزيمي (GSH). من جهة أخرى أدى العلاج المسبق بالعكبر إلى ضبط علامات الإجهاد التأكسدية, هذا ما يتيح لنا إمكانية استعمال العكبر كعامل حماية ضد الآثار السلبية للـ AmBisome.

**كلمات البحث:** الأمفوتريسين B المغلف داخل الليبوزومات, العكبر, ومركبات الفينول, والإجهاد التأكسدي, سمية كلوية.