

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de JIJEL – Faculté des sciences
Département de Chimie



Mémoire



Pour obtenir le diplôme de Magister en chimie

Option : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ETUDE PHARMACOCHEMIE DE L'EXTRAIT DE PROPOLIS AU COURS D'UN STRESS OXYDATIF RENAL INDUIT PAR LA DOXORUBICINE

Soutenu le 26 Novembre 2007

Par

Kheira BOUTABET

Devant le Jury :

Pr. Rachid	MERGHEM	Pr. Université de Constantine	PRESIDENT
Dr. Mesbah	LAHOUEL	M.C Université de Jijel	RAPPORTEUR
Dr. Mabrouk	BELGHOBSI	M.C Université de Jijel	EXAMINATEUR
Dr. Souad	AMEDAH	M.C Université de Constantine	EXAMINATRICE

جامعة جيجس
المكتبة المركزية
رقم الجرد: 161

625/6

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université de JIJEL – Faculté des sciences
Département de Chimie



Mémoire



Pour obtenir le diplôme de Magister en chimie
Option : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ETUDE PHARMACOCHEMIE DE L'EXTRAIT DE PROPOLIS AU COURS D'UN STRESS OXYDATIF RENAL INDUIT PAR LA DOXORUBICINE



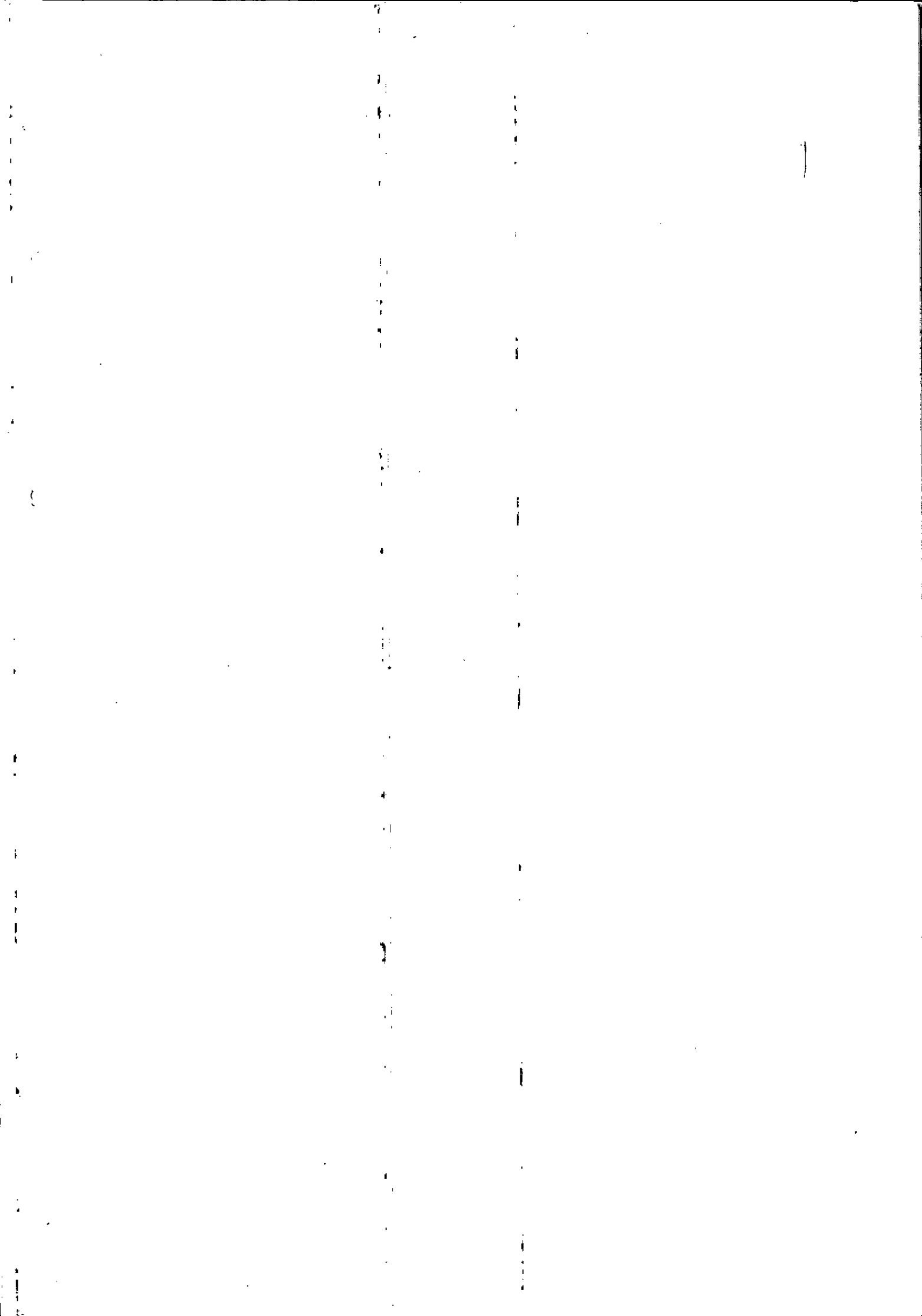
Soutenu le 26 Novembre 2007

Par

Kheira BOUTABET

Devant le Jury :

Pr. Rachid	MERGHEM	Pr. Université de Constantine	PRESIDENT
Dr. Mesbah	LAHOUEL	M.C Université de Jijel	RAPPORTEUR
Dr. Mabrouk	BELGHOBSI	M.C Université de Jijel	EXAMINATEUR
Dr. Souad	AMEDAH	M.C Université de Constantine	EXAMINATRICE



Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier **DIEU le Tout Puissant** qui m'a donné la capacité afin d'accomplir ce modeste travail et m'a toujours guidé vers le bon chemin.

Je remercie vivement mon encadreur le Docteur Lahouel Mesbah, homme de science et de qualité qui a à cœur la formation et la réussite de ses disciplines. Merci monsieur d'être si présent, merci d'avoir suivi et dirigé ce travail avec patience.

Je remercie sincèrement le professeur Merghem Rachid qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Je lui exprime mon profond respect.

Je remercie vivement les docteurs : Ameddah Souad et Belghoubsi Mabrouk d'avoir accepté de faire partie du jury afin d'examiner ce travail. Je leurs témoigne toute ma reconnaissance.

Un Grand Merci à Madame Mérabet Naima pour son aide précieuse dans la réalisation de la partie chimique.

Mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance vont aussi à monsieur Leghouchi Essaid, maître de conférence et responsable du laboratoire de Phytochimie et de pharmacologie de l'université de Jijel qui m'a permis de travailler au sein de son laboratoire.

Mes sincères gratitude vont également à monsieur Khlili Smail maître de conférence et responsable du laboratoire de Chimie pour son aide et sa compétence. Un grand merci également à tout le personnel des laboratoires de Biologie et de Chimie.

Je ne serais bien sûr jamais arrivée là sans l'aide et le soutien de ma famille. Merci à mes parents pour avoir toujours cru en moi, Cru que j'y arriverai, parfois même plus que moi, merci de m'avoir *soutenue* dans cette voie, merci de votre présence, de vos encouragements, de vos conseils, de vos attentions constantes, merci pour tout. J'espère vous rendre le bonheur que vous m'apportez.

KHEIRA BOUTABET

SOMMAIRE

	Page
INTRODUCTION.....	1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. Physiologie rénale.....	4
I.1. Principales fonctions des reins.....	4
I.2. Anatomie fonctionnelle du rein.....	4
II. Le stress oxydatif cellulaire.....	6
II.1. Définition de stress oxydatif.....	6
II.2. Les radicaux libres.....	6
II.3. Les espèces réactives de l'oxygène ERO.....	7
II.4. Sources et production des ROS.....	9
II.4.1. Sources endogènes des ERO.....	9
II.4.2. Sources exogènes des ERO.....	10
II.4.2.1. Les médicaments et leur métabolisme.....	10
II.4.2.1a. La doxorubicine.....	10
II.4.2.1b. Mécanisme d'action de la doxorubicine.....	12
II.4.2.1c. Doxorubicine et rein.....	13
II.4.2.1d. Action néphrotique de la doxorubicine.....	13
II.5. Dégâts oxydatif cellulaires.....	14
II.5.1. La peroxydation lipidique.....	14
II.5.2. Oxydation des protéines.....	15
II.5.3. Oxydation de l'ADN.....	15
II.5.4. Les maladies liées au stress.....	16
II.6. Mécanismes de lutte contre les ROS.....	17
II.6.1. Les antioxydants enzymatiques.....	17
II.6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD).....	17
II.6.1.2. La catalase.....	18
II.6.1.3. La glutathion peroxydase et réductase (GPx) et (GR).....	18
II.6.2. Les antioxydants non enzymatique.....	19

II.6.2.1. Glutathion (GSH).....	19
II.6.2.2. Les thiorédoxines (Txn).....	20
II.6.2.3. Les métallothioniénes (MT).....	20
II.6.2.4. La vitamine E.....	20
II.6.2.5. La vitamine C.....	21
II.6.2.6. Le β -carotène.....	21
III. Les flavonoïdes; une famille de polyphénols.....	22
III.1. Découvertes des flavonoïdes.....	22
III.2. Définition et structure chimique.....	22
III.3. Classification des flavonoïdes.....	23
III.4. La biosynthèse des flavonoïdes.....	25
III.5. Distribution et localisation.....	26
III.6. Métabolisme des flavonoïdes.....	27
III.7. Biodisponibilité des flavonoïdes.....	28
III.8. Propriété des flavonoïdes.....	28
III.8.1. Activité antioxydante des flavonoïdes.....	29
III.8.2. Implications biologiques des flavonoïdes.....	29
III.8.2.1. Capture directe de radicaux libres.....	30
III.8.2.2. Interaction avec les cations métalliques.....	31
III.8.2.3. Inhibition de diverses enzymes.....	32
III.8.2.3a. Xanthine oxydase.....	32
III.8.2.3b. NO synthases.....	33
III.8.2.3c. Lipoxygénases.....	33
III.8.2.4. Prooxydation.....	33
III.8.3. Relation structure activité antioxydante.....	34
III.8.4. Autres activité des flavonoïdes.....	35
III.9. La propolis, une source des flavonoïdes.....	36
III.9.1. Définition.....	36
III.9.2. Propriétés physicochimiques de la propolis.....	36
III.9.3. Origine de la propolis.....	37

III.9.4. Composition chimique de la propolis	37
III.9.5. Propriétés thérapeutiques	38
MATERIEL ET METHODES	40
I. Matériel végétal	40
I.1. Récolte de la propolis	40
I.2. Extraction des flavonoïdes de la propolis.....	40
I.3. Dosage différentiel des flavonoïdes	41
I.4. Méthodes et techniques d'analyse chromatographiques des flavonoïdes de la propolis	42
I.4.1. La chromatographie sur couche mince analytique (CCM).....	43
I.4.1.1. Relation fluorescence- structure	44
I.4.1.2. Relation R _f - structure	45
I.4.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	45
I.4.3. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)	46
II. Matériel animal.....	48
II.1. Entretien des animaux	48
II.2. Traitement des animaux	48
II.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques	49
III. Méthodes	49
III.1. Mesure de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis	49
III.2. Dosages tissulaires.....	50
III.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	51
III.2.2. Dosage du glutathion	52
III.3. Dosage de la créatinine	53
III.4. Mesure de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl transpeptidase (δGT)...	53
III.5. Evaluation statistique.....	54

RESULTATS ET INTERPRÉTATION.....	56
I. Résultat de l'étude chimique des extraits.....	56
I.1. Les résultats de chromatographie sur couche mince	56
I.2. Résultats de l'HPLC de l'EEP	57
I.3. Résultat de la chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectroscopie de masse (CG/SM).....	58
II. Evaluation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis	70
III. Etude de l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis administrés à 100 mg/kg contre le stress oxydatif rénale induit par la doxorubicine 10 mg/kg	71
III.1. Evaluation des concentrations en malondialdehyde (MDA) du tissu rénale	71
III.2. Evaluation des taux de glutathion (GSH) du tissu rénale	73
III.3. Evaluation des taux de créatinine plasmatique	75
III.4. Evaluation enzymatique.....	77
III.4.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl Transpeptidase (γ GT) urinaire	77
III.4.2. Evaluation de l'activité enzymatique du gamma- glutamyl Transpeptidase (γ GT) plasmatique	78
III.4.3. Evaluation de l'activité enzymatique de (γ GT) tissulaire	80
DISCUSSION.....	83
CONCLUSION	93
REFERENCES IBLIOGRAPHIQUES	96
ANNEXE	110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
CAT	Catalase
CG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
C4H	Cinnamate-4-hydroxylase
DAD-UV	Détecteur ultraviolet à barrettes de diodes (<i>Diode Array Detector</i>)
DPPH	2,2-diphényl picrylhydrazyl
EEP	Extrait ethanologique de propolis
EI	Impact électronique
ERO	Espèce réactive de l'oxygène
FAD	Flavine-adenine dinucléotide
GR	Glutathion réductase
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit.
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
i.p	Intra péritonéale
L°	Radical alkyl
LOOH	Hydroperoxyde lipidique
MDA	Malondialdehyde
m/z	Rapport masse/ charge
NADPH	Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide phosphate
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
O ₂ ⁻	Anion Superoxyde
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PAL	Phényle ammonia lyase

ROO°	Radical peroxy
ROS	Réactive oxygène espèces
SOD	Superoxyde dismutase
SOD-EC	Superoxyde dismutase extracellulaire
TBA	Acide thiobarbiturique
TCA	Acide trichloracétique
TFA	Acide trifluoroacétique

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1: Anatomie du rein et du néphron	5
Figure 2 : Structure chimique de la doxorubicine	11
Figure 3 : Métabolisme hépatique de la doxorubicine	12
Figure 4 : Chaîne de la peroxydation lipidique	15
Figure 5 : Relation entre les principaux systèmes antioxydant enzymatique.....	19
Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes.....	23
Figure 7 : Structure des différents sous-groupes des flavonoïdes	24
Figure 8 : Structure chimique de la rutine et la saponarine.....	24
Figure 9 : Exemple de la complexité de structures de flavanols. Cas de la catéchine	25
Figure 10 : Etapes communes de la biosynthèse de tous les flavonoïdes	26
Figure 11 : Piégeage des ROS par les flavonoïdes.....	30
Figure 12 : Structure de la quercétine, et sites potentiels de chélation	31
Figure 13 : Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase	32
Figure 14 : Relation entre les formes actives de la quercétine et leur activité prooxydante ...	34
Figure 15 : Eléments essentiels pour l'activité antioxydant des flavonoïdes	35
Figure 16: Site de chélation de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.....	42
Figure 17 : Schéma de principe d'un CPG-SM	47
Figure 18: Forme radicalaire et réduite du DPPH°	50
Figure 19: Réaction du malondialdéhyde (MDA) avec l'acide thiobarbiturique	52
Figure 20: Chromatogramme de propolis.....	58
Figure 21: Spectre de masse de pinocembrine.....	59
Figure 22: Spectre de masse de tectochrysin	59
Figure 23: Chromatogramme de la phase éther diéthylique.....	62
Figure 24: Chromatogramme correspondant à la phase acétate d'éthyle.....	62
Figure 25: Spectre de masse de pinostrobine chalcone (phase éther diéthylique).....	63
Figure 26: Spectre de masse de pinostrobine chalcone (phase acétate d'éthyle).....	63
Figure 27: Spectre de masse de pinocembrine.....	65
Figure 28: Spectre de masse de tectochrysin	65
Figure 29: Spectre de masse de chrysin	66

Figure 30: Spectre de masse de la naringénine	67
Figure 31: Fragmentation en spectrométrie de masse d'un flavone, la chrysin.....	69
Figure 32: Effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis et de la quercétine à différentes concentrations vis-à-vis du DPPH°	71
Figure 33: Variations des taux du MDA du tissu rénale après l'administration d'une dose unique de la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg.....	73
Figure 34: Variations des taux de GSH du tissu rénale après l'administration d'une unique de la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg.....	75
Figure 35: Variations des taux de la créatinine plasmatique au cours d'un traitement par la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg.	76
Figure 36: Variations de l'activité enzymatique de la γ GT urinaire après traitement par la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg.....	78
Figure 37: Variations de l'activité enzymatique de la γ GT plasmatique après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à la dose de 100 mg/kg.....	79
Figure 38: Variations de l'activité enzymatique de la γ GT tissulaire après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à la dose de 100 mg/kg.....	81

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Espèces réactives de l'oxygène	7
Tableau 2 : Liste des maladies liées au stress oxydatif.....	16
Tableau 3: Relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes.....	44
Tableau 4: Relation structure-Rf.....	45
Tableau 5: Comportement chromatographique sur couche mince de l'extrait éthanolique de la propolis.....	56
Tableau 6 : Effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis et de la quercétine à différentes concentrations vis-à-vis du DPPH°	70
Tableau 7 : Variations des taux du MDA du tissu rénale après l'administration d'une dose unique de la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg.....	72
Tableau 8: Variations des taux de GSH du tissu rénale après l'administration d'une dose unique de la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg.....	74
Tableau 9: Variations des taux de la créatinine plasmatique au cours d'un traitement par la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg	76
Tableau 10 : Variations de l'activité enzymatique de la γ GT urinaire après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg	77
Tableau 11 : Variations de l'activité enzymatique de la γ GT plasmatique après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à la dose de 100 mg/kg	79
Tableau 12 : Variations de l'activité enzymatique de la γ GT tissulaire après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à la dose de 100 mg/kg	80

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les organismes vivent dans des environnements pour lesquels ils sont adaptés. Chaque variation de leur environnement constitue un stress répercuté à tous les niveaux de l'organisme et jusqu'à la cellule. Ces stress peuvent être de nature variée: Augmentation de température, acidification du milieu, exposition à des molécules chimiques, à des radiation ou à des agents pathogènes. Cependant de nombreux stress sont produits par la cellule elle-même, en particulier par la respiration qui génère des radicaux libres ou oxydant important à travers la phosphorylation oxydative.

Les médicaments anticancéreux (anthracyclines, antimétabolites, antimitotiques) par leur biotransformation en métabolites réactifs dans la cellule potentialisent le stress oxydatif qui serait à l'origine de nombreuses pathologies.

Pour vivre (et survive), un organisme doit donc être adapté à son environnement mais aussi être capable de se protéger des effets nocifs induits par les variations de son environnement. Au niveau cellulaire les mécanisme de protection mise en place sont nombreux et la majorité d'entre eux, d'une origine naturelle. Pour cela la recherche sur les substances naturels est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issus de matrices naturelles et s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments.

Les flavonoïdes sont des composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'être humain. On peut aussi les trouver dans la propolis des abeilles. En plus de leur rôle dans la pigmentation des végétaux, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêts, telles que des actions anti-radicalaires et antioxydants. En effet, par complexion avec des enzymes spécifiques, les flavonoïdes sont capables, par exemple, de stopper l'action de radicaux tels que l'anion superoxyde. En revanche, sous certaines conditions, ils peuvent présenter une activité prooxydante responsable de la peroxydation lipidique et de l'altération de l'ADN et de certaines protéines (Fiorucci, 2006).

Leur grande variété de structures et d'activités biologiques fait des flavonoïdes un objet de nombreuses études. Des études récentes ont montré que les multiples modes d'actions des flavonoïdes et l'emploi de nombreuses méthodes de détection, et d'identification offre une explication à l'obtention de résultats souvent divergents. Les objectifs fixés dans notre travail sont:

- L'étude chimique des flavonoïdes de la propolis, basées principalement sur l'extraction des substances bio-actives contenues dans la propolis, l'analyse chromatographique par chromatographie sur couche mince (CCM) analytique et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) et par HPLC. Ces méthodes ont pour but d'identifier les grands groupes chimiques présents dans notre extrait.

- L'induction d'un stress oxydant par l'administration d'un anticancéreux, la doxorubicine à la dose de 10mg/kg. L'étude est réalisée in vivo chez le rat wistar.

- Evaluation de l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis administrée à 100mg/kg par voie orale contre le stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine

- Proposer un mécanisme moléculaire de l'action préventive des flavonoïdes de la propolis aux cours du stress oxydatif cellulaire.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Physiologie rénale

I.1. Principales fonctions des reins

Les reins sont des organes vitaux, plurifonctionnels. Ils concourent au maintien de l'homéostasie du milieu intérieur en gérant l'excrétion hydroélectrolytique et l'élimination des déchets métaboliques (composés azotés comme l'urée, l'acide urique, la créatinine et l'acide oxalique) et des produits chimiques exogènes (toxines, médicaments et leurs métabolites) potentiellement toxiques pour l'organisme. Ils participent à la régulation de l'équilibre hydroélectrolytique et de l'équilibre acido-basique de l'organisme et maintiennent ainsi constants la composition ionique, la concentration osmotique et le pH des liquides corporels. Enfin, les reins jouent également un rôle endocrine important puisqu'ils synthétisent un grand nombre d'hormones essentielles à l'homéostasie de l'organisme. (Lamb et al, 1990; Sylvie, 2004; Taulan, 2004).

I.2. Anatomie fonctionnelle du rein

Le rein comporte principalement deux régions distinctes : le cortex et la médulla. Le cortex, situé sous la capsule rénale, constitue la partie la plus superficielle. C'est là que se trouvent les unités filtrantes rénales : les glomérules. La médulla est située au centre du rein. C'est là que se rejoignent les structures tubulaires assurant la manipulation de l'urine et sa conduction vers l'uretère. L'ensemble formé par chaque glomérule et la structure tubulaire qui lui est associée est appelé néphron (figure 1) (Sylvie, 2004; Taulan, 2004).

Le rein est un organe particulièrement vascularisé qui reçoit environ $\frac{1}{4}$ du débit cardiaque. L'artère rénale principale se divise pour traverser le cortex jusqu'à sa périphérie en donnant naissance aux artérioles afférentes et se terminant par un fin réseau capillaire, le glomérule. Cette structure est drainée par les artérioles efférentes qui se ramifient pour soit entourer tous les segments tubulaires du cortex, soit atteindre la médullaire (Taulan, 2004).

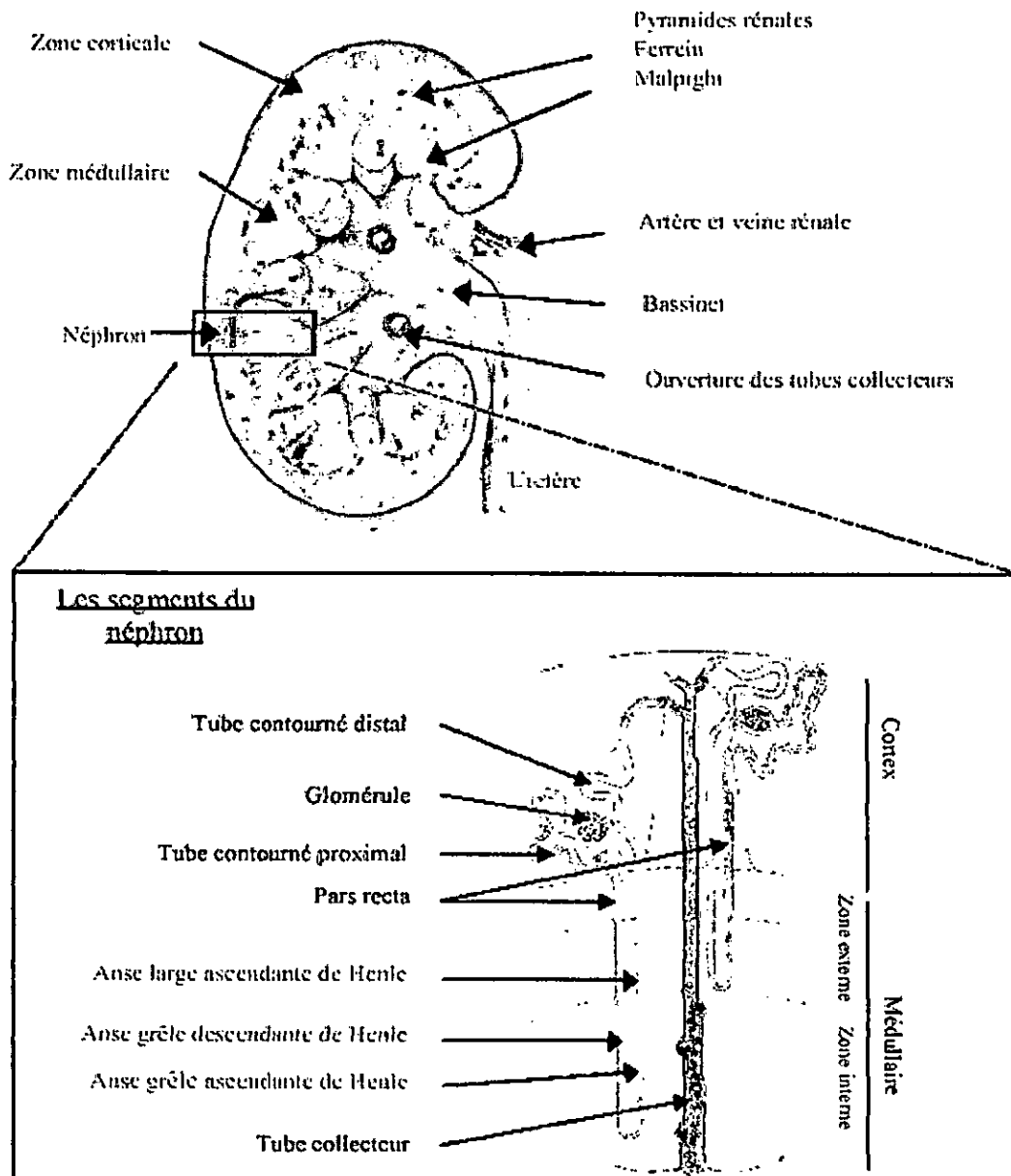


Figure 1: Anatomie du rein et du néphron (Taulan, 2004).

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Chaque rein comprend environ un million de néphrons. Chaque néphron est composé d'un glomérule où le sang est filtré pour former l'urine primitive, et d'un tubule attenant. Ce dernier est formé d'un tube proximal constitué de 3 segments finissant par la pars recta, d'une anse de Henlé, d'un tube distal et d'un tube collecteur. Chacune de ces parties joue un rôle différent dans les processus de filtration, de

réabsorption et de sécrétion qui aboutissent à l'élaboration de l'urine (Mirto, 1997; Masson, 2005).

Le rein est un organe particulièrement sensible aux effets toxiques de plusieurs substances chimiques qui sont susceptibles de lui causer des dommages à différents sites et de perturber ainsi le fonctionnement du rein. Ainsi, les médicaments anticancéreux, substances étrangères sont capables d'induire un état de stress oxydatif qui serait à l'origine de processus toxiques. Au niveau rénal, les médicaments sont éliminés sous forme intacte ou de métabolites actifs. Cette élimination est assurée par filtration glomérulaire (FG) mais aussi par sécrétion et réabsorption tubulaires (Ghuysen, 2005).

II. Le stress oxydant cellulaire

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agression, physique (irradiation, hyper ou hypothermie), infectieuses, chimique (toxine), métaboliques (exposition à des xénobiotiques). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression comme appelée stress oxydatif, du à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (Castronovo, 2003; Viro, 2004).

II.1. Définition de stress oxydatif

Le stress oxydatif est une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants dépasse le système de défense antioxydant, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution de la défense antioxydante, ce qui résulte en l'accumulation de radicaux libres causant des dommages oxydatifs aux macromolécules du tissu hôte (Thomas et al, 2003; Wassmann et al, 2004; Mylène, 2006).

II.2. Les radicaux libres

Par définition, les radicaux libres sont des substances chimiques très réactives comportant un nombre impair d'électrons qui peuvent semer le désordre dans la structure des protéines cellulaires, des lipides membranaires, des acides nucléiques, et ils peuvent

éventuellement entraîner la mort cellulaire (Marieb, 1999; Muzykantov, 2001; Maritim et al, 2003).

Les radicaux libres sont des formes réactives de l'oxygène, comme l'anion superoxyde, le radical hydroxyle, et les radicaux lipidiques. Ces radicaux sont fortement impliqués dans le vieillissement, l'apoptose, le cancer, les maladies neurodégénératives, pulmonaires, cardiovasculaires, et les inflammations chroniques. Ils peuvent être générés par des facteurs environnementaux mais sont aussi produits pendant le fonctionnement cellulaire normal au cours de la respiration cellulaire (Szewczyk et Wojtczak 2002).

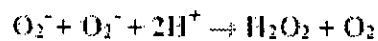
II.3. Les espèces réactives de l'oxygène ERO

Les espèces réactives de l'oxygène ERO ou ROS en anglais pour réactive oxygen species regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs. Certaines espèces réactives de l'azote (ERA ou RNS en anglais pour Réactive Nitrogène Species) sont parfois mentionnées comme appartenant à cette classification puisqu'elles possèdent un atome d'oxygène et qu'elles se comportent de manière similaire (espèces généralement radicalaires, pouvoir oxydant important, générées et régulées par l'organisme) aux ERO vis-à-vis du stress oxydant. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont regroupées dans le tableau 1 (Fiorucci, 2006).

Tableau 1 : Espèces réactives de l'oxygène.

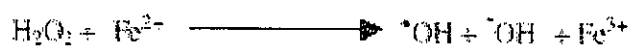
ROS	Formule chimique
Oxygène moléculaire	${}^1\text{O}_2$
Dioxygène singulet	${}^3\text{O}_2$
Anion superoxyde	O_2^-
Radical hydroxyle	OH^\cdot
Radical hydroperoxyde	HOO^\cdot
Radical peroxyde	ROO^\cdot
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO^\cdot
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^\cdot
Peroxynitrite	ONOO^-
Hypochlorite	ClO^-

L'oxygène moléculaire subit une série de réactions qui ultimement conduit à la génération de molécules oxydantes. Ces dérivés sont continuellement générés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, et représentent des produits secondaires de la respiration cellulaire (Ducrocq et al, 2001). Ainsi par exemple, l'oxygène moléculaire est réduit pour former l'anion superoxyde (O_2^-), lequel, une fois généré peut soit dismuté spontanément en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène ou dans une réaction catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) (Januel, 2003; Mylène, 2006).



A noter que cette enzyme est généralement présente en quantité suffisante pour assurer une dismutation rapide et efficace de tout l' O_2^- produit par la chaîne respiratoire. Le peroxyde d'hydrogène généré par cette réaction est ensuite hydrolysé par la catalase ou par la glutathion peroxydase (Mylène, 2006).

L'anion O_2^- a été identifié comme étant un médiateur clé dans plusieurs des actions nuisibles des dérivés de l'oxygène. Cependant, cet anion initie aussi la formation de plusieurs autres molécules oxydantes, dont le H_2O_2 . Bien que le H_2O_2 soit un agent oxydant relativement faible, il peut dépendants être réduit par la suite via la réaction de Fenton en présence de l'ion ferreux et être ainsi converti en un radical hydroxyle (OH°) hautement réactif et grandement toxique (Januel, 2003; Mylène, 2006).



Le peroxyde d'hydrogène peut également réagir avec le radical superoxyde aboutissant, la encore à la production du radical hydroxyle. Ce mécanisme réactionnel se nomme 'réaction d'haber-weiss':



Tous ces dérivés de l'oxygène, soit l' O_2^- , le H_2O_2 et l' OH° , peuvent en retour induire la peroxydation des lipides.

Les radicaux (ROO°) se forment par l'addition d'oxygène moléculaire sur des radicaux libres carbonés. Ils sont peu réactifs, la dégradation de ce dernier conduit au radical alcoxyle RO° (Januel, 2003).

De plus, une production excessive d' O_2^- favorise la réaction entre l'anion superoxyde et le monoxyde d'azote (NO) ce qui entraîne la production de peroxyde d'azote (ONOO⁻) un agent oxydant extrêmement puissant, capable d'endommager plusieurs molécules biologiques (Mylène, 2006).

II.4. Sources et production des ERO

Notre organisme est soumis à l'agression de différents agents capable de donner naissance à des radicaux libres, essentiellement des espèces réactives de l'oxygène dont la formation est liée aussi bien à des facteurs exogènes qu'endogènes (Matés et al, 1999; Milan, 2004).

II.4.1. Sources endogènes des ERO

La source principale des Espèces Réactives de l'Oxygène dans les cellules est d'origine enzymatique et non enzymatique. La NADPH oxydase, les peroxysomes, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont parmi les sources endogènes d'ERO les plus importantes. Les mitochondries, éléments essentiels au fonctionnement cellulaire puisqu'elles métabolisent le dioxygène, produisent également en permanence des ERO. Les ion métalliques présents dans notre organisme, comme fer ou le cuivre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèces moins réactifs H₂O₂ via la réaction de fenton décrite précédemment (Milan, 2004, Fiorucci, 2006).

Ces ERO sont particulièrement réactives et sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, ...). Au niveau moléculaire, les ERO peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies (Wassmann et al, 2004; Fiorucci, 2006).

II.4.2. Sources exogènes des ERO

Les ERO sont également produits sous l'action de stimuli extérieurs comme l'absorption des médicaments qui provoquent une surproduction de ces espèces réactifs dans notre organisme (Conklin et al, 2004).

II.4.2.1. Les médicaments et leur métabolisme

Les médicaments anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des radicaux libres. Les agents cytotoxiques de cette classe ont tous une structure quinone et hydroquinone, qui leur permet de fonctionner comme accepteur et donneur d'électrons. Ils sont habituellement administrés par la veine, puis sont rapidement éliminés du plasma, le temps d'élimination de la doxorubicine est de 30 h. Ces substances sont rapidement captées par différents organes : cœur, reins, poumons, et foie. La doxorubicine et ses dérivés sont éliminés après conversion métabolique en une variété de substances inactives ou moins actives (Hortobágyi, 1997; Donatiello, 2002).

La métabolisation des médicaments par le cytochrome P450 peut s'avérer nuisible, en produisant des métabolites réactifs, qui attaquent les composants cellulaires, et qui induit des phénomènes de cancérisation, des cytotoxicités ainsi que des phénomènes apoptotique. (Szewczyk et Wojtczak 2002; Jang et al, 2004).

II.4.2.1a. La doxorubicine

La doxorubicine (adriamycine) est un antibiotique antitumoral appartenant à la famille des anthracyclines, elle est très utilisée dans le traitement d'un large spectre des cancers. C'est un agent intercalant. Possède la structure polyaromatique des tétracyclines, avec un aminosucre, la daunosamine, qui est attachée par une liaison glycosidique. Leur métabolisme conduit à la génération des radicaux libres. (Geetha et al, 1989; Minotti et al, 1998; Green et al, 2002; Kim et al, 2006). La structure de la doxorubicine est représentée dans la figure 2.

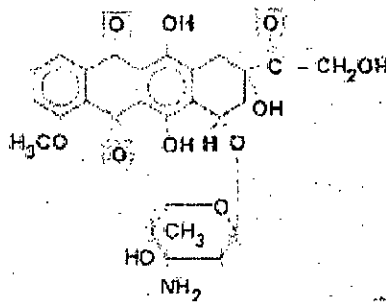


Figure 2. Structure chimique de la doxorubicine.

Le métabolisme de la doxorubicine est essentiellement hépatique. Il nécessite la présence d'oxygène et des enzymes tel que le cytochrome P450 réductase, NADPH déhydrogénase et la NO synthase) (Kim et al, 2006) (figure3).

La structure semi-quinone de la doxorubicine leur permet de se comporter comme accepteur des électrons en présence des enzymes d'oxydoréduction tel que le cytochrome P450. En effet, l'addition d'un électron libre transforme la quinone en radical libre semi-quinonique avec libération des anions superoxyde, qui aurait alors des effets délétères directe sur l'ADN et les macromolécules. Le radical semi-quinonique peut réagir avec l'oxygène pour former des radicaux superoxydes, hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène qui sera également toxique, conduisant à un état de stress oxydatif (AFECT, 2004). Ce stress est impliquée dans le développement des lésions rénales: les études portant sur le modèle du rein restant révèle une augmentation de la consommation en oxygène par le néphron et une augmentation de la peroxydation lipidique, ce qui suggère la formation de métabolites réactifs (radicaux superoxydes, peroxydes d'hydrogène,...), qui induisent des lésions tissulaires (Gonin, 1995; Klarh, 1999).

La doxorubicine est susceptible de perturber le fonctionnement des reins ou d'altérer leur structure. Plusieurs études ont montré que la doxorubicine est capable d'induire les syndromes néphrotiques chez les animaux (Raguenez-Viotte, 1988).

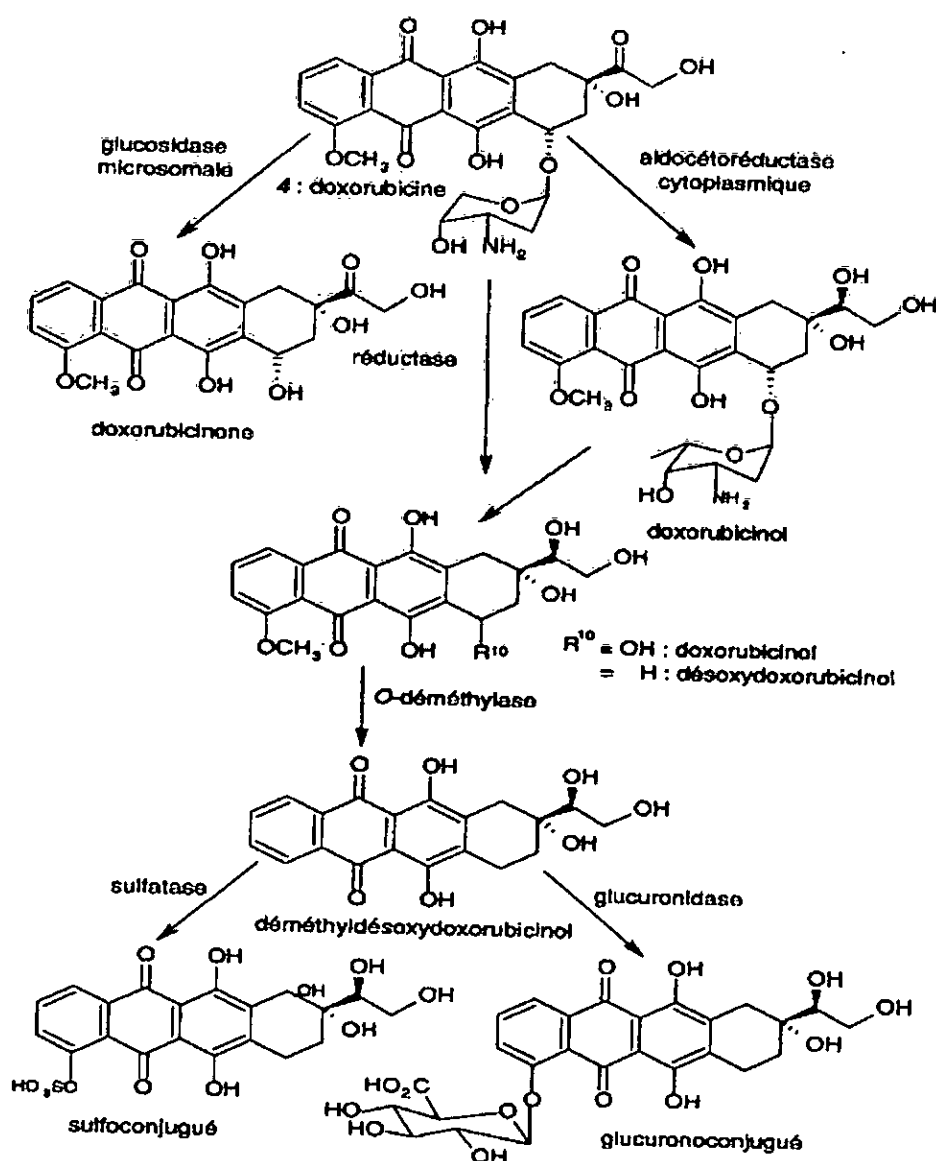


Figure 3: Métabolisme hépatique de la doxorubicine.

II.4.2.1b. Mécanisme d'action de la doxorubicine

La doxorubicine est un agent intercalant dans les principaux mécanismes d'action sont les suivant:

-*Intercalation dans la molécule d'ADN* : la structure polyaromatique plane de la doxorubicine leur permet de se placer entre deux paires de bases de l'ADN et d'y contracter des liaisons à haute affinité.

-Interaction avec l'enzyme topo-isomérase II : la présence de la molécule anthracycline niveau du complexe topo-isomérase II et l'ADN stabilise les coupures double brins et inhibe l'action de l'enzyme chargée de relier les extrémités libres des brins coupés.

-Formation de radicaux libres : la réduction enzymatique de l'anneau anthracycline produit un radical libre semi-quinone qui à son tour conduit à la production d'un radical libre hydroxyle; de plus, la conjugaison de la partie hydroquinone de la molécule d'anthracycline avec le fer ferrique intracellulaire peut conduire à la production non enzymatique de radicaux libres (Pein, 1995).

II.4.2.1c. Doxorubicine et rein

Le rein est par ses fonctions spécifiques et ses caractéristiques physiologiques, un organe vulnérable qui présente une susceptibilité à diverses agressions médicamenteuses. Lors de leur élimination rénale sous forme de métabolites réactifs, les médicaments pourront avoir des effets néfastes à différents niveaux. La néphrotoxicité se manifeste par des atteintes fonctionnelles suites à l'action pharmacologique des substances médicamenteuses ou du fait de leurs caractéristiques physico-chimiques, soit une atteinte lésionnelle par ischémie du fait des propriétés vasoconstrictrices de certaines molécules, par cytotoxicité directe (Sylvie, 2004).

II.4.2.1d. Action néphrotique de la doxorubicine

Une partie du médicament est réabsorbée ou sécrétée par l'un des systèmes de transport du tubule rénal et peut s'accumuler dans les cellules tubulaires, cette accumulation peut constituer la première étape du mécanisme d'action néphrotoxique des molécules ayant un effet cytotoxique directe sur l'épithélium tubulaire (aminosides, cisplatine).

L'adrimycine (doxorubicine) une substance largement utilisée en médecine vétérinaire est susceptible de causer une atteinte des cellules tubulaires essentiellement chez le chat mais également chez le chien. Les lésions rénales occasionnées se manifestent par un défaut de concentration urinaire et une protéinurie (Cotters et al 1985). Seulement, les processus physiopathologiques rapportant à la néphrotoxicité de l'adrimycine ne sont pas connus et peuvent impliquer l'action cytotoxique directe du produit (Dubois, 1998). Beaucoup de

travaux signalent un syndrome néphrotique survenant après une seule administration de doxorubicine chez le rat. Mais aucun cas de néphrotoxicité n'a été rapporté chez l'homme traité par la doxorubicine (Lahouel, 1985).

II.5. Dégâts oxydatif cellulaires

Lorsque les systèmes de défense anti-radicalaire sont dépassés, il se produit une accumulation de ROS créant une situation de stress oxydant responsable de l'oxydation des protéines des lipides (peroxydation lipidique) et de l'altération de l'ADN (Renauld, 2005).

II.5.1. La peroxydation lipidique

Les lipides sont les constituants essentiels des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Leur peroxydation est un processus qui intervient dans certaines pathologies impliquant le stress oxydant (Delattre et al, 2005). La peroxydation lipidique est un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables notamment de la diminution de la fluidité membranaire (Fiorucci, 2006). Le cycle de la peroxydation des acides gras polyinsaturés comporte trois phases (figure4). Tout d'abord une phase d'initiation correspond à l'arrachement d'un atome d'hydrogène à partir d'un acide gras polyinsaturé (LH) par un radical R^\bullet tel que le radical hydroxyle, aboutissant à la formation d'un radical alkyl (L^\bullet). Dans la phase de propagation, ce radical va réagir avec l'oxygène pour donner un radical peroxy (ROO^\bullet) qui va interagir avec un autre acide gras polyinsaturé et libérer un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et un nouveau radical alkyl. Enfin, la phase de terminaison correspond à l'association de deux espèces radicalaire et la formation de composés stables (Renauld, 2005; Servais, 2004).

Après cette phase de terminaison débute un processus de dégradation des hydroperoxydes lipidiques via des phénomènes d'hydrolyse aboutissant à la formation de nombreux dérivés toxiques, dont le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE). Ces deux derniers ont été très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Halliwell, 1995; Marnett, 1999).

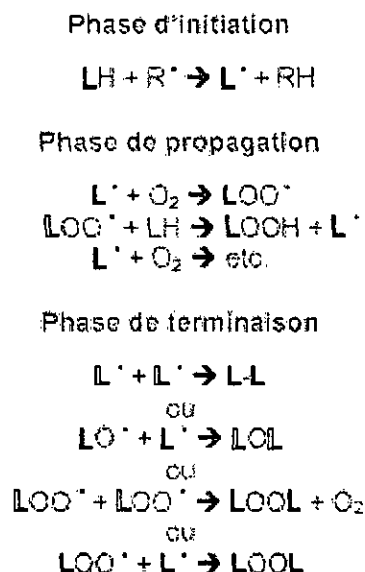


Figure 4 : Chaîne de la peroxydation lipidique (Renauld, 2005).

II.5.2. Oxydation des protéines

En ce qui concerne les protéines, presque tous les acides aminés peuvent être oxydés par les ERO, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) étant les plus sensibles.

L'oxydation des acides aminés génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines, mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme les réticulations intra ou intermoléculaires. Ces altérations peuvent conduire à des modifications structurales des protéines.

Dans le cas des enzymes, les modifications au niveau du site actif peuvent conduire à leur inactivation (Haton, 2005).

II.5.3. Oxydation de l'ADN

Bien que l'ADN soit la mémoire de toute la composition biochimique des être vivants, il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène (Favier, 2003). Il existe deux types d'ADN dans la cellule; l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS. Ainsi le taux de base oxydées serait 2 à 3

fois supérieur dans l'ADN mit par rapport à l'ADN nucléaire (Servais, 2004). L'oxydation de l'ADN induit la formation de 4 grandes classes de lésions:

- La modification des bases nucléiques.
- Les modifications des sites abasiques.
- La modification des pontages et les cassures de chaînes (simple et double brin).

La conséquence de ces altérations sera une erreur de lecture lors de la transcription (Haton, 2005).

II.5.4. Les maladies liées au stress

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteurs déclenchant ou associé à des complications de l'évolution (DE Moffarts, 2005). La plupart de ces maladies apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux (Sohal et al, 2002; Favier, 2003).

Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigue, œdème pulmonaire. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardio-vasculaire. Ainsi que dans plusieurs maladies dégénératives atteignant le système nerveux telles que la maladie dégénérative des neurones moteurs. (Polack et al, 2000; Siso et al, 2005). De même, certains auteurs suspectent l'implication du stress oxydant dans d'autres pathologies comme l'inflammation (Auer et al, 1993). (tableau2).

<ul style="list-style-type: none"> - Arthrite rhumatoïde - Asthme - Athérosclérose - Cancers - Cirrhose - Colites ulcérautes - Diabète sucré - Emphysème - Fibrose kystique - Fibroses pulmonaires - Hémochromatose idiopathique 	<ul style="list-style-type: none"> - Infection au VIH - Maladie d'Alzheimer - Maladie de Crohn - Maladie de Parkinson - Sclérose latérale amyotrophique - Mongolisme - Syndrome de détresse respiratoire Chez l'adulte - Poumon-choc - Veines variqueuses (varices) - Syndrome de Down
---	--

Tableau 2 : *Liste des maladies reliées au stress oxydatif* (Wilson et Salamatian, 2003).

II.6. Mécanismes de lutte contre les ROS

Pour se protéger contre les effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de contrôler et parfois réguler la production des ROS. Ces systèmes sont nommés les antioxydants (Fiorucci, 2006). Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable à concentration faible, d'entrer en compétition avec d'autres substances oxydables et ainsi retarder ou empêcher leur oxydation. Cette définition s'applique un grand nombre de substances, comprenant des enzymes aux propriétés catalytiques spécifiques, mais aussi de petites molécules hydro ou liposolubles (Comhair et al, 2002; Droge, 2002). Les antioxydants peuvent être divisés en deux groupes selon leur mode d'action, les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (piégeurs). (Muzykantov, 2001).

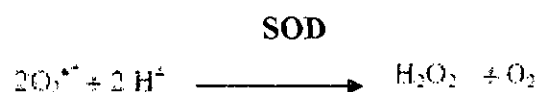
II.6.1. Les antioxydants enzymatiques

Les principales enzymes antioxydants sont la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et la catalase.

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Gutteridge, 1993).

II.6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est l'une des plus importantes enzymes cellulaires qui possède une fonction antioxydante. Cette enzyme catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante:



Il existe trois isoformes de la SOD: Une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc, (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD), et une forme extracellulaire (SOD-EC), située sur la face externe de la membrane cellulaire. (Wassmann et al, 2004).

La forme mitochondriale permet la dismutation quasi instantanée de l'anion superoxyde produit au niveau de la chaîne des transporteurs des électrons protégeant ainsi cet organe contre les ROS.

II.6.1.2. La catalase

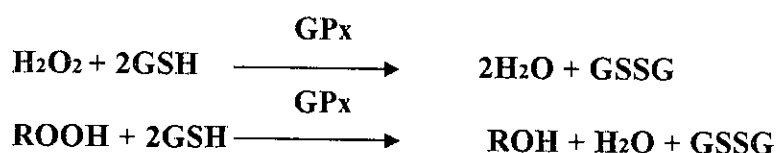
La catalase est une enzyme intracellulaire qui agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante:



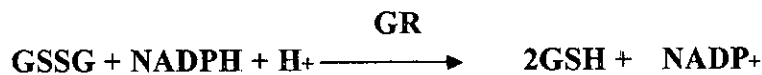
Cette enzyme se retrouve dans les peroxysomes et dans le cytoplasme, elle existe en forte concentration dans le foie et les globules rouges. (Wassmann, 2004). La catalase et la glutathion peroxydase ont des rôles protecteurs similaires et leur contribution relative est assez variable. La catalase est surtout active lorsque le niveau de stress oxydatif est élevé ou que la quantité de glutathion peroxydase est limitée (Wassmann, 2004).

II.6.1.3. La glutathion peroxydase et réductase (GPx) et (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) est la plus importante enzyme qui joue un rôle central dans le mécanisme d'élimination du H_2O_2 . C'est une enzyme mitochondriale et cytosolique qui contient du sélénium, cette enzyme existe également au niveau des membranes cellulaires dont le rôle est de réduire d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organique (ROOH) en alcools. Lors de cette réaction qui demande l'intervention de deux molécules de glutathion (GSH), celle-ci se transforme en glutathion-disulfure (GSSG) (Gutteridge, 1993).



Le glutathion oxydé (GSSG) ainsi produit est à nouveau réduit par la glutathion réductase (GR) qui utilise comme donneur d'électron le NADPH (Haton, 2005).



Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification active peut être résumé dans le schéma suivant:

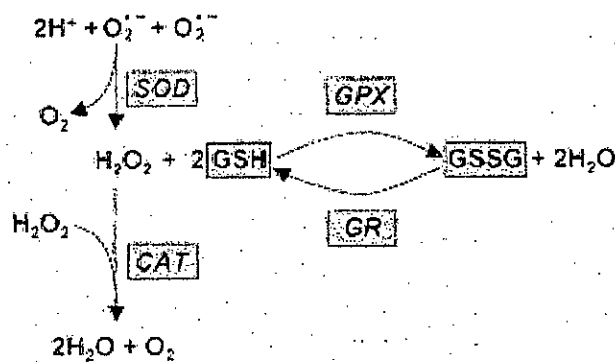


Figure 5: Relation entre les principaux systèmes antioxydant enzymatique (Zubkova et Robaire, 2004).

II.6.2. Les antioxydants non enzymatiques

II.6.2.1. Glutathion (GSH)

Le glutathion ou gamma -L glutamyl- L cystéine glycine est un tripeptide dont la concentration cellulaire peut atteindre dans certaines cellules animales 5mM. Grâce à son groupement SH libre, il constitue les principales sources de thiol dans la cellule. Deux molécules de (GSH) peuvent être oxydées et former entre elles un pont disulfure (GS-GS) (Adrain, 1999).

Le glutathion sous forme réduite fournit donc aux cellules un système de défense contre les RLO et également contre leurs dérivés actifs en jouant le rôle de co-enzymes pour la glutathion peroxydase (GPx). (Meister, 1983; Haton, 2005).

II.6.2.2. Les thiorédoxines (Txn)

Les thiorédoxines sont de petites protéines (12 kDa) douées d'une activité intrinsèque d'oxydoréduction comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH). La thiorédoxines joue un rôle protecteur contre une grande variété de stress oxydatif grâce à ses propriétés de capture des radicaux libres. Une fois oxydée la thiorédoxines est réduite par la thiorédoxines réductase (Haton, 2005).

II.6.2.3. Les métallothioniénes (MT)

Les métallothioniénes sont de petites protéines constituées d'une trentaine d'acide aminés. La première fonction décrite de ces protéines est la détoxification des métaux lourds. Leurs rôles comme antioxydant démontré dans les différents cas de stress oxydant tel le stress induit par les anticancéreux comme la doxorubicine. Ces protéines étaient capables d'éliminer le radical hydroxyle, elles exercent également leur rôle antioxydant en chélatant les ions fer et cuivre et ainsi limite la réaction de fenton (Haton, 2005).

II.6.2.4. La vitamine E

La vitamine E ou l'alpha-tocophérol est une molécule liposoluble qui se localise surtout dans la membrane externe des mitochondries et dans celle du réticulum endoplasmique. La structure moléculaire de l'alpha-tocophérol comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe, qui lui permettent de capter les radicaux libres. (Carr et al, 2000). Son activité antioxydante comprend:

- La protonation des radicaux peroxydes et alcoyle des acides gras membranaires permettant ainsi la terminaison du mécanisme de peroxydation des lipides.
- La réduction des radicaux libres carbonylés.
- La réduction des radicaux libres des semi quinones de xéno biotique.

Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l'alpha-tocophérol connu comme inhibiteur de la propagation lipidique cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical ROO° , et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (Khalil, 2000; Cuvelier et al, 2003).

II.6.2.5. La vitamine C

La vitamine C ou l'acide ascorbique est une molécule hydrosoluble ayant un rôle antioxydant. Son activité antioxydante est comparable à celle de l'alpha-tocophérol au niveau des compartiments hydrophiles de la cellule. Elle est capable de réduire l'anion superoxyde ainsi que les radicaux hydroxyles et peroxydes. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produits par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl), qui est capable de capter certaines espèces radicalaires (Chen et al, 2002). A forte concentration, la vitamine C peut se comporter comme un pro oxydant générateur de radicaux libres (Milane, 2004).

II.6.2.6. Le β -carotène

Le β -carotène est une molécule liposoluble présente dans les membranes biologiques. Sa structure chimique hautement insaturée le fait réagir adéquatement avec les radicaux peroxydes, créant ainsi des produits non radicalaires, ce qui a pour effet d'arrêter la chaîne de réaction radicalaire. Le β -carotène est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes, le radical peroxyde se fixerait sur un carbone de la chaîne polyinsaturée et serait stabilisé par résonance. Différents systèmes in vitro ont confirmé le rôle protecteur de ces molécules. Cependant, les études effectuées in vivo sont peu nombreuses et le rôle antiradicalaire des carotènes reste à préciser. (Milane, 2004).

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'organisme dispose d'un système de défense cellulaire très élaboré et très efficace contre l'agression radicalaire, compléter par les apports alimentaires en substances antioxydantes telles que la vitamine E et C, les caroténoïdes et les flavonoïdes essentiellement. Il en résulte, grâce à ces agents protecteurs, une certaine tolérance de l'organisme vis-à-vis du stress oxydatif. Les flavonoïdes sont actuellement d'ailleurs très étudiés dans le domaine des thérapeutiques antioxydantes, pour compenser l'insuffisance des moyens naturels de protection dans certains désordres comme le vieillissement physiologique et pathologique.

III. Les flavonoides; une famille de polyphénols

Les composés phénoliques correspondent à une grande variété de substances possédant un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle. Parmi les milliers décrits, les plus nombreux sont les flavonoïdes, les composés les plus actifs. Leurs activités biologiques très diversifiées jouent un rôle très important dans la neutralisation des radicaux libres (Brovo, 1998; Louis, 2004).

Ces substances occupent ainsi une place importante dans notre recherche vu leur puissant rôle antioxydant cité par plusieurs auteurs (Nagai et al, 2005, Pincemail et al, 2007).

III.1. Découverte des flavonoides

C'est au début du XX^{ème} siècle que les chimistes et les biochimistes se sont initialement attachés à étudier la composition de l'alimentation humaine et animale, ils ont pour la première fois identifiée une classe de composés qui seront appelés la vitamine (Fiorucci, 2006).

En 1937 Abert Szent-györgyi reçoit le prix noble de physiologie et de médecine pour la découverte de la vitamine C, il a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux était guéris par des extraits du jus de citron riche en vitamine C et flavonoïdes. Cette action à été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité) (Elliott-Middleton et al, 2000). Les flavonoïdes sont connus essentiellement pour la protection des parois cellulaires et des vaisseaux sanguins ainsi pour leur rôle dans la pigmentation des végétaux.

A partir des années quatre-vingt, la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques a relancé l'intérêt pour ces molécules dont les propriétés antioxydantes sont très marquées (Fiorucci, 2006).

III.2. Définition et structure chimique

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Brovo, 1998; Rodriguez-Proteau et al, 2006). Ce sont des pigments responsables de la coloration des fleurs, des feuilles. Ils sont universellement présents dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles et sont susceptibles d'assurer la

protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV. (Brunetton, 1999; Harborne et Al, 2000).

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes, avec plus de 5000 flavonoïdes ont été identifiés (Brovo, 1998). Ils sont une origine biosynthétique commune et par conséquent possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones (Brunetton, 1999).

Leurs structure chimique commune et le motif flavone, constitué de deux noyaux aromatiques A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C. (Cook et Samman, 1996; Peterson et al, 1998; Di Carlo et al, 1999; Manach et al, 2004).

La figure 6 présente le squelette de base des flavonoïdes.

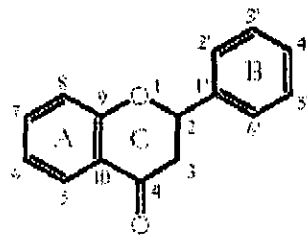


Figure 6: *Squelette de base des flavonoïdes.*

III.3. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés de faible poids moléculaire présentant une grande diversité structurale. Ils sont classés selon plusieurs critères: présence ou non d'une double liaison entre le carbone 2 et 3, et présence ou non d'un groupement hydroxyle en position 3 de l'hétérocycle C (Krishna, 2001). Des groupements hydroxyles (mais également méthoxyles) peuvent le plus souvent se situer en position 2',3',4' et 5' ainsi qu'en position 5 et 7 (Fiorucci, 2006).

Les isoflavones proviennent d'une transposition du noyau aromatique (du carbone C2 vers le carbone C3), les flavones et flavonols d'une oxydation (formation de la double liaison sur le cycle C) respectivement des flavanones et des dihydroflavonols (Fiorucci, 2006).

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isofavanones, les chalcones, les auronnes et les anthocyanes.

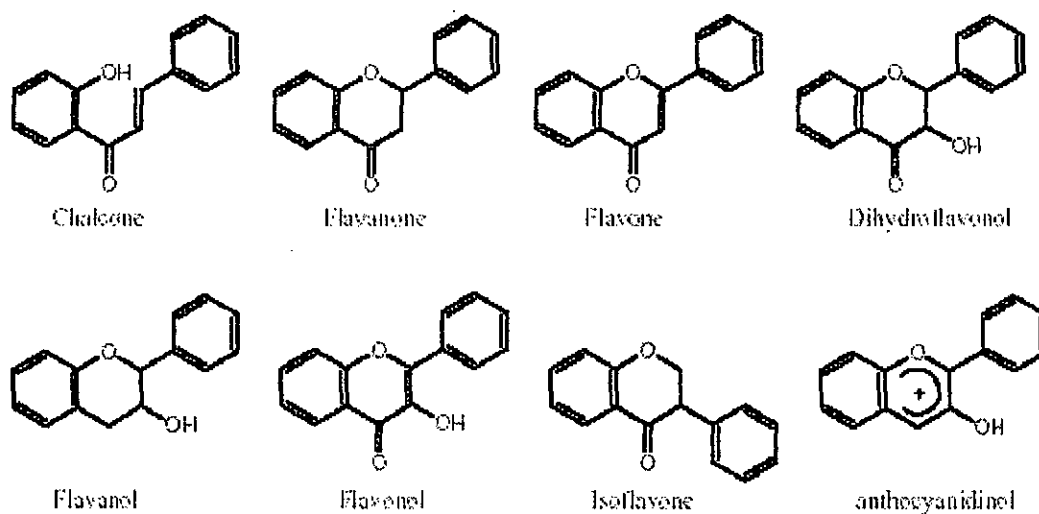


Figure 7: Structure des différents sous-groupes des flavonoïdes.

Il est important de noter que les flavonoïdes se rencontrent également sous formes glycosylées (O- et C-hétérosides), par contre la partie des flavonoïdes qui ne sont pas substituées par un ose est appelée aglycone. Il s'agit généralement des motifs flavone, flavonol, dihydroflavonol et flavanone qui sont substitués par un sucre en position 3 mais également en position 5 et 7 (Krishna, 2001; Fiorucci, 2006).

Les sucres constituant la partie osidique sont habituellement le glucose, le galactose, le rhamnose et l'arabinose (Laraoui, 2007). La figure 8 présente la structure chimique de 2 flavonoïdes hétérosidiques la rutine et la saponarine.

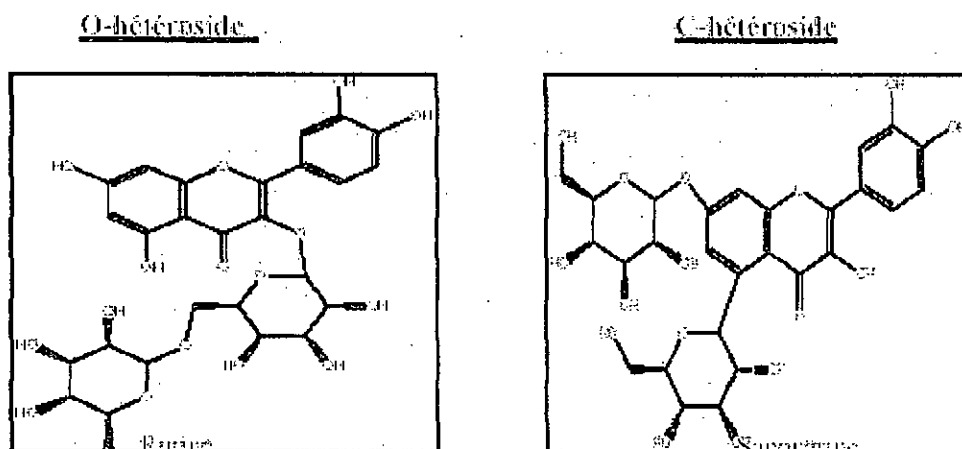


Figure 8 : Structure chimique de la rutine et la saponarine (Milane, 2004).

Ainsi les flavonoïdes se rencontrent substituées par l'acide gallique (cas de flavanols), mais également sous formes polymérique. En prenant comme exemple la catéchine (figure 9).

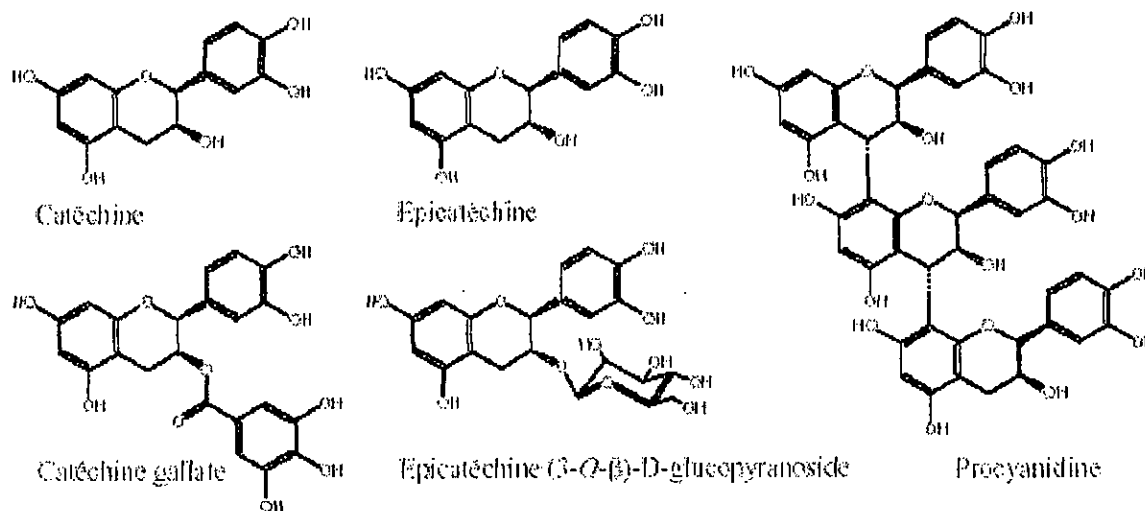


Figure 9: Exemple de la complexité de structures de flavanols. Cas de la catéchine.

Cette grande diversité de structures fait des flavonoïdes l'une des familles de substances naturelles connues les plus étendues. En effet, les techniques d'analyse récentes ont permis d'identifier plus de 8000 flavonoïdes (Markham, 1982; Markham et al, 1998; Harborne et Williams, 2000). L'intérêt grandissant pour les substances naturelles bioactives a contribué à l'intensification des recherches concernant les flavonoïdes, et nul doute que de nouveaux composés de cette famille seront identifiés.

III.4. La biosynthèse des flavonoïdes

Les composés polyphénoliques des végétaux constituent un groupe d'une très grande diversité dont les flavonoïdes font partie (Winkel-Shirley, 2001; Winkel-Shirley, 2002). Ils sont formés dans les chloroplastes et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse pendant laquelle ils catalysent le transport d'électrons (Middleton et al, 2000).

A l'origine, les flavonoïdes proviennent de la désamination d'un acide aminé essentiel, la phénylalanine. La réaction de désamination est catalysée par la phényl ammonia lyase (PAL) et conduit à la formation de cinnamate. Ce dernier est ensuite transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'enzyme cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et la CoA-ligase (4CL). Cette synthèse précède la biosynthèse de tous les flavonoïdes. Le coumaroyl-CoA est ensuite transformé en chalcone en faisant intervenir le malonyl-CoA,

et la chalcone synthétase. Le motif chalcone est ainsi le point de départ de la synthèse des différents groupes des flavonoïdes (Hwang et al, 2003; Fiorucci, 2006; Tanaka et al, 2006). La figure 10 résume les différentes étapes de la biosynthèse des flavonoïdes.

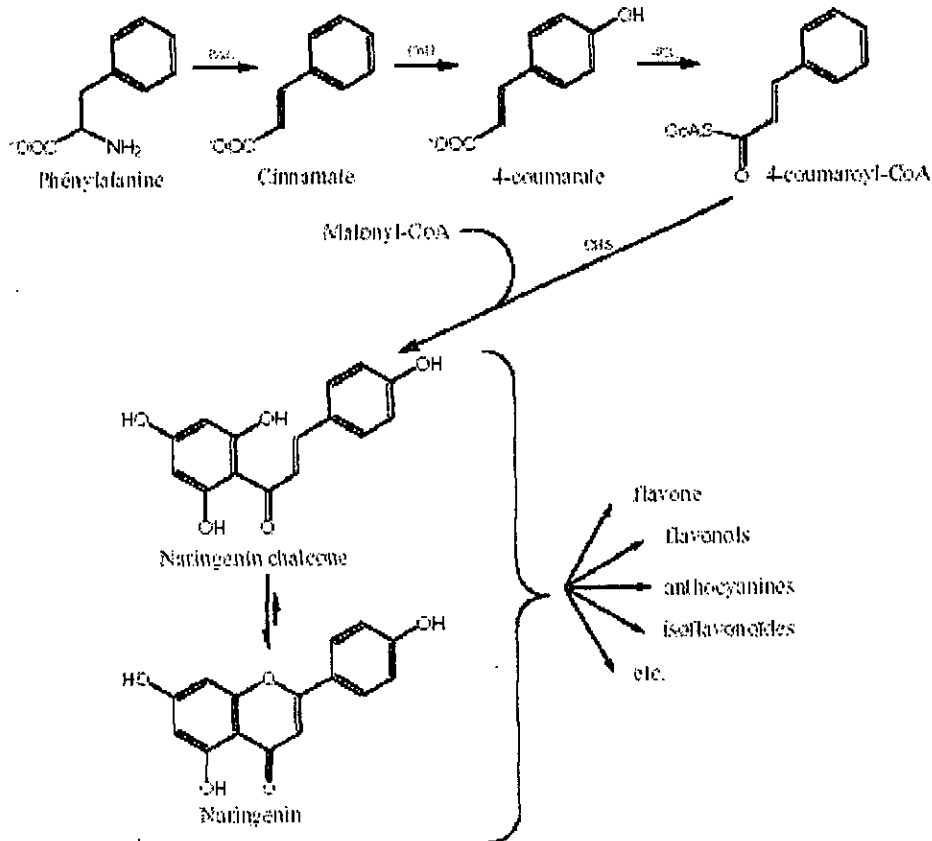


Figure 10: Etapes communes de la biosynthèse de tous les flavonoïdes (Fiorucci, 2006)

III.5. Distribution et localisation

L'organisme humain ne synthétise pas de flavonoïdes mais, de manière générale, elles sont largement rencontrées dans le règne végétal. Nous retrouvons les flavonoïdes dans notre alimentation quotidienne (Scalbert et Williamson, 2000; Aherne et O'Brien, 2002, Manach et al, 2004). Les fruits (orange, raisin, etc.), les légumes (oignon, laitue, etc.), mais également les graines (fève, cacao) ou encore les racines des plantes sont, pour l'homme, des sources important de flavonoïdes. Les feuilles de thé sont également connues pour être riches en flavonoïdes.

Les flavonoïdes sont donc largement rencontrés dans le règne végétal. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs (Milane, 2004).

Par contre, on les retrouve en abondance dans les familles suivantes:

- POLYGONACEES
- RUTACEES
- LEGUMINEUSES
- APIACEES (= OMBELLIFERES)
- ASTERACEES (= COMPOSEES)

De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes se répartissent volontiers dans les organes aérien jeunes ou ils sont localisés dans les tissus superficiels. Ils se répartissent aussi volontiers dans les racines.

Au niveau cellulaire, les flavonoïdes sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux (Milane, 2004).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une très large répartition dans le monde végétal. Le monde animale est lui aussi très concerné par les flavonoïdes. La propolis l'un des produits de la ruche très riche en flavonoïdes .On trouve par exemple de la chrysin, de la quercétine, et de la galangine dans la propolis. Les abeilles la fabriquent à partir des sécrétion de nombreux arbres et la modifient grâce à leurs enzymes salivaires (Marfak, 2003; D'Arcy, 2005).

III.6. Métabolisme des flavonoïdes

Dans les matrices végétales, les flavonoïdes sont généralement libres ou liés à des sucres (forme glycosides). Hormis quelques cas décrits dans la littérature concernant le passage direct dans la circulation sanguin, les formes glycosidiques qui entrent dans l'organisme par voie digestive est généralement déglycosylés (Hollman, 1997).

Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie (Haslam, 1998). L'intestin grêle est le site essentiel de l'absorption des flavonoïdes. A ce niveau les formes libres sont directement absorbées, tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées par la flore intestinale au niveau du colon, avant de pouvoir être absorbées. Cependant, les formes libres issues de cette hydrolyse peuvent aussi être dégradés par la microflore en acides phénoliques, eux même absorbés ou éliminés (Williams et al, 2004).

Une fois absorbée, les flavonoïdes sont soumis à 3 principaux types de conjugaison, la méthylation, la sulfatation, et la gluconidation assurant leur transformation (Spencer, 1999; Crespy et al, 2004). Après transformation intestinale, les flavonoïdes passent ensuite dans la circulation porte hépatique. Au niveau du foie, ils ont transformés par des enzymes hépatiques, une partie des métabolites hépatiques passent dans la bile. Ils sont ensuite

excrétés dans l'intestin, où ils peuvent subir une réabsorption après l'hydrolyse par des enzymes d'origine bactériennes. (Manach et al, 1995; Berta-Vanrullen, 2005).

Généralement, les métabolites glucuro-conjugués et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représente que 3 à 6% de l'élimination totale.

III.7. Biodisponibilité des flavonoïdes

Les flavonoïdes présentent ainsi des propriétés bénéfiques biologiques et antioxydantes. Cependant la qualité nutritionnelle et les effets systématiques des flavonoïdes dépendent de leur absorption au niveau du tractus digestif. Peu d'études systématiques ont été menés sur la pharmacocinétique des flavonoïdes chez l'homme. Toutefois, d'après des expériences menées sur des flavonoïdes prévenant de l'alimentation, il apparaît que leur absorption est faible et implique des mécanismes encore mal connus (Hollman, 1997; Morand et al, 1998; Manach et al, 1999). Seuls les aglycones sont supposés être absorbables, alors que les glycosides comme la rutine doivent subir l'hydrolyse de leur liaison osidique par l'action de la flore intestinale pour leur permettre d'être absorbés au niveau du colon (Markham, 1982; Markham et Bloor, 1998).

En général la biodisponibilité des flavonoïdes dépend de la capacité de transport dans le sang, de métabolisme par divers organes, de stockage et d'élimination (Martin et al, 2002). La biodisponibilité a un effet direct sur les effets biologiques des polyphénols et notamment sur la capacité antioxydante des tissus. In vitro, le pouvoir antioxydant de nombreux polyphénols est supérieur à celui de la vitamine C et de la vitamine E (Vanessa et al, 2003).

III.8. Propriété des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses (Rajendran et al, 2004).

Une des propriétés majeures est de contribuer à la couleur des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On peut également noter que les flavonoïdes jouent un rôle dans la protection des plantes en raison de leur goût désagréable (Bruneton, 1993). Les flavonoïdes montrent

d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains flavonoïdes jouent un rôle de phytoalexines c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Marfak, 2003). Ces composés ont donc fait l'objet de nombreuses recherches en raison de leurs propriétés à capter les radicaux, protégeant ainsi l'organisme contre les dommages oxydatifs. Ils sont ainsi promus à un avenir thérapeutique envers toutes les pathologies engendrées par les radicaux libres (Jovanovic et al, 1994).

III.8.1. Activité antioxydante des flavonoïdes

De nombreuses propriétés mises en évidence *in vitro*, pourraient expliquer l'action antioxydante des flavonoïdes (Youdim et al, 2002).

Les flavonoïdes considérés comme des piègeurs de radicaux libres formés au cours de la phagocytose (l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et d'autres espèces réactives). Ces radicaux provoquant des dommages cellulaires importantes. Les flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de la peroxydation lipidique. Ils réagissent avec les radicaux libres, empêchant ainsi les dégradations des phospholipides membranaires (Yoshino et al, 1994).

Plusieurs études ont montrés le rôle inhibiteur des flavonoïdes sur l'oxydation *in vitro* des lipoprotéines de faible densité (LDL) et des molécules biologiques comme les protéines et l'ADN (Youdim et al, 2002).

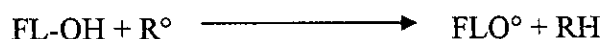
III.8.2. Implications biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant (Peitta, 2000; Cotelle, 2001) : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêche ainsi la réaction de fenton) et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ERO. Sous certaines conditions, les flavonoïdes sont cependant susceptibles de se comporter comme agent prooxydant (Galati et al, 2001) et engendrer une altération des protéines, de l'ADN ou encore des lipides membranaires et des glucides.

III.8.2.1. Capture directe de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont souvent associées à leur potentiel antiradicalaire.

De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des flavonoïdes est essentiellement liée à leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxyde, hydroxyle, peroxydes, et alcoxyle (Erben-russ et al, 1987; Bors, 1994; Rajendran et al, 2004). Les études développés par l'équipe de Bors et al, montrent que les formes réactives des flavonoïdes capables de capturer ces radicaux, et ce par le transfert d'hydrogène selon la réaction suivante (Marfak, 2003).



Où R° représente les radicaux superoxyde, hydroxyle, peroxyde et alcoxyle, et FL-OH les flavonoïdes.

Le radical flavonoxy (FLO°) peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable (Figure 11).

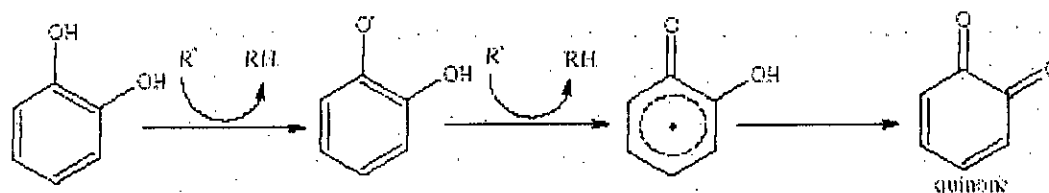


Figure 11 : Piégeage des ROS par les flavonoïdes (Marfak, 2003)

Ce radical flavonoxy peut interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde. Cette réaction est responsable d'un effet prooxydant des flavonoïdes (Marfak, 2003).

Différentes méthodes spectrophotométriques utilisées pour mesurer le pouvoir antioxydant vis-à-vis des ERO (Miller et al, 1996). On pourrait, entre autres citer la méthode DPPH. Le DPPH (1,1, Diphényl-2-picryl-hydrazyle) est un radical libre stable possédant une couleur rouge violet en solution, et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant (Atsumi et al, 1999). Les flavonoïdes sont donc de bons piégeurs de radicaux libres *in vitro*.

III.8.2.2. Interaction avec les cations métalliques

Les flavonoïdes sont connus pour leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques et sont alors capables d'inhiber la réaction de fenton et ainsi empêcher la production d'ERO (Bravo et al, 2001; Zhou et al, 2001). La capacité des flavonoïdes à interagir avec les cations métalliques peut être mise en évidence par les modifications spectrales provoquées par la complexation. Il est alors possible de classer les flavonoïdes selon leur capacité à chélater un cation, et par voie de conséquence selon leur activité antioxydante. Il s'avère que l'un des éléments essentiels d'un flavonoïde concernant sa capacité à complexer un métal est la présence ou non d'un motif catéchol (Moridani et al, 2003). En prenant par exemple la quercétine l'une des molécules les plus représentatives de la famille des flavonoïdes. Elle dérive du motif flavonol, par substitution de groupements hydroxyles en position 3' et 4'. Cette structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'un flavonoïde : le cycle catéchol et l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4. De plus elle possède les trois sites de complexation communément admis pour les flavonoïdes (Fiorucci, 2006).

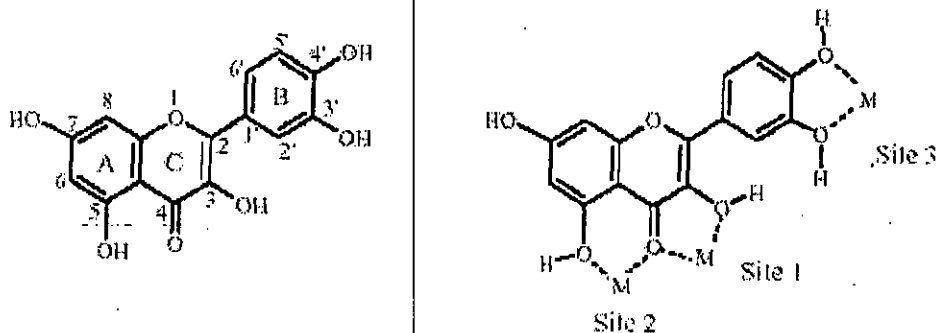


Figure 12 : Structure de la quercétine, et sites potentiels de chélation (Fiorucci, 2006).

Des études récentes laissent supposer que les flavonoïdes en subissant une réaction d'oxydoréduction en présence de métal, possèdent une activité antioxydante accrue (Bodini et al, 1999; Moridani et al, 2003; de Souza et al, 2004). Cette activité est décrite comme étant dépendante de plusieurs conditions comme la présence de métal dans le milieu réactionnel.

Les flavonoïdes sont de bons chélateurs de ces ions métalliques, elles sont capables de coordonner le fer libre et donc d'empêcher la formation de radical hydroxyle. Ces propriétés sont en général attribuées à leur activité antioxydante.

III.8.2.3. Inhibition de diverses enzymes

Les flavonoïdes sont responsable de l'inhibition de très nombreuses enzymes in vitro (Middleton, 2000). Les enzymes directement impliquées dans le stress oxydant et pouvant être inhibées par les flavonoïdes sont la glutathione S- transférase, les lipoxygénases, les cyclooxygénases, la xanthine oxydase et le nitrique oxyde synthase (NOS). Certains flavonoïdes comme la quercétine et la myricétine inhibent la phosphoinositide 3-Kinase, protéine intervenant dans la signalisation cellulaire. Les modes d'inhibition peuvent être différents selon le flavonoïde et l'enzyme étudiés (Fiorucci, 2006).

III.8.2.3a. Xanthine oxydase

Depuis que Mc Cord et Fridovich ont démontré la participation de la xanthine oxydase dans la production de radicaux libres, cette enzyme a été largement étudiée. Elle catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette réaction s'accompagne de la génération des ERO, anions superoxyde et l'eau oxygénée à partir du dioxygène (figure 13) (Fiorucci, 2006).

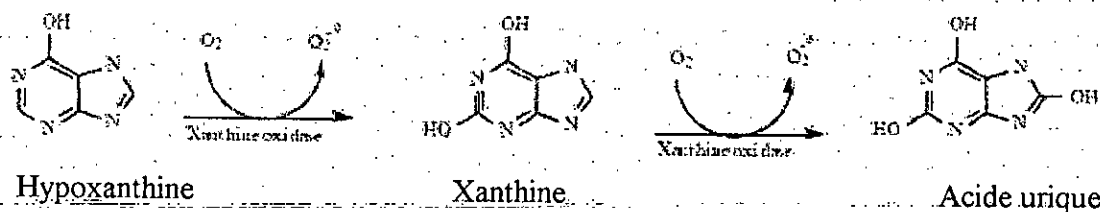


Figure 13 : *Processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase.* (Fiorucci, 2006)

A l'aide de la chimie quantique, il a été montré une similarité au niveau structural et électronique du cycle purine de la xanthine et du cycle A des flavonoïdes (Da Silva, 2004).

Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la xanthine oxydase. Hansaki et collaborateurs, dans une étude sur la maladie de la goutte. On montré que les flavonoïdes peuvent agir sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent peuvent faire régresser la maladie de la goutte en réduisant à la fois les concentrations d'acide urique et celles du radical superoxyde dans les tissus humains (Marfak, 2003).

III.8.2.3b. NO synthases

Les nitriques oxydes synthases constituent un groupe d'enzymes responsables de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) à partir de l'atome d'azote terminal d'une L-arginine en présence de l'oxygène et de différents cofacteurs comme la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) (Stryer, 1992).

De nombreuses publications traitent de ce sujet et font références aux flavonoïdes comme inhibiteurs potentiels de la NOS. Mais aucun indice au niveau moléculaire n'a pu être apporté pour éclaircir le mécanisme d'inhibition.

III.8.2.3c. Lipoxygénases

Les lipoxygénases constituent une classe d'enzymes responsables de l'oxydation des acides gras polyinsaturés.

Bien que le cycle catalytique des lipoxygénases ait été très étudié et le mécanisme d'oxydation des acides gras soit relativement bien connu, leur inhibition par les flavonoïdes a fait l'objet d'études récentes. La molécule la plus étudiée reste la quercétine et un mécanisme particulier considéré comme étant responsable de l'inhibition de la 3-lipoxygénase. En effet, la quercétine semble être dégradée au sein de l'enzyme, et le produit de dégradation (l'acide protocatéchuique) serait responsable de l'inhibition de l'enzyme (Borbulevych, 2004).

III.8.2.4. Prooxydation

Un nombre croissant de publications traitent de l'effet prooxydant des flavonoïdes. Certains auteurs attribuent ces effets à la capacité d'autooxydation des flavonoïdes, engendrant les formes semi quinones et quinones ainsi que la production de ERO. La présence d'une double liaison en position 2,3 et de la fonction carbonyle en position 4 permet une isomérisation de la forme quinone en quinones méridiennes connues pour être des formes responsables d'altérations des acides nucléiques et aminés. Les mécanismes ne sont clairement définis, mais récemment plusieurs modes d'action ont été proposés (figure 14) (van der Woude, 2005).

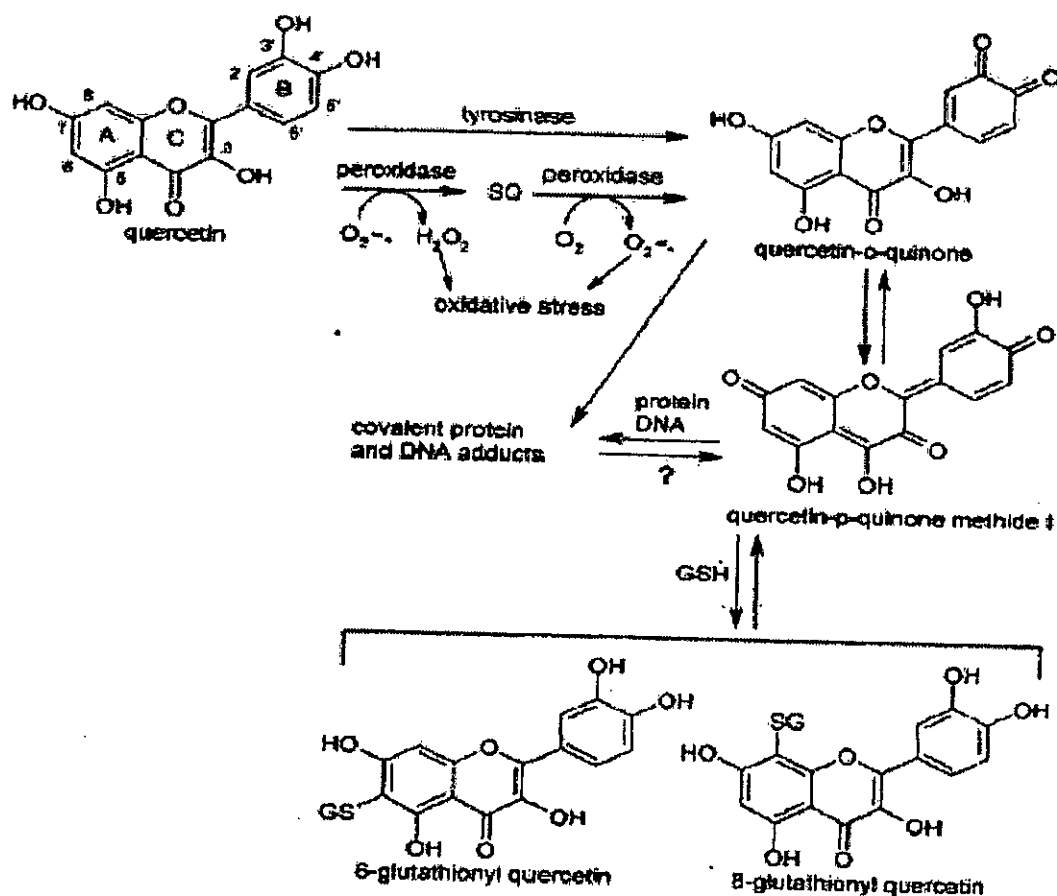


Figure 14 : Relation entre les formes actives de la quercétine et leur activité prooxydante

(Van der Woude, 2005)

III.8.3. Relation structure activité antioxydante

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité à piéger les radicaux libres. En analysant tous les résultats la communauté scientifique a pu conclure que les composés les plus actifs sont ceux qui combinent les trois critères suivants :

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B qui confère la stabilité au radical flavonoxy.
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe 3-OH en combinaison avec la double liaison C2-C3.

A titre d'exemple, la quercétine satisfait à tous ces critères et par conséquent, elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes (figure 15) (Dragan, 2003; Marfak, 2003; Yousfi et al, 2006).

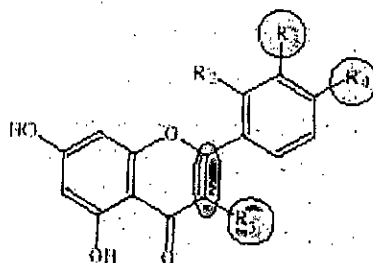


Figure 15 : *Eléments essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes* (Marfak, 2003).

III.8.4. Autres activités des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles qui forment une grande partie des métabolites secondaires. Cette catégorie de composés naturels possède divers activités thérapeutique ; ils sont anticancérogènes, anti-inflammatoire, antithrombique, antibactérienne, antihépatotoxique, antihypertensives, antivirale, anti-allergique et anti-ulcéreux (Jaakola, 2003). Les flavonoïdes pourraient exercer une activité antibactérienne et ce par l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes ou par l'inhibition du métabolisme microbien (Mila et Scalbert 1994).

Des études réalisées chez la souris mettent en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs des tumeurs. La quercétine, est un flavonoïde capable de diminuer chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induits par le NMU (N-nitrosométhylurée). Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques, notamment en stimulant les systèmes de détoxification (Milan, 2004).

Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires (Hertog, 1993).

D'autres flavonoïdes comme la quercétine et la naringénine jouent un rôle important dans la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. Il a été suggéré que la quercétine exerce son activité via un mécanisme complexe impliquant la production du mucus, le piégeage des radicaux libres (Di Carlo, 1999).

Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétique (Ong, 2000; Marfak, 2003).

III.9. La propolis, une source des flavonoïdes

III.9.1. Définition

La propolis désigne toute une série de substances résineuses gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, récoltée sur certaines parties (bourgeons et écorces essentiellement) de végétaux par les abeilles qui la rapportent à la ruche et qui l'additionnent et la modifient en partie par l'apport de certaines de leur sécrétions propres (cire et sécrétions salivaires essentiellement). (Bankova et al, 2002; Kartal et al; 2002, Sawaya et al, 2002) .

Comme tous les autres produits de la ruche, la propolis existe depuis que l'abeille est apparue sur terre il y a environ 125 millions d'années (Burdock, 1998; Bankova, 2005). Le mot propolis vient du grec "pro", en avant ou défense de et "polis", la ville qui signifie "défense de la ville" (Antonio et al, 2005).

La propolis est disposée par les abeilles à l'entrée de leur ruche pour éliminer les risques de contamination (bactéries, moisissures), elle est aussi utilisée comme ciment pour coller les différents éléments de la ruche. Enfin la propolis est une substance essentielle à la vie de la ruche, les abeilles utilisent cette matière résineuse pour colmater des trous et pour construire des défenses à l'entrée de la ruche (Alexandre, 1999).

III.9.2. Propriétés physicochimiques de la propolis

La propolis voit sa couleur et son odeur changer en fonction de la plante dont elle provient. C'est une substance brune très odorante, sa saveur souvent âcre et parfois amère, dont la consistance varie suivant la température; dure et friable à 15°C, elle devient molle aux alentours de 30°C et collante jusqu'à fondre vers 60- 70°C, mais le point de fusion peut aller jusqu'à 100°C (Alexandre, 1999).

En ce qui concerne la solubilité de la propolis, elle est insoluble dans l'eau, mais soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, et le chloroforme (Bankova et al, 2000).

III.9.3. Origine de la propolis

La propolis est une résine, extraite par les abeilles à partir des plantes autour de leur ruche, usagé à renforcé les peignes et garder l'aseptique de l'environnement de la ruche. La composition de propolis varie selon les plantes qui peuvent être trouvées dans une région spécifique. En Europe, Amérique du Nord et les régions non tropicales d'Asie, la source principale de la propolis est l'exsudat des bourgeons de peuplier avec toutes ses espèces (Greenaway et al. 1990; Bankova et al, 2000; Bankova et al, 2002).

Dans les régions tropicales ces espèces ne sont pas natives et, par conséquent, les abeilles doivent trouver d'autres sources pour leurs résines. La propolis de la région tropicale contient des flavonoïdes lipopholique (Bankova et al, 1999; Sawaya et al, 2002).

En effet les résultats de Velikova et al confirment que l'origine de la propolis européenne est sans aucun doute le peuplier et que dans les zones frontières, tel qu'en Algérie où les peupliers ne sont pas, toujours disponibles pour la collection, les autres sources de la plante sont utilisées, cependant, cela n'affecte pas les propriétés de la propolis (Velikova et al 2000b; D'Arcy, 2005).

III.9.4. Composition chimique de la propolis

La propolis est un produit naturel dont la composition varie en fonction des zones géographiques et de ses origines botaniques (Sawaya, 2002), mais elle présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable. Globalement la propolis est constituée de: 50 à 55% de résines et baumes, 25 à 30% de cire, 10% d'huiles essentielles, 5% de pollen et 5% de matières diverses organiques et minérales (Kosalec et al, 2003).

A ce jour plus de 300 substances ont été identifiées dans la propolis mais les principaux sont de la classe des flavonoïdes (Kartal et al, 2002), substances qui jouent un rôle considérable en thérapeutique (Su-Hsiang et al, 2004). On trouve également des acides gras

et des acides phénoliques et ses esters, terpènes, aldéhydes aromatiques et alcool (Kartal et al, 2002).

Les abeilles modifient la composition de la propolis à travers l'action de β -glycosidase, cette enzyme hydrolyse l'hétéroglycosides du flavonoïdes en aglycones (Park et al, 1997; Marcucci et al, 2001).

III.9.5. Propriétés thérapeutiques

La propolis est considérée comme l'un des plus anciens remèdes de l'humanité, en raison de ses propriétés thérapeutiques. L'efficacité de cet antibiotique naturel est essentiellement due aux flavonoïdes qui la composent (Park et al, 1997; Sera-Bonvehi et al, 1994).

Plusieurs recherches ont montré que la propolis possède un spectre d'activités très large à savoir: Activité antioxydante (Sun et al, 2000), antifongique (Murad et al, 2002), antibactérienne (Velikova et al, 2000; Marcucci, 1995), antiviral (Sera-Bonvehi et al, 1994; Amoros, 1994), antiulcéreuse, immunostimulante (Burdok, 1998) hépatoprotective (Gonzales et al, 1995) et anti-inflammatoire (Strehl et al, 1993).

Pour l'ensemble de ses propriétés pharmacologiques, la propolis occupe une place très importante dans l'arsenal thérapeutique.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de pharmacologie et phytochimie du département de biologie à l'université de jijel. Il est consacré à l'évaluation de l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis contre un stress oxydatif rénal.

I. Matériel végétal

I.1. Récolte de la propolis

La propolis est récoltée des ruches de la coopérative apicole de Kaous (JIJEL) par grattage et raclage de l'entrée des ruches et aussi des alvéoles. Elle provient de ruches dont les abeilles ont été élevées naturellement. Les conditions de stockage sont respectées: la propolis est gardée dans des récipients bien fermés et placée dans un endroit à l'abri de la lumière et de la chaleur avant son utilisation afin de garder ses principes actifs intacts. Elle est ensuite découpée en petits morceaux puis lavée dans l'alcool absolu pendant 2 heures, ensuite plongée dans l'alcool 95% pendant 15 jours.



I.2. Extraction des flavonoïdes de la propolis

L'extraction des substances bioactives contenues dans la propolis est réalisée selon le protocole décrit par Bruneton (1993) en utilisant l'éthanol et le méthanol pour extraire les composés phénoliques parmi eux les flavonoïdes, l'éther de pétrole pour se débarrasser des cires et des graisses. Les gènes libres ou aglycones flavoniques sont extraits par l'éther diéthylique et les hétérosides flavoniques par l'acétate d'éthyle.

Pour cela, la propolis est coupée en petits morceaux, lavée dans l'éthanol pendant deux heures pour éliminer les impuretés et laissée macérer pendant 15 jours dans l'éthanol, 1g de propolis pour 10ml d'éthanol.

Après filtration sur le coton, le filtrat est évaporé à 79°C en utilisant un évaporateur rotatif (Evaporateur E100, Heidolph). Le résidu est repris dans le méthanol 70% et laissée à macération pendant une nuit. Après évaporation du solvant, l'extrait obtenu est appelé extrait brut ou extrait éthanolique de la propolis. L'extraction est poursuivie par passage dans

différents solvants afin d'extraire les aglycones et les hétérosides flavoniques. Pour cela, l'extrait brut est suspendu dans un mélange méthanol/eau (V/V), et la solution hydroalcoolique subit une série d'affrontements par 3 solvants différents:

- **Affrontement par l'éther de pétrole:** nous avons ajouté l'éther de pétrole à la phase hydroalcoolique. Après agitation énergique et repos de 10 min dans une ampoule à décanter, deux phases sont obtenues: une phase organique en haut contenant les graisses et les cires et une phase hydroalcoolique en bas.
- **Affrontement par l'éther diéthylique:** sur la phase hydroalcoolique obtenue après affrontement par l'éther de pétrole, nous avons répété les mêmes opérations mais avec un autre solvant qui est l'éther diéthylique. Deux phases sont ainsi obtenues; phase éther diéthylique en haut contenant les aglycones flavoniques et phase hydroalcoolique en bas.
- **Affrontement par l'acétate d'éthyle:** sur la phase hydroalcoolique obtenue après affrontement par l'éther diéthylique, nous avons répété les même opération mais avec l'acétate d'éthyle. De même deux phases sont apparues, une phase acétate d'éthyle contenant les glycosides flavoniques et une autre hydroalcoolique en bas.

Les deux phases (éther diéthylique et acétate d'éthyle) sont ensuite évaporées à sec dans l'évaporateur avec la pesée des extraits afin de faire les analyses chromatographiques.

I.3. Dosage différentiel des flavonoïdes

Le dosage différentiel des flavonoïdes est effectué en se basant sur les propriétés chélatantes d' AlCl_3 . Le taux des flavonoïdes a été déterminé par la méthode de réactivité avec le AlCl_3 comme décrit par Boharune et al 1996. En solution éthanolique 2%, le chlorure d'aluminium forme un complexe avec les composés flavoniques ayant des hydroxyles libres en C3 et en C5, et le carbonyle en 4 (Figure 16).

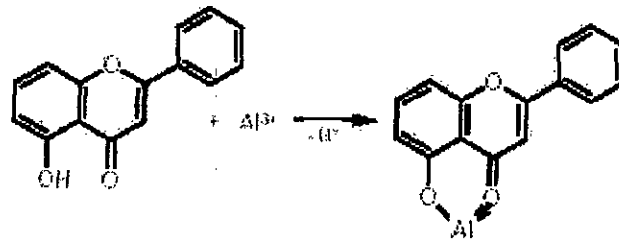


Figure 16: Site de chélation de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes

Deux solutions sont nécessaires: la première avec l'éthanol 96°, la seconde avec l'éthanol 96° contenant AlCl_3 à 2%. Après 10 mn d'incubation, on lit l'absorbance à 430 nm.

La teneur en aglycones exprimée comme quercétine en (mg quercétine équivalent/g de l'extrait de propolis) est calculée selon la formule suivant:

$$C = (\text{DO}/\epsilon) \cdot M \cdot V \cdot (d/p)$$

Avec:

C : le taux des flavonoïdes en mg/g de propolis.

DO : densité optique.

M : masse molaire de la quercétine (=336g/mole).

V : volume de l'extrait

ϵ : coefficient d'extinction molaire de la quercétine (=23000).

p : poids de l'extrait de la propolis en gramme.

d : facteur de dilution.

I.4. Méthodes et techniques d'analyse chromatographiques des flavonoïdes de la propolis

La chromatographie sur couche mince (CCM), ainsi que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), couplée avec des méthodes de détection par spectrophotométrie UV et par spectroscopie de masse (SM) sont des techniques analytiques qui jouent un rôle important dans la séparation et l'identification des constituants chimiques dans un extrait brut.

Nous présentons ci-dessus les techniques que nous avons effectuées: la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG-SM) et l'HPLC. Ces techniques furent utilisées pour analyser l'extrait éthanolique de la

propolis, afin d'avoir des indications sur la nature des constituants que l'on peut rencontrer dans la propolis.

I.4.1. La chromatographie sur couche mince analytique (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée, et une technique rapide, simple et peu coûteuse. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées.

Les produits flavoniques auxquels on attribue les effets biologiques de la propolis sont recherchés et séparés par chromatographie sur couche mince, réalisée selon la méthode décrite par Nieva-Moreno et al (2000), les conditions chromatographiques sont les suivantes:

- Support chromatographique: plaque en verre de gel de silice (épaisseur 0.5 mm).
- Phase mobile: chloroforme pour l'extrait brut.
- Révélation: solution éthanolique de $AlCl_3$ à 1%.

Après le développement du chromatogramme la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à la lumière UV (254 - 336 nm). Si nécessaire les taches du chromatogramme sont révélées par une solution éthanolique de $AlCl_3$ à 1%, on détermine alors, pour chaque constituant le rapport frontal.

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine et la tache du produit}}{\text{Distance entre l'origine et le front du solvant}}$$

1.4.1.1. Relation fluorescence- structure

L'examen des pigments flavoniques en lumière ultra violet fournit des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. En dehors des isoflavones tous les composés flavoniques apparaissent en UV sous forme de spots colorés dont certains sont fluorescents (Lahouel; 2005).

Le tableau 3 résume les relations entre la structure du composé flavonique et sa fluorescence.

Tableau 3: Relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes (Lahouel, 2005).

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir, Marron	Flavonols 5, 6,7 tri- OH libres Flavonols 5, 7,8 tri- OH libres
Brun-noir	3- OH absent ou 3- OH substitué
Violet	Flavones 5- OH et 4'- OH Flavones 3- OR et 5- OH, 4'- OH Flavones ou flavonols 5-OH avec 4'-OH absent ou substitué en 3. Flavones 6- ou 8- OH Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavanones
Bleu-clair (fluorescent)	Flavones sans 5- OH libres Flavonols sans 5- OH libres avec 3- OH substitué
Jaune terne, jaune, fluorescence orangée	Flavonols 3-OH libre avec ou sans 5-OH substitué
Jaune vert brillant	5- OH libre ou 5- OH substitué
Jaune fluorescence	Flavonols avec 3- OH libre
Jaune pâle	Dihydroflavonols

1.4.1.2. Relation Rf- structure

Les relations existantes entre le Rf et la structure des molécules peuvent également donner des renseignements sur la structure des flavonoïdes.

Le comportement chromatographique des flavonoïdes en fonction de leur structure dans un solvant alcoolique ou aqueux nous permet de mentionner les premières indications concernant la substitution du squelette de la molécule flavonique.

Quelques exemples de la relation Rf- structure sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 4: *Relation structure-Rf* (Lahouel ; 2005).

Structure flavonique	Rf
Augmentation des groupements hydroxyles	Diminution du Rf dans un solvant lipophile
Glycosylation	Rf augmente dans un solvant aqueux Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hydroxyles méthylés	Augmentation du Rf dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un hydroxyle en 5	Rf diminue en solvant alcoolique
Hétérosides des flavonols avec 3- OH libre	Rf nul dans l'eau

1.4.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance est l'une des techniques analytiques utilisée dans la séparation des constituants chimiques d'un mélange.

• Principe

La chromatographie liquide est une méthode physico-chimique largement utilisée dans l'analyse des produits phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes. Cette technique basée sur les différences d'interactions permet de réaliser assez facilement des séparations et des analyses qui seraient difficiles par d'autres techniques chromatographiques. Le mélange des produits à séparer est mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenue dans la colonne chromatographique.

Ces interactions provoquent des échanges qui aboutissent à la séparation. La spectrophotométrie UV est utilisée comme un détecteur de l'HPLC, elle permet de compléter les informations apportées par le comportement chromatographique HPLC et de caractériser les molécules. Dans ce cas chaque composé absorbe à une longueur d'onde bien déterminée.

▪ **Conditions chromatographiques**

HPLC Varian

Colonne: Nucleodur®. Machery-Nagel (250 X 4.6 mm) C-18, 5µm.

Détecteur UV à barrettes de diodes: Varian Prostar®

Concentration de l'échantillon: 10 mg/ml

▪ **Méthode d'éluion:**

T (min)	A : 0.01% TFA	B : ACN
0	90	10
10	90	10
50	50	50
65	50	50
70	0	100
80	0	100
85	90	10

1.4.3. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM)

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse est l'un des plus puissants outils d'identification de constituants d'un mélange.

▪ **Principe de la (CPG/SM) ou (CG-SM)**

Si on dispose d'un ensemble CPG-SM (CG-SM), c'est à dire d'une chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse. On injecte dans le chromatographe en phase gazeuse un mélange de produits. Chaque produit, séparé par la colonne, est analysé l'un après l'autre par le spectromètre de masse (Figure 17).

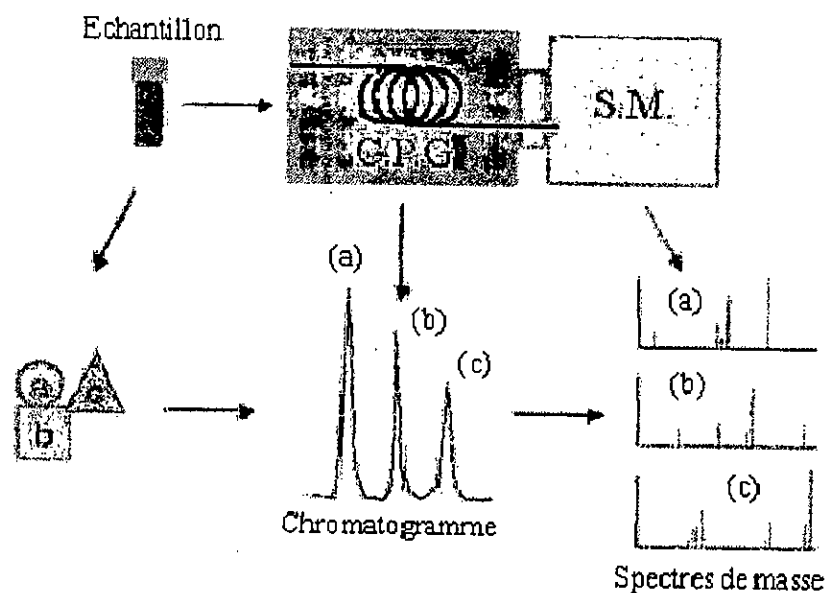


Figure 17 : Schéma du principe d'un CPG-SM.

Le spectromètre de masse fonctionne alors comme un détecteur de la chromatographe en phase gazeuse. Ce dispositif permet d'obtenir un chromatogramme, de doser chaque constituant du mélange et d'identifier ces constituants à l'aide de leur spectre de masse.

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible permettant de déterminer le poids moléculaire d'un produit pure ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus.

Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduite dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ion fragments caractéristiques. Cette dissociation se fait selon un mécanisme bien déterminé.

L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

▪ **Appareillage et méthodes**

L'analyse CG/SM a été effectuée en utilisant un chromatographe GC 2010 avec une colonne apolaire FS-SE 30 CB de longueur 25 m et de 0,25 mm de diamètre. Le gaz vecteur est l'He et le volume d'injection 0.5µl.

Le chromatographe est couplé à un détecteur MS QP-2010 utilisant le mode EI comme source d'ions (70 EV) et ayant une température maximale de 350 °C.

Deux programmes ont été testés le premier sur l'extrait brut de la propolis et le second sur différentes fractions (phase éther diéthylique, phase acétate d'éthyle).

1^{er} programme : T initiale : 150 °C, T finale : 280 °C, avec un palier 10°C/min.

2^{ème} programme : T initiale : 100 °C, T finale : 280 °C, avec un palier 3°C/min.

II. Matériel animal

II.1. Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur des rats wistar albinos mâles (institut Pasteur d'Alger, Algérie) pesant environ 250g. Les animaux sont repartis en quatre groupes. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. La température de l'animalerie est maintenue à 22°C, une hygrométrie de 60% et un cycle jour nuit 12h-12h.

II.2. Traitement des animaux

Notre travail est consacré à l'étude de l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis contre le stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine à la dose de 10mg/kg. Les animaux sont répartis en quatre groupes:

Groupe 1 (8 rats) : animaux témoins recevant 1.25 ml d'eau par voie orale pendant 7 jours.

Groupe 2 (8 rats) : animaux recevant 1.25 ml de l'extrait brut de la propolis (flavonoïdes) à la dose quotidienne de 100mg /kg par voie orale pendant 7 jours.

Groupe 3 (5 rats) : les animaux sont prétraités par les flavonoïdes de la propolis à la dose quotidienne de 100mg /kg pendant sept jours. La doxorubicine 10mg /kg est administrée au 7^{ème} jour par voie intraveineuse.

Groupe 4 (5 rats) : Les animaux de ce groupe sont traités par la doxorubicine seule à la dose de 10mg /kg au 7^{ème} jour par voie intraveineuse.

II.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des échantillons biologiques

Les animaux sont placés en cage à diurèse pendant deux périodes consécutives de 24h après l'injection du médicament et à la veille du jour du sacrifice. Les urines sont récupérées pour la mesure de l'activité enzymatique de la γ -glutamyl- transpeptidase.

Le sang est prélevé au délais de: 24 h, 7 jours et 15 jours à l'aide d'un tube capillaire au niveau de l'œil (sinus rétro-orbital). Le sang est récupéré dans des tubes et centrifugé à 3300 tours/minute pendant 10 minutes. Le sérum est récupéré et congelé pour les analyses biochimiques et enzymatiques.

Les animaux sont sacrifiés à intervalles de temps réguliers 24 h, 7 jours et 15 jours après l'administration du médicament anticancéreux la doxorubicine. Ils sont sacrifiés après anesthésie par l'éther.

Les reins sont prélevés et congelés à (-20°C) pour réaliser les dosages biochimiques.

III. Méthodes

III.1. Mesure de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis

En vue d'évaluer l'effet scavenger ou le pouvoir antioxydant d'un composé vis-à-vis des ERO, la méthode au DPPH est utilisée (Ancerewicz et al, 1998). Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle) est un radical libre stable possédant une couleur violet en solution et virant au jaune lorsqu'il capturé par un antioxydant comme les flavonoïdes. Ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 515 nm.

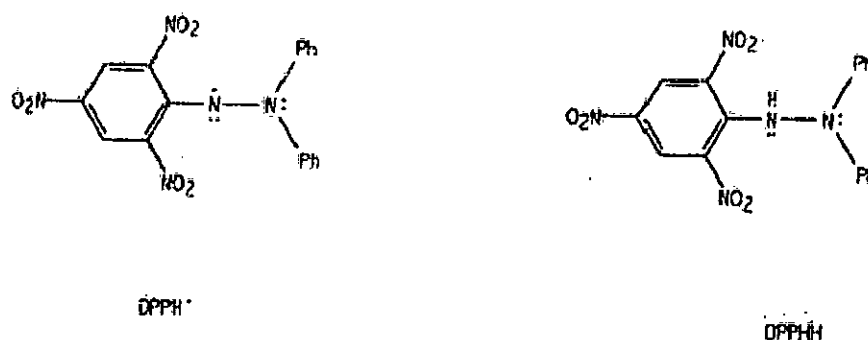


Figure 18: *Forme radicalaire et réduite du DPPH.*

La capacité à piéger les radicaux libres (activité scavenger) de l'extrait éthanolique de la propolis est déterminée par l'utilisation du test du (Diphenyl-2-picryl-hydrazyl stable free radical (DPPH). Le test est effectué par la mesure de la décroissance de l'absorbance à 515 nm d'une solution de DPPH 100 μ M (1.5 ml) préparée dans l'éthanol en présence de 15 μ l de différentes concentrations de l'extrait éthanolique de la propolis au moyen d'un spectrophotomètre (Ultrospec 100 pro) pendant 5 minute.

L'effet piègeur est déterminé en pourcentage de réduction en prenant le 100% du control selon la formule suivante:

$$\% \text{ de réduction} = [Ac - Ae / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du control après 5 min.

Ae : absorbance de l'essai après 5 min.

III.2. Dosages tissulaires

Les dosages de MDA et du glutathion sont effectués sur des fragments de rein au délai de 24 h, 7 jours et 15 jours après le traitement par la doxorubicine.

III.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

L'évaluation de la peroxydation lipidique *in vivo* s'avère délicate du fait qu'une grande partie des produits sont rapidement métabolisés. De plus, la grande diversité des espèces formés (radicaux libres à courtes durée de vie, hydroperoxydes lipidiques, aldéhydes et alcanes) rend difficile le choix d'un marqueur de l'ensemble de ce processus. De nombreuses techniques d'évaluation ont été proposées, mesurant chacune des métabolites différents, comme par exemple la mesure des radicaux libres, des alcanes, des hydroperoxydes lipidiques ou encore des aldéhydes essentiellement le MDA (Bacot, 2004), le marqueur le plus utilisé, notamment pour la simplicité de la méthode de dosage

Le malondialdéhyde (MDA) est un index de la peroxydation lipidique globale. La méthode est basée sur la détection spectrophotométrique du complexe MDA-acide thiobarbiturique (MDA-TBA) (figure 19).

La méthode d'OKhawa et al (1979), est utilisée pour ce dosage. Le principe de dosage est le suivant: Le MDA réagit avec deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) dans un milieu acide et à chaud (100°C) pour donner un pigment coloré en rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.

Pour ce dosage nous avons utilisé 1g de rein additionné à 3 ml de solution de KCl (1,15 M) puis broyage par un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES, Glass company an ISO-9001 steered firm. New Jersey USA). A 0.5 ml de l'homogénat nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique à 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.67 %. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidis puis additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 tours/minute, la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530.

Les concentrations du MDA sont déduites à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant le tetraethoxypropane.

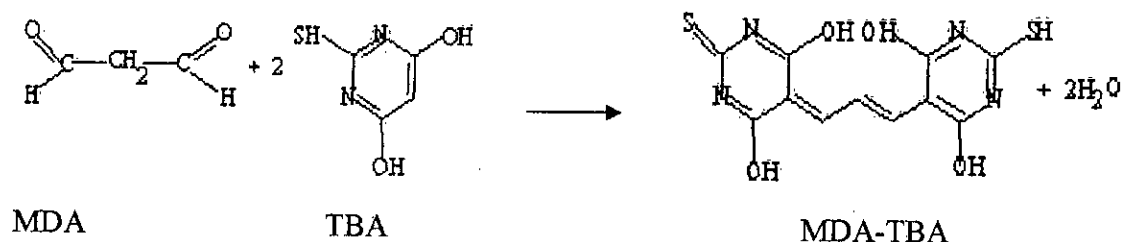


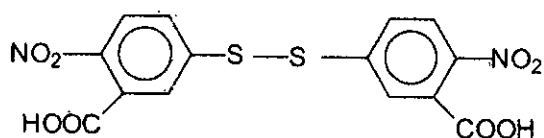
Figure 19: Réaction du malondialdéhyde (MDA) avec l'acide thiobarbiturique d'après Janero, 1990.

III.2.2. Dosage du glutathion.

Le glutathion est un tripeptide composé de trois acides aminés : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Il est présent dans toutes les cellules à des concentrations variables allant de 0.5 à 10 mM et de l'ordre des μ M dans le plasma. Le glutathion constitue la principale source de thiol dans la cellule, il se trouve sous deux formes : une forme oxydée "GSSG" et une forme réduite "GSH" représentant plus de 99% de la quantité totale (Viot, 2004).

Pour le dosage du GSH nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) par le réactif DTNB (acide 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoïque). Le principe de la réaction consiste à l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :





**5, 5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
(DTNB)**

Pour cela, 1g de rein (frais ou congelé) est homogénéisé avec trois volumes de l'acide trichloracétique TCA (5%) à l'aide d'un broyeur de DOÛNCE. Homogénéisé et centrifugé à 2000 tours/minute, ensuite 50µl du surnageant sont dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0.1M, PH =8). 20µl du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 5 minutes d'incubation, la lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5 %).

Le taux de GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations exprimées de glutathion par gramme de rein (m mole/g de rein).

III.2.3. Dosage de la créatinine

La créatinine provient du métabolisme de la créatine musculaire et la quantité quotidienne produite est relativement constante. Au rein, la créatinine est filtrée par le glomérule et une partie moindre est sécrétée par les tubules. La mesure de la créatinine dans le sang est le test à utiliser pour une évaluation de base de la fonction rénale.

La créatinine sérique est mesurée selon la méthode colorimétrique de jaffer (Bonsnes et al, 1945) grâce à la formation d'un produit coloré en présence d'un picrate alcalin. La mesure est faite à l'aide d'un spectrophotomètre à 492 nm. La créatinémie est exprimée en µmoles/ l.

III.4. Mesure de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl transpeptidase (δGT)

La gamma-glutamyl transpeptidase (δGT), est une glycoprotéine principalement trouvée dans les membranes des cellules ayant une activité importante de sécrétion et d'absorption. Le rein est l'organe le plus riche en activité gamma-glutamyl transpeptidase. La concentration hépatique en δGT est faible (5 à 10% de l'activité rénale). La δGT est une enzyme spécifique

de la bordure en brosse des cellules tubulaires rénales. Elle catalyse la libération d'un groupement L-gamma-glutamyl à partir de L-gamma-glutamyl-paranitroanilide.

L'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase est déterminée selon la méthode décrite par Beck et al (1977). Pour le dosage 50 μ l d'échantillon (urine, homogénat ou sérum) est incubé pendant 30 minutes à 25 °C en présence de tampon (Tris 1M, MgCl₂ 100 mM, PH=9), d'H₂O et de substrat 5 mM.

La réaction enzymatique est arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide acétique 1N et la densité optique est lue au spectrophotomètre à 405 nm.

III.5. Evaluation statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et écart-types. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par les médicaments à celles des groupes témoins d'une part, et d'autre part à celles traités par les flavonoïdes en utilisant le test t de student.

ns; différence non significative; *P< 0,05 ; **P< 0,01 ; ***P<0,001.

RESULTATS & INTERPRETATION

RESULTATS ET INTERPRETATION

I. Résultat de l'étude chimique des extraits

Au cours de notre travail, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires de la propolis. Pour cela nous avons utilisé trois techniques de purification: la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectroscopie de masse (CG/SM), et la chromatographie liquide à haute performance, ainsi que le dosage différentielle des flavonoïdes.

I.1. Les résultats de chromatographie sur couche mince.

Pour avoir les empreintes flavoniques de nos extraits et avoir une idée sur leurs composition chimiques. Ces derniers subissent une chromatographie analytique sur couche mince dans la phase mobile le chloroforme. Les spots obtenus dans le chromatogramme sont délimité sous lumière UV à 336 nm. Les valeurs des Rf ainsi que la fluorescence des spots figurent dans le tableau 5.

Tableau 5: Comportement chromatographique sur couche mince de l'extrait éthanolique de la propolis.

Rf	0.07	0.14	0.20	0.27	0.35	0.41	0.52	0.64	0.90
Fluorescence	Jaune foncé	Bleu vert	Jaune	Jaune verte	Jaune	Jaune verte	Violet	Jaune	Bleu

La CCM de l'extrait éthanolique de la propolis dans le système chloroforme a permis d'identifier 9 spots détectés sous la lampe UV à 254-336 nm. La fluorescence des spots était jaune, violette et bleu. Cette analyse nous a permis de révéler la présence de flavones et de flavonols, dans la propolis.

La fluorescence jaune et bleue des taches sur le chromatogramme de l'extrait de propolis, en faveur la structure flavonols, et la fluorescence violette en UV est probablement en faveur d'une structure flavones, chalcones, et flavanones.

Après développement, les plaques sont pulvérisées avec une solution éthanolique de $AlCl_3$ à 1% puis séchées. Le chromatogramme peut être observé à la lumière UV (336 nm) ou dans le visible. A 336 nm, on observe une fluorescence allant du bleu au brun. Dans le visible, on observe une coloration jaune. Cette coloration est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène du carbonyle en position 4 et OH en 5 ou en 3 ou les deux OH en position ortho des flavonoïdes ce qui indique les aglycone flavoniques. Le dosage des flavonoides montre que la teneur des flavonoides est d'environ 362mg/g de propolis.

I.2. Résultats de l'HPLC de l'EEP

Les différents composés phénoliques ont été identifiés par leurs spectres UV. Les spectres UV de ces composés ont été déterminés par un système HPLC possédant un détecteur UV à barrettes de diodes (DAD-UV). L'examen HPLC nous a permis de dégager les principaux groupes de composés de la propolis. Cependant, en raison du manque de disponibilité des composés authentiques ou de références, la caractérisation et la quantification des flavonoïdes restent incomplètes, et l'examen des spectres UV et de l'HPLC de notre extrait nous permet alors d'interpréter de façon générale les spectres de la propolis:

- Les chromatogrammes de l' HPLC des fractions phénoliques de Propolis indiquent la présence de 3 classes des polyphénols: Flavonoïdes (absorption maximale à 280 et à 370nm); Chalcones: dihydrochalcone ($I_{max} = 280-290$ nm) et les acides phénoliques: dérivés d'acides hydroxycinnamiques ($I_{max} = 225$ nm).

- De ces 3 classes, 17 composés différents ont été identifiés en utilisant des temps de rétention des spectres UV: 6 flavonoïdes (Rt: 47.893min, 48.693min, 49.733min, 52.827min, 54.133min, 60.64min); 6 Chalcones (Rt : 47.333min, 57.867min, 58.72min, 58.907min, 73.44min, 74.747min) et 4 acides phénoliques (Rt : 25.2min, 39.68min, 54.827min, 55.467min). Il y a un composé mineur présent dans l'EEP qui n'a pu être identifié. Ce composé a un temps de rétention de 59.68min dans les spectres UV (voir annexe).

1.3. Résultats de la chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectroscopie de masse (CG/SM)

Les premiers résultats obtenus après l'analyse en CG/SM permettent de déterminer le nombre et la nature des composés (flavonoïdes essentiellement) trouvés dans la propolis et les autres phases. Ces produits ont été identifiés en comparaison avec la bibliothèque disponible.

▪ Résultats de l'extrait éthanolique de propolis

Pour essayer de comprendre la composition chimique de l'extrait éthanolique de propolis, ce dernier soumis en CG/SM. Les résultats de l'analyse CG sont illustrés dans la figure 20.

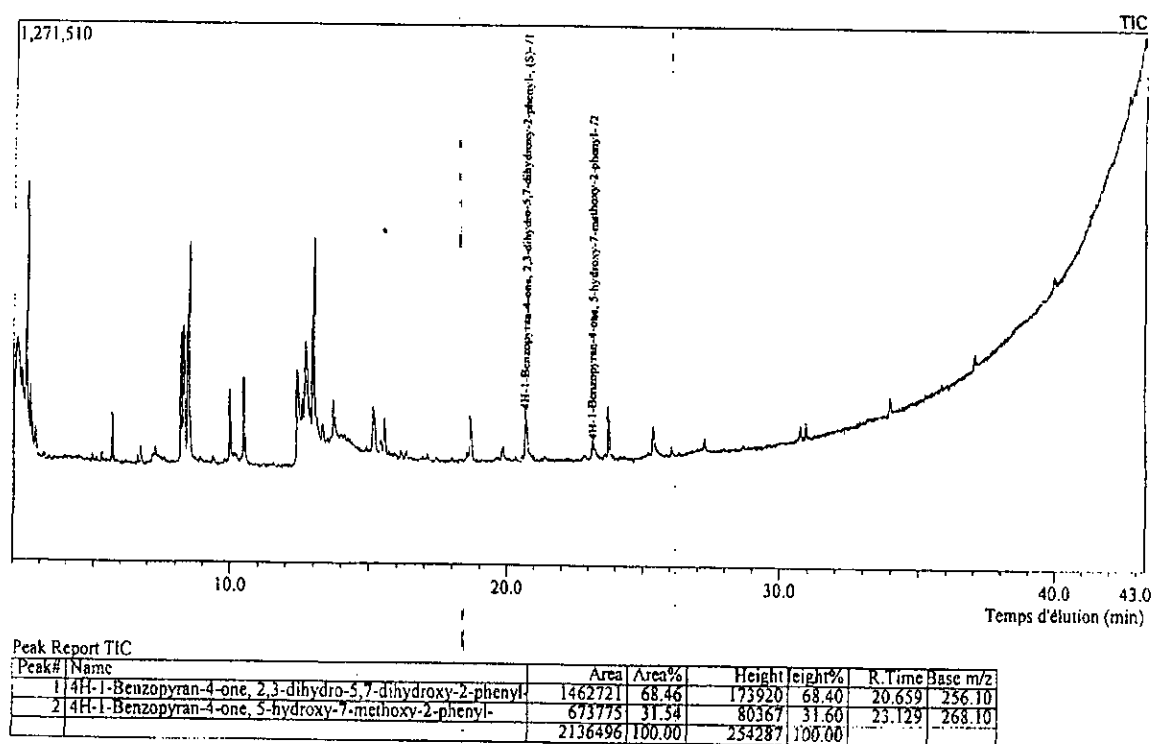


Figure 20: Chromatogramme de la propolis.

Le chromatogramme montre deux signaux principaux à $T_r = 20.659$ et $T_r = 23.129$ min, ces signaux correspondent respectivement aux 4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-, (S) ou (pinocembrine un flavanone) et le 4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl ou (tecto-chrysin un flavone), avec un pourcentage de 68.40% pour le pinocembrine et 31.60 % pour le tecto-chrysin.

Les deux produits séparés par CG sont analysés ensuite par la spectrométrie de masse. Les spectres de masse obtenus par impacte électronique (EI) sont illustrés dans la figure (21) et (22) respectivement.

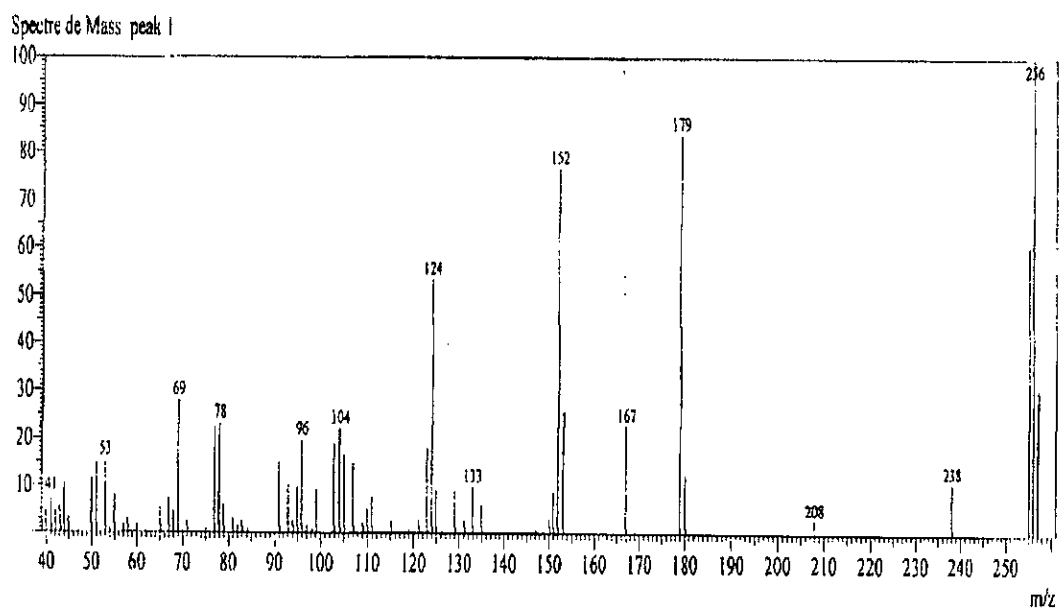


Figure 21: Spectre de masse de pinocembrine

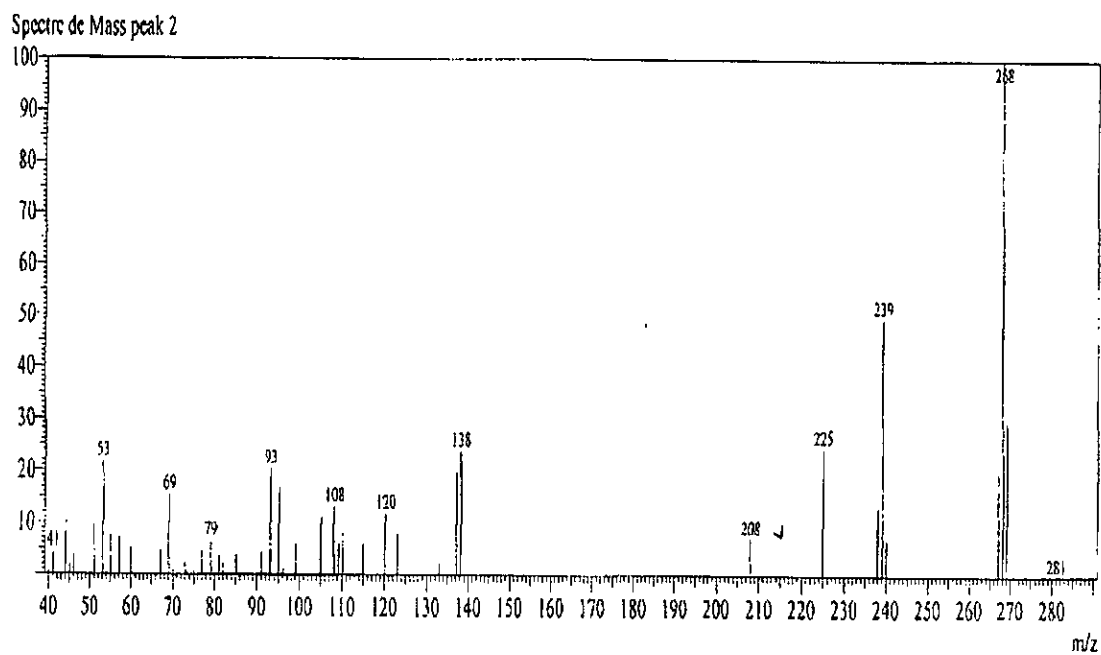


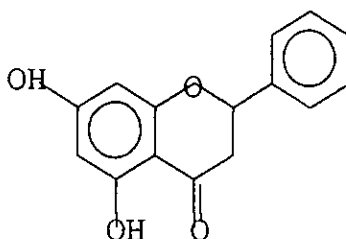
Figure 22: Spectre de masse de tectochrysin.

L'interprétation des spectres de masse d'un flavonoïde passe par l'analyse des ions fragments des cycles A, B et C.

Prenons l'exemple du composé 1 (figure 21), le spectre de masse en EI de ce composé présente un ion moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 256$ (100%) correspondant à un poids moléculaire de pinocembrine. Un pic de l'ion moléculaire $m/z = 257$ correspondant à la fixation d'un proton par la molécule, soit $[M+H]^+$, un autre pic observé à $m/z = 255$ (perte d'un proton par la molécule). Un fragment à $m/z = 179$ $[M-\Phi]^+$ compatible avec la perte d'un groupe phényle (C_6H_5). La fragmentation donne elle aussi des ions caractéristique de pinocembrine:

- ✓ L'ion à $m/z = 152$ caractérise un noyau A dihydroxylé
- ✓ L'ion à $m/z = 153$ (pic A+1)
- ✓ L'ion à $m/z = 131$ caractérise un noyau B non substitué
- ✓ L'ion $m/z = 124 = [A-28]$, résultant de la perte d'un CO par le noyau A

L'ensemble de ces fragments montrent que le composé 1 correspond effectivement au 4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-, (S) encore appelé pinocembrine ou (galangine flavanone).



Pinocembrine (galangine flavanone)

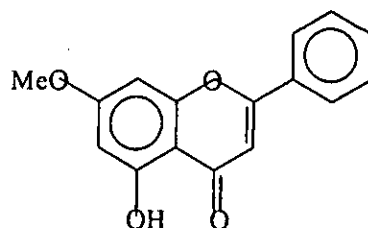
Formule brute ($C_{15}H_{12}O_4$)

Pour le composé 2 (figure 22), le spectre de masse en EI de ce composé présente un ion moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 268$ (100%) correspondant à la formule brute de tectochryisine ($C_{16}H_{12}O_4$) un flavone monohydroxylée monométhoxylée. Un pic à $m/z = 269$ $[M+H]^+$ correspondant à la fixation d'un proton par la molécule, un fragment à $m/z = 105$ caractérise un noyau B non substitué et un fragment à $m/z = 138$ compatible à la perte d'une molécule de monoxyde de carbone par le noyau A, soit $[A-28]$. D'autres fragments ont été relevés:

- ✓ L'ion à $m/z = 240 = [M-28]$, correspondant à la perte d'un ($C=O$) par l'ion moléculaire.

- ✓ L'ion à $m/z = 239 = [M- 29]$, correspondant à la perte d'un proton et d'un groupe (C=O) à partir de l'ion moléculaire ($M = 268$), soit $[M-H-CO]$.
- ✓ L'ion à $m/z = 225$, correspondant à la perte du groupement méthyle à partir de l'ion à $m/z = 240$
- ✓ L'ion à $m/z = 238 [MH-31]$, correspondant à la perte du groupement méthoxy (OCH₃) à partir de l'ion à $m/z = 269$
- ✓ L'ion à $m/z = 123$, résultant de la perte d'un (C=O) et d'un groupe méthyle (CH₃) à partir du noyau A, soit $[A- 43]$
- ✓ L'ion $m/z = 77$, correspondant à la perte d'un (C=O) à partir du noyau B, soit $[B-28]$

Cette fragmentation est caractéristique d'un 4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl- encore appelé tectochrysin.



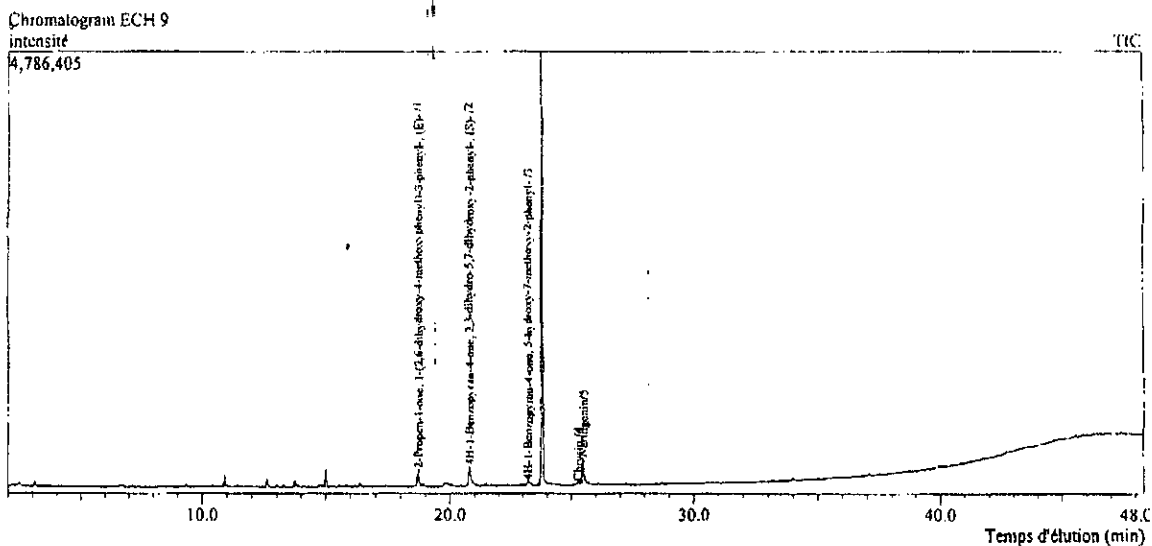
Tectochrysin

Formule brute (C₁₆H₁₂O₄)

▪ Résultats de la phase éther diéthylique et la phase acétate d'éthyle.

La composition chimique de deux phases (éther diéthylique et acétate d'éthyle) a été confirmée par chromatographie en phase gazeuse couplée avec la spectrométrie de masse (CG-SM) en utilisant l'impact électronique (IE). Le chromatogramme de la phase éther (figure 23) révèle cinq pics élués à 18.713 min, 20.779 min, 23.209 min, 25.277 min et 25.484 min correspondant respectivement aux, pinostrobin chalcone, pinocembrine, tectochrysin, chrysin, et naringénine.

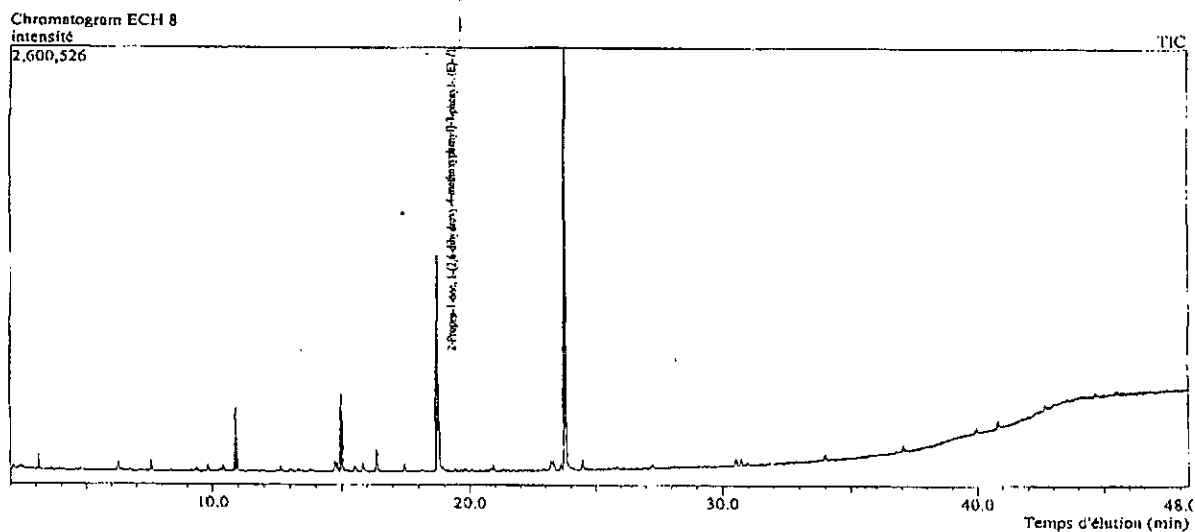
Par contre le chromatogramme de la phase acétate d'éthyle indique la présence d'un seul pic élué à 18.722 min correspondant à 2-propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-méthoxyphényl)-3-phényl-, (E) ou pinostrobin chalcone (figure 24).



Peak Report TIC

Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name	Base m/z
1	18.713	18.625	18.858	912667	19.45	191454	24.03	2-Propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphényl)- (E)-1	270.05
2	20.779	20.675	21.158	1452385	30.95	216675	27.20	4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phényl- (E)-2	256.00
3	23.209	23.150	23.392	333751	7.11	49665	6.23	4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-7-methoxy-2-phényl- (E)-2	268.00
4	25.277	25.192	25.392	324810	6.92	40239	5.05	Chrysin (E)-2	253.95
5	25.484	25.392	25.658	1669268	35.57	298650	37.49	Naringenin (E)-2	153.00
				4693081	100.00	796683	100.00		

Figure 23: Chromatogramme de la phase éther diéthylique.



Peak Report TIC

Peak#	R. Time	I. Time	F. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name	Base m/z
1	18.722	18.575	21.675	4209730	100.00	1287585	100.00	2-Propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphényl)- (E)-1	270.00
				4209730	100.00	1287585	100.00		

Figure 24: Chromatogramme correspondant à la phase acétate d'éthyle.

Les spectres de masse de ces flavonoïdes sont présentés ci-dessous:

Spectre de masse

Peak#:1 R.Time:18.7(Scan#:2006)
 MassPeaks:70
 RawMode:Averaged 18.7-18.7(2005-2007)
 BG Mode:Calc. from Peak

intensité

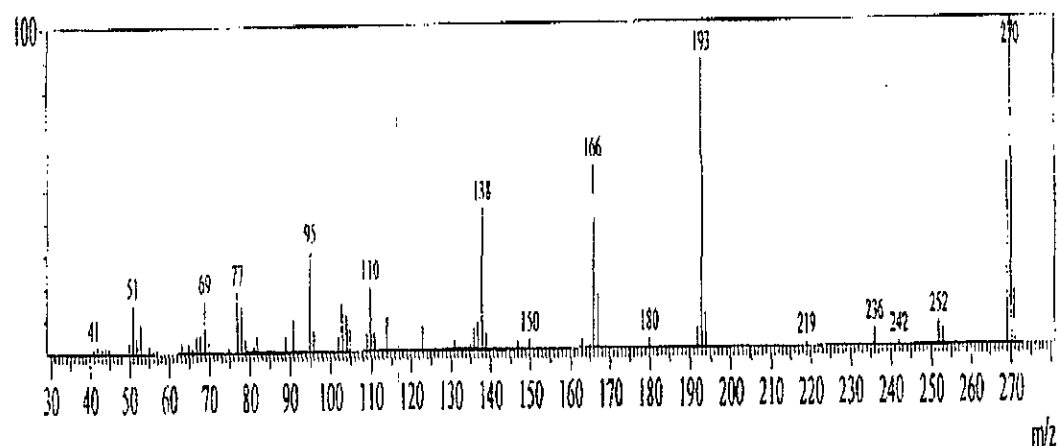


Figure 25: Spectre de masse de pinostrobin chalcone (phase éther diéthylique).

Spectre de masse

Peak#:1 R.Time:18.7(Scan#:2008)
 MassPeaks:129
 RawMode:Averaged 18.7-18.7(2007-2009)
 BG Mode:Calc. from Peak

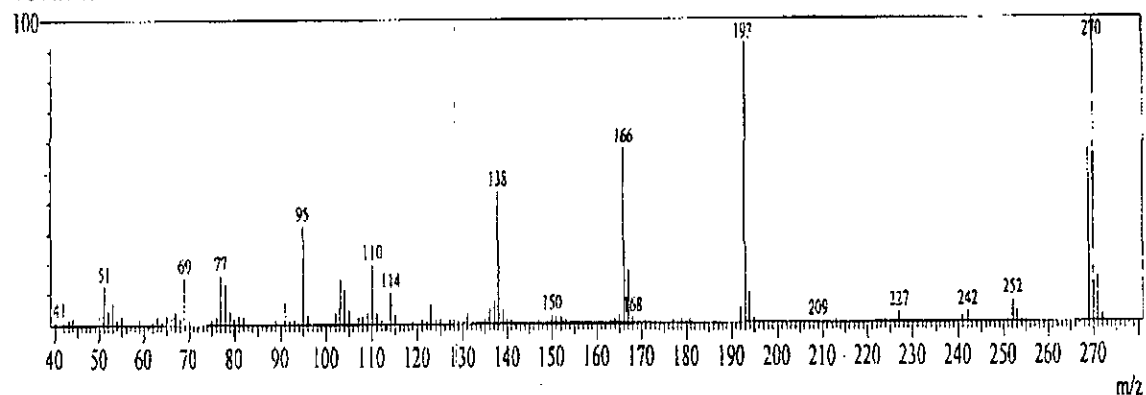


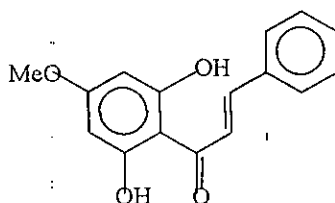
Figure 26: Spectre de masse de pinostrobin chalcone (phase acétate d'éthyle).

Le spectre de masse réalisé en EI de ce composé dans les deux phases donne un pic moléculaire à $m/z = 270$ correspondant à la masse $[M]^+$ et un pic moléculaire à $m/z = 271$ $[M+H]^+$ qui correspond à la fixation d'un proton par la molécule. Un autre pic à $m/z = 193$ $[M-\Phi]^+$ compatible avec la perte d'un groupe phényle par la molécule. Ces pic moléculaire correspondent à une formule brute de $C_{16}H_{14}O_4$ et un poids moléculaire de 270.

D'autres ions caractéristiques sont aussi détectés:

- ✓ L'ion à $m/z = 252 = [M-18]^+$, correspondant à la perte d'une molécule d'eau par la molécule.
- ✓ L'ion à $m/z = 242 = [M-28]^+$, correspondant à la perte d'un monoxyde de carbone (C=O) par la molécule.
- ✓ L'ion à $m/z = 77 = [M-193]^+$, s'explique par la perte du groupement ($C_{10}H_9O_4$).
- ✓ L'ion à $m/z = 166$, caractérise un noyau A monohydroxylée monométhoxylée
- ✓ L'ion à $m/z = 102$, caractérise un noyau B non substitué
- ✓ L'ion à $m/z = 138$, correspondant à la perte d'un (C=O) par le noyau A
- ✓ L'ion à $m/z = 51$, correspondant à la perte d'un groupe (C_2H_2) par l'ion à $m/z = 77$

Cette fragmentation est caractéristique d'un 2-propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl-, (E) encor appelé pinostrobine chalcone.



Pinostrobine chalcone

Formule brute ($C_{16}H_{14}O_4$)

Peak#:2 R.Time:20.8(Scan#:2254)
 MassPeaks:65
 RawMode:Averaged 20.8-20.8(2253-2255)
 BG Mode:Calc. from Peak

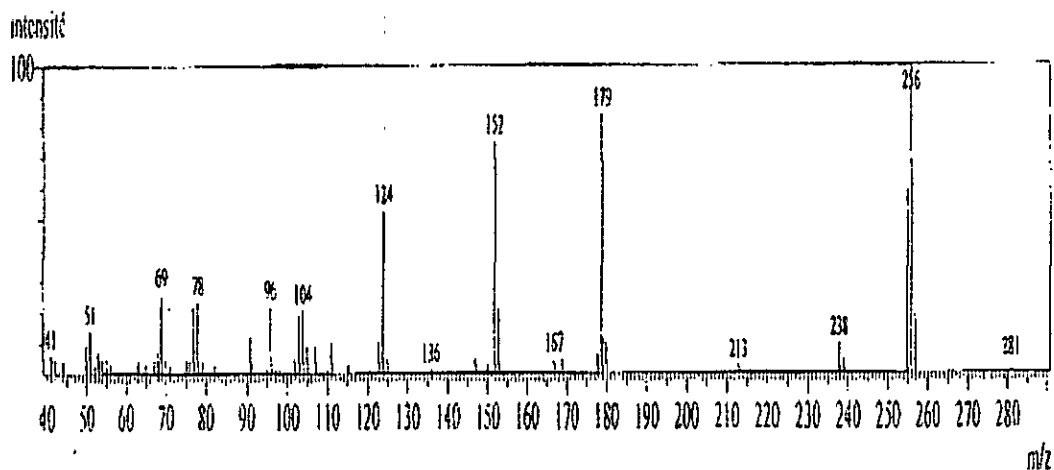


Figure 27: Spectre de masse de pinocembrine.

Peak#:3 R.Time:23.2(Scan#:2546)
 MassPeaks:39
 RawMode:Averaged 23.2-23.2(2545-2547)
 BG Mode:Calc. from Peak

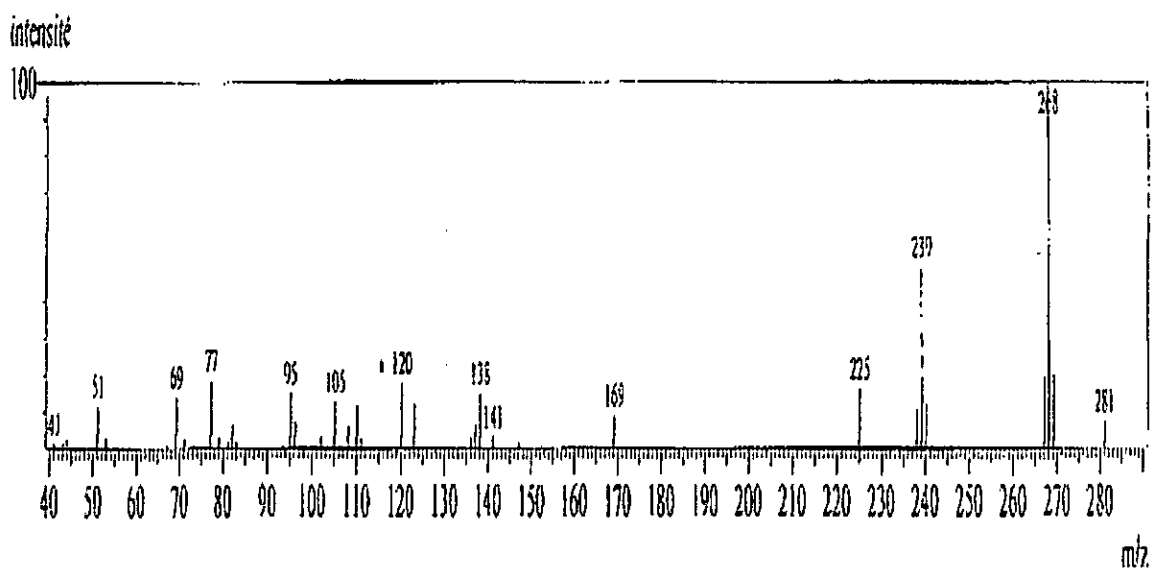


Figure 28: Spectre de masse de tectochrysin.

Les spectres de masse réalisés en impact électronique pour les deux composés pinocembrine (figure 27) et tectochrysin (figure 28), présentent des fragmentations identiques à celui obtenu pour l'extrait brut de propolis figure (21) et (22).

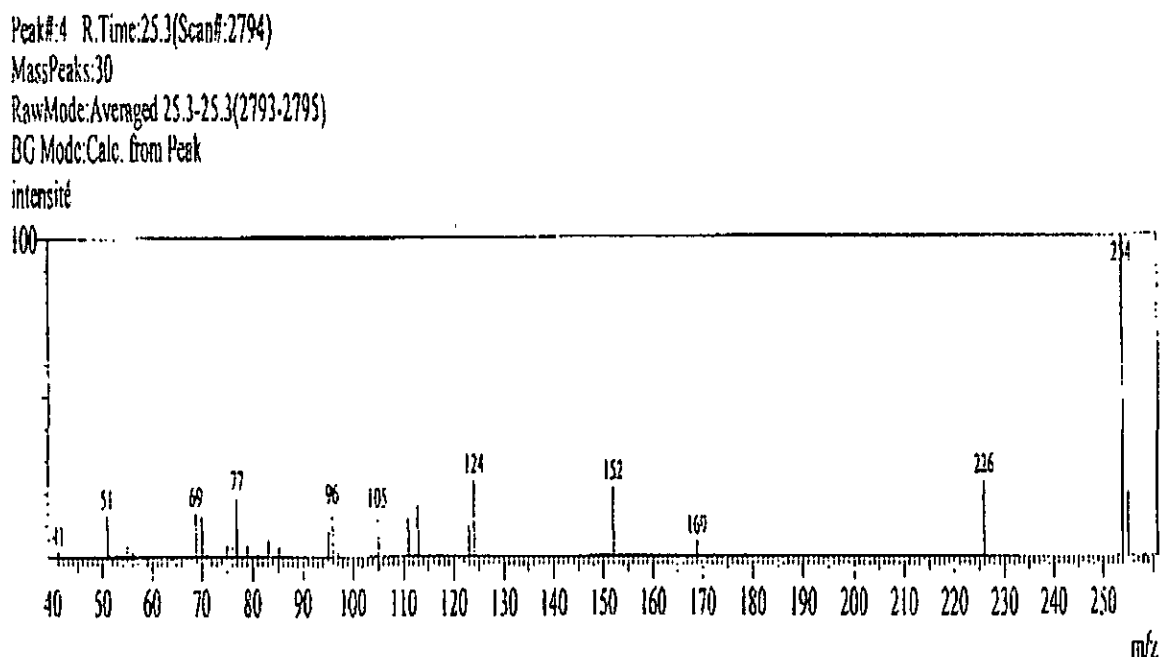
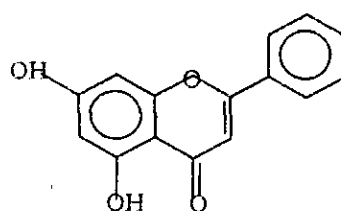


Figure 29: Spectre de masse de chrysin.

Le spectre de masse réalisé en EI de chrysin montre un pic moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 254$ (100%) correspondant à une formule brute de $(C_{15}H_{10}O_4)$ chrysin, un flavone dihydroxylé.

- ✓ Un ion à $m/z = 226 = [M-28]^+$, correspondant à la perte d'un monoxyde de carbone (CO).
- ✓ Un ion à $m/z = 77$, résultant de la perte du groupement $(C_9H_5O_4)$
- ✓ Un ion à $m/z = 105$, caractérise un noyau B non substitué.
- ✓ Un ion à $m/z = 152$, caractérise un noyau A dihydroxylé.
- ✓ Un ion à $m/z = 124 [A-28]$, correspondant à la perte d'un groupe (CO) par le noyau A
- ✓ Un ion à $m/z = 96 [A-56]$, résultant de la perte de deux groupe (CO) par le noyau A
- ✓ Un ion à $m/z = 51$, correspondant à la perte du groupement (C_2H_2) par l'ion à $m/z = 77$

Cette fragmentation est caractéristique d'un chrysin.



Chrysin

Formule brute ($C_{15}H_{10}O_4$)

Peak#:5 R.Time:25.5(Scan#:2819)

MassPeaks:78

RawMode:Averaged 25.5-25.5(2818-2820)

BG Mode:Calc. from Peak

intensité

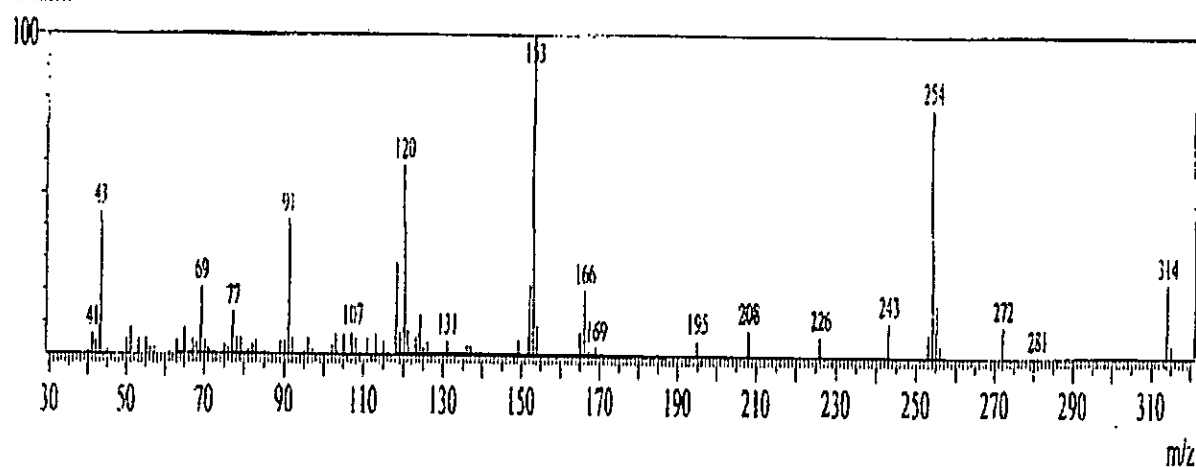
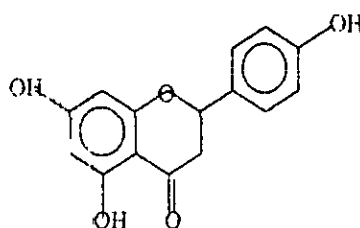


Figure 30: Spectre de masse de la naringénine.

Le spectre de masse réalisé en EI de naringénine comporte les ions caractéristiques majeurs suivants:

- ✓ Un ion à $m/z = 272 = [M]^+$, correspondant à une formule brute de $C_{15}H_{12}O_5$
- ✓ Un ion à $m/z = 152$, caractérise un noyau A dihydroxylé
- ✓ Un ion à $m/z = 153$ (100%) pic de base (pic A+1)
- ✓ Un ion à $m/z = 120$, caractérise un noyau B monohydroxylé

Cette fragmentation est caractéristique d'un naringénine.



Naringenin

Formule brute (C₁₅H₁₂O₅)

La fragmentation des flavonoïdes (flavones, isoflavones, flavanones, et flavonols) se fait selon la réaction rétro de Diels-Alder (RDA) (Ma et al, 1997).

Prenant l'exemple d'un flavone la chrysin (figure 30), la transposition rétro Diels-Alder suivi d'une rupture au niveau de l'hétérocycle, donne naissance à trois fragments principaux nommés A, B et C.

Le pic A correspond au noyau A et le pic B et C correspond au noyau B.

Lorsque le noyau A porte un ou plusieurs OH, on voit apparaître un autre pic appelé pic D correspondant au pic A+1. pour le pic B le C3 est retenu sur le noyau B alors que pour le pic C, c'est l'oxygène de l'hétérocycle qui est retenu sur le noyau B en donnant m/z = 105 pour le pic C.

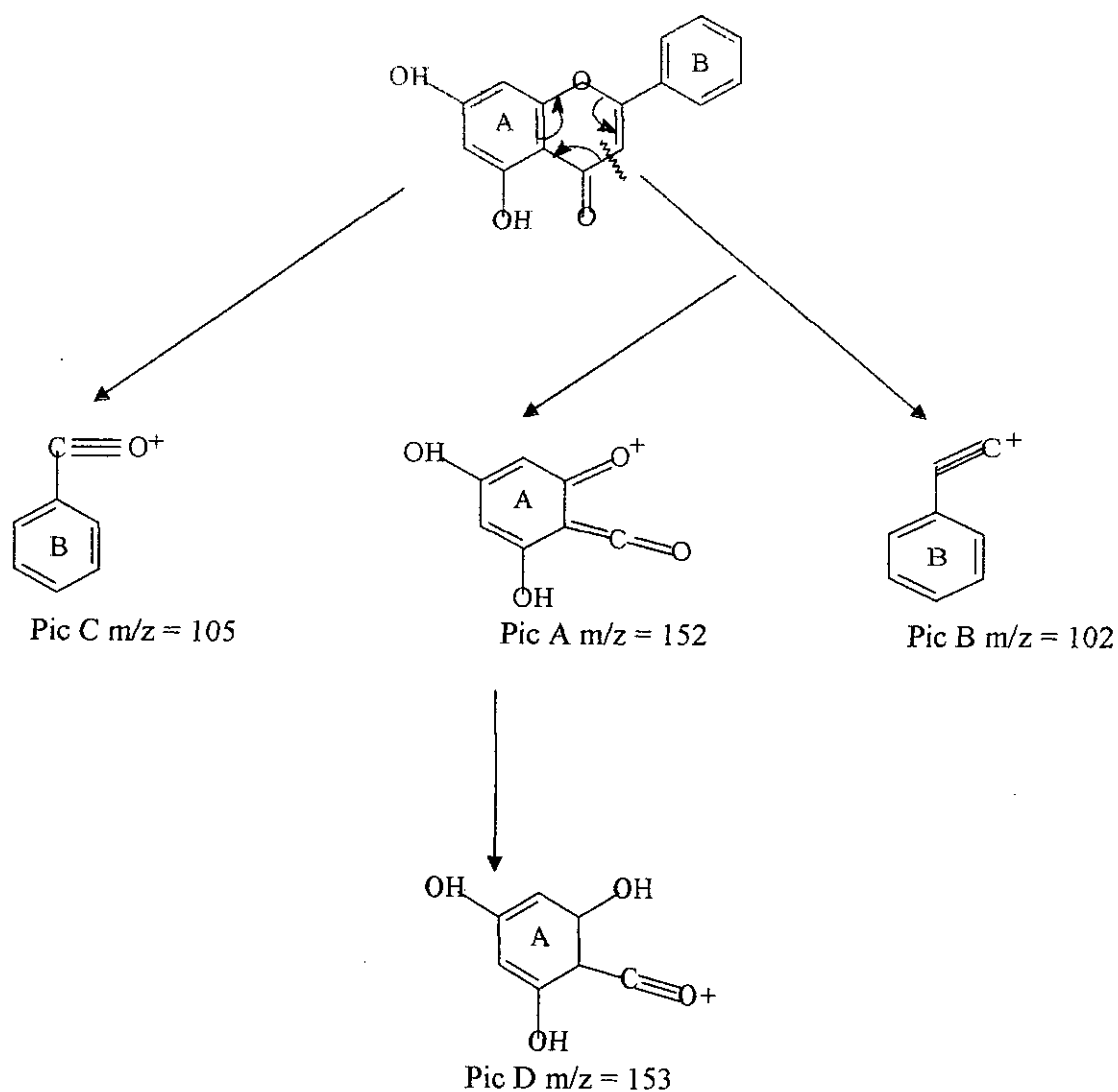


Figure 31: Fragmentation en spectrométrie de masse d'un flavones, la chrysin.

La fragmentation qui apparaît sur le spectre de masse (EI) de la chrysin est en bon accord avec cette structure. On observe en effet les fragments à $m/z = 105$ et $m/z = 152$ les deux fragment caractéristique au noyau B et A respectivement, et qui sont issus des fragmentation illustrés dans la figure (30).

II. Evaluation de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis

Pour évaluer le pouvoir antioxydant de l'extrait éthanolique de la propolis, nous avons mesuré in vitro l'effet scavenger de la propolis contre le DPPH° (Diphényl-2-picrylhydrazyl), radical libre stable.

Le tableau 6 et la figure 32 présentent les résultats de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis et de la quercétine flavonoïdes de référence à différentes concentrations massiques vis-à-vis de ce radical.

On constate que l'extrait éthanolique de la propolis possède un pouvoir scavenger des radicaux libres très puissant. Il est actif à des concentrations allant jusqu'à 0.12 mg/ml. La propolis a un effet scavenger maximal à 1 mg/ml, avec un pourcentage de réduction de 88.30% contre 75.51% avec la quercétine le flavonoïdes de référence. A des autres concentrations le pouvoir antioxydant de la propolis est comparable a celle de la quercétine. A 0.25 mg/ml la propolis possède un pourcentage de réduction de 39.18 contre 36.97% avec la quercétine. Cette activité est peu élevée par rapport à celle de la quercétine l'antioxydant de référence à différentes concentrations.

Tableau 6: Effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis et de la quercétine à différentes concentrations vis-à-vis du DPPH°

		Concentration en (mg/ml)			
		1 mg/ml	0.5 mg/ml	0.25 mg/ml	0.12 mg/ml
% de réduction du DPPH°	Extrait éthanolique de la propolis	88.30%	45.33%	39.18%	28.24%
	Quercétine	75.51%	48.97%	36.97%	24.82%

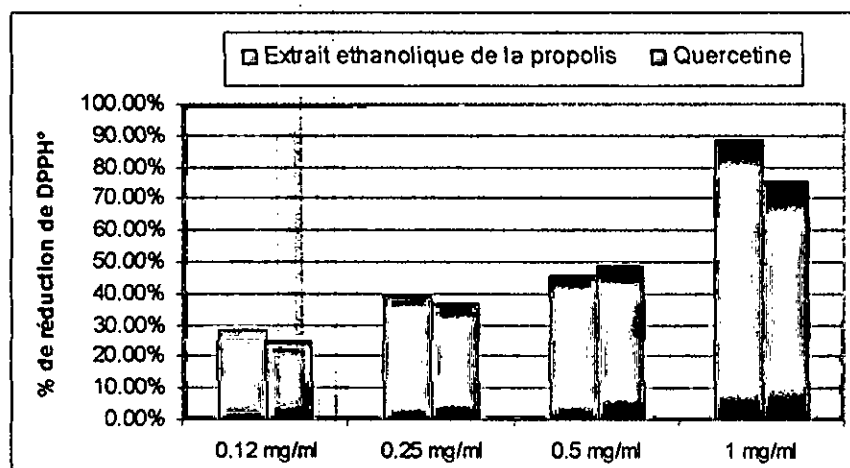


Figure 32: Effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis et de la quercétine à différentes concentrations vis-à-vis du DPPH°

III. Etude de l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis administré à 100 mg/kg contre le stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine 10 mg/kg

III.1. Evaluation des concentrations en malondialdéhyde (MDA) du tissu rénal

La peroxydation lipidique est l'un des plus anciens effets connus des radicaux libre. Le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique est le malondialdéhyde (MDA), notamment pour la simplicité de la méthode de dosage.

Les concentrations en MDA ont été déterminées sur l'homogénat de rein, et les variations des taux de malondialdéhyde du tissu rénale après traitement par la doxorubicine seule (10 mg/kg) ou en association avec l'extrait éthanolique de la propolis sont rapportés dans le tableau 7 et la figure 33.

Nous constatons chez les rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg seule, une augmentation hautement significative des taux du MDA en fonction du temps par rapport au témoin. Cette concentration atteint (75.4 ± 0.96 nmoles/g de tissu contre 30.20 ± 8.53 nmoles/g de tissu chez les témoins au délai de 7 jours).

Le prétraitement par l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg pendant 7 jours suivie d'une administration de la doxorubicine 10 mg/kg entraîne une diminution hautement

significative des taux du MDA dès le premier jour de traitement qui atteint $(25.30 \pm 1.13$ nmoles/g de tissu contre 58.82 ± 2.11 chez les rats traités par le médicament seul.

L'extrait de la propolis semble apporter une protection contre les radicaux libres formés aux cours de la métabolisation de la doxorubicine. Il empêche la liaison de ces métabolites réactifs avec les lipides membranaires de la cellule, ce qui traduit par la diminution des taux de MDA tissulaire.

Tableau 7: Variations des taux du MDA du tissu rénale après l'administration d'une dose unique de la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg

Les groupes	Concentration du MDA (n moles/g de tissus)		
	24 heures	7 jours	15 jours
Témoin	30.23 ± 9.72	30.20 ± 8.53	31.99 ± 5.59
Doxorubicine 10 mg/kg	58.82 ± 2.11 **	75.4 ± 0.96 ***	55.29 ± 0.26 ***
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg + Doxorubicine 10mg/kg	25.30 ± 1.13 ***	28.96 ± 1.46 ***	26.86 ± 0.46 ***
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg	13.32 ± 2.7 ns	20.95 ± 5.49 ns	16.01 ± 2.73 *

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) , (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

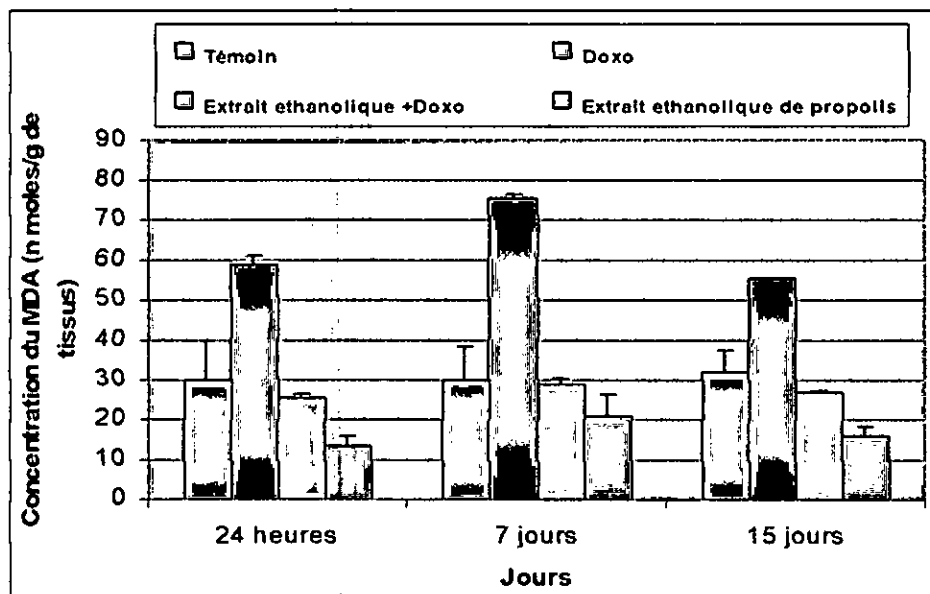


Figure 33 : Variations des taux du MDA du tissu rénale après l'administration d'une dose unique de la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg

III.2. Evaluation des taux de glutathion (GSH) du tissu rénal

Le glutathion joue un rôle important de détoxification par la formation de conjugués avec les métabolites réactif. Il protège les membranes cellulaires contre l'oxydation en maintenant l'essentiel des groupements thiols.

Le dosage de glutathion dans le tissu rénal rapporte les informations nécessaires à une meilleure compréhension du rôle joué par la molécule mère ou ces métabolites. L'intérêt de ce dosage permet de mieux connaître la nature des métabolites toxiques, et l'importance de ce système dans la détoxification.

Nous avons dosé le glutathion rénal chez les rats traités par la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis (flavonoïdes). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 8 et la figure 34.

Les rats traités par la doxorubicine présentent une diminution de la concentration rénale du GSH. Cette diminution est très significatives ($p < 0.01$) au 15^{ème} jours du traitement (1.55 ± 0.077 mM/g de tissu contre 2.97 ± 0.32 mM/ g de tissu chez les témoin).

Par contre les rats prétraités par l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg présentent une augmentation très significative des taux du GSH par rapport à ceux recevant le médicament seul, atteint (3.47 ± 0.07 mM contre 1.55 ± 0.007 mM) au délai de 15 jours. A 24 heures on a enregistré une valeur du GSH comparable à celle du témoin.

Les taux du glutathion des rats recevant la doxorubicine seule reste diminuée par rapport à celui des témoins (1.55 ± 0.077 mM). Cependant, il se trouve augmenté dans le groupe d'animaux prétraités par les flavonoïdes sous formes d'extrait éthanolique de la propolis (3.47 ± 0.07 mmoles/g de tissu) au délai de 15 jours. Ceci nous laisse penser à un recouvrement des capacités de la synthèse du GSH après l'élimination rénal de la doxorubicine.

Tableau 8: Variations des taux de GSH du tissu rénale après l'administration d'une dose unique de la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg

Les groupes	Concentration du glutathion (m moles/g de tissus)		
	24 heures	7 jours	15 jours
Témoin	2.67 ± 0.83	2.89 ± 0.24	2.97 ± 0.32
Doxorubicine 10 mg/kg	2.61 ± 0.014 ns	2.11 ± 0.71 ns	1.55 ± 0.07 **
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg + Doxorubicine 10 mg/kg	2.41 ± 0.01 **	3.14 ± 0.17 **	3.47 ± 0.07 ***
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg	4.42 ± 0.014 **	4.36 ± 0.24 **	4.23 ± 1.13 *

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) , (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

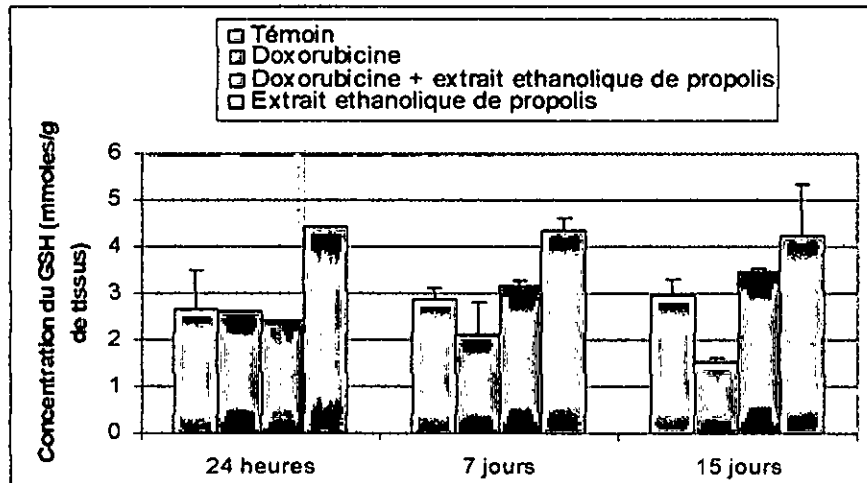


Figure 34: Variations des taux de GSH du tissu rénale après l'administration d'une dose unique de la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg

III.3. Evaluation des taux de créatinine plasmatique

Les concentrations de la créatinine sérique des rats traités par la doxorubicine à 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis administrée pendant 7 jours à 100 mg/kg sont rassemblées dans le tableau 9 et la figure 35.

Chez les rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg seule, on note une augmentation importante de la créatinine plasmatique. 24 heures après l'injection du médicament la concentration de la créatinine atteint ($53.69 \pm 15.15 \mu\text{mol/l}$ chez les rats traités contre $40.14 \pm 8.14 \mu\text{mol/l}$ chez les témoins et augmente progressivement avec le temps. Cette augmentation est maximale au délai de 7 jours ($p < 0.001$).

Cependant, l'association de la doxorubicine aux flavonoïdes (extrait éthanolique de la propolis) montre une diminution significative des taux sérique de la créatinine atteint ($46.8 \pm 10.4 \mu\text{mol/l}$ contre 63.72 ± 7.21 chez les rats traités par la doxorubicine seule) au délai de 7 jours.

Tableau 9: Variations des taux de la créatinine plasmatique au cours d'un traitement par la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg

Les groupes	Concentration de la créatinine plasmatique ($\mu\text{moles/l}$)		
	24 heures	7 jours	15 jours
Témoin	40.14 \pm 8.14	45.5 \pm 5.01	40.30 \pm 7.53
Doxorubicine 10 mg/kg	53.69 \pm 15.15 **	63.72 \pm 7.21 ***	/
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg + Doxorubicine 10 mg/kg	45.26 \pm 10.61 *	46.8 \pm 10.4 *	44.71 \pm 5.96
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg	33.99 \pm 3.20 ns	35.57 \pm 9.89 ns	33.61 \pm 4.17 ns

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

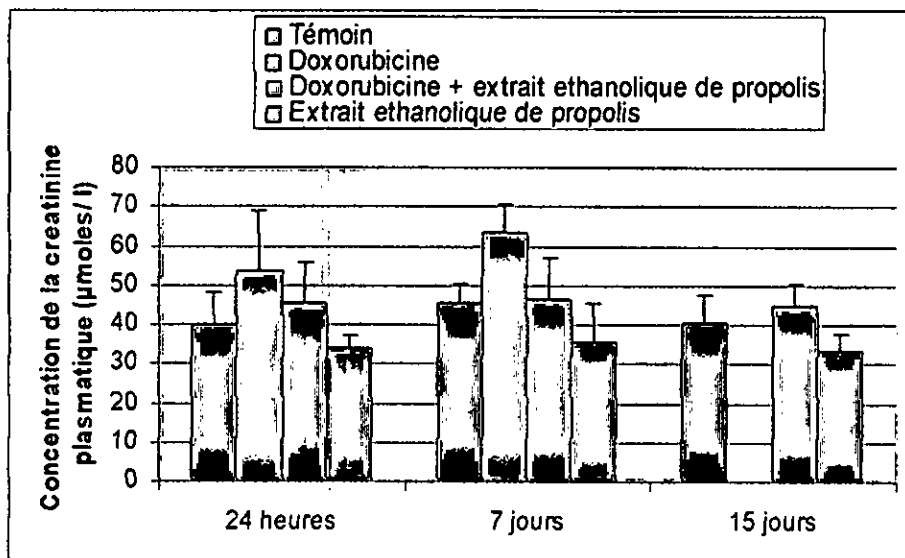


Figure 35 : Variations des taux de la créatinine plasmatique au cours d'un traitement par la doxorubicine (10 mg/kg) seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg

III.4. Evaluation enzymatique

III.4.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl transpeptidase (γGT) urinaire

Le tableau 10 et la figure 36 regroupent les concentrations de la gamma- glutamyl transpeptidase des rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée aux flavonoïdes de propolis administrés à 100 mg/kg.

Le traitement des rats par la doxorubicine 10 mg/kg montre une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique urinaire entre le premier jour et le 7^{ème} jour de traitement. Cette activité reste augmenté par rapport à celle des témoins atteint (351.67 ± 7.32 mU chez les rats traités contre 127.38 ± 2.89 mU chez les témoins) au délai de 7 jours. Une modification très importante de l'activité enzymatique urinaire enregistré chez les rats prétraités par l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg pendant 7 jours suivie d'une administration d'une dose unique de la doxorubicine 10 mg/kg. Cette activité atteint (149.24 ± 3.47 mU/24h contre 351.67 ± 7.32 mU/24h chez les traités au délai de 7 jours.

Tableau 10 : Variations de l'activité enzymatique de la γGT urinaire après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg

Les groupes	γGT urinaire (mU/24h)		
	24 heures	7 jours	15 jours
Témoin	153.16 ± 3.12	127.38 ± 2.89	153.16 ± 3.12
Doxorubicine 10 mg/kg	324.5 ± 38.68 ***	351.67 ± 7.32 ***	/
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg + Doxorubicine 10 mg/kg	275.86 ± 29.86 **	149.24 ± 3.47 ***	230.76 ± 9.22
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg	247.67 ± 13.48 ***	120.45 ± 5.36 ns	156.97 ± 0.21 ns

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) , (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

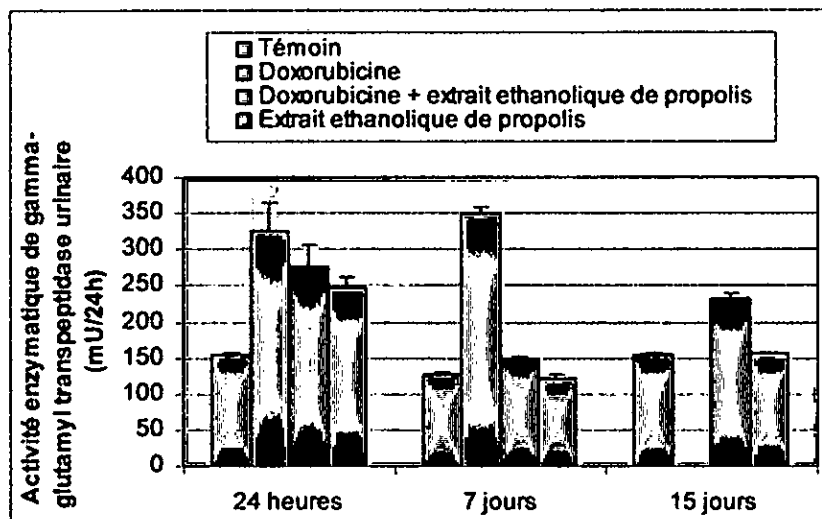


Figure 36 : Variations de l'activité enzymatique de la γ GT urinaire après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à 100 mg/kg

III.4.2. Evaluation de l'activité enzymatique de gamma- glutamyl transpeptidase (γ GT) plasmatique

Les concentrations de la gamma-glutamyl transpeptidase plasmatique des rats traités par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée aux flavonoïdes de propolis administrés à 100 mg/kg sont regroupées dans le tableau 11 et la figure 37.

Nous constatons une diminution hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique plasmatique dès le premier jour de traitement et qui se maintient jusqu'au 7^{ème} jour chez les rats prétraités par les flavonoïdes à 100 mg/kg donnés sous forme d'extrait de propolis pendant 7 jours et recevant également une dose unique de la doxorubicine. Cette activité atteint (3.55 ± 0.04 mU/24h) contre (7.29 ± 0.43 mU/24h) chez les traités par la doxorubicine seul au délais de 7 jours. Par contre les rats traités par la doxorubicine seule montrent une augmentation hautement significative en fonction du temps de l'activité enzymatique du gamma- glutamyl transpeptidase plasmatique par rapport à celle des témoins atteint (7.29 ± 0.43 mU/24h contre 3.53 ± 0.93 mU/24h).

Tableau 11 : Variations de l'activité enzymatique de la γ GT plasmatique après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à la dose de 100 mg/kg

Les groupes	γ GT plasmatique (mU/24h)		
	24 heures	7 jours	15 jours
Témoin	4.09 ± 0.42	3.53 ± 0.93	3.47 ± 0.51
Doxorubicine 10 mg/kg	5.22 ± 0.48 **	7.29 ± 0.43 ***	/
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg + Doxorubicine 10 mg/kg	3.68 ± 0.53 ***	3.55 ± 0.04 ***	3.25 ± 0.007
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg	4.58 ± 1.18 ns	5.40 ± 0.53 ns	4.57 ± 1.74 ns

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) , (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

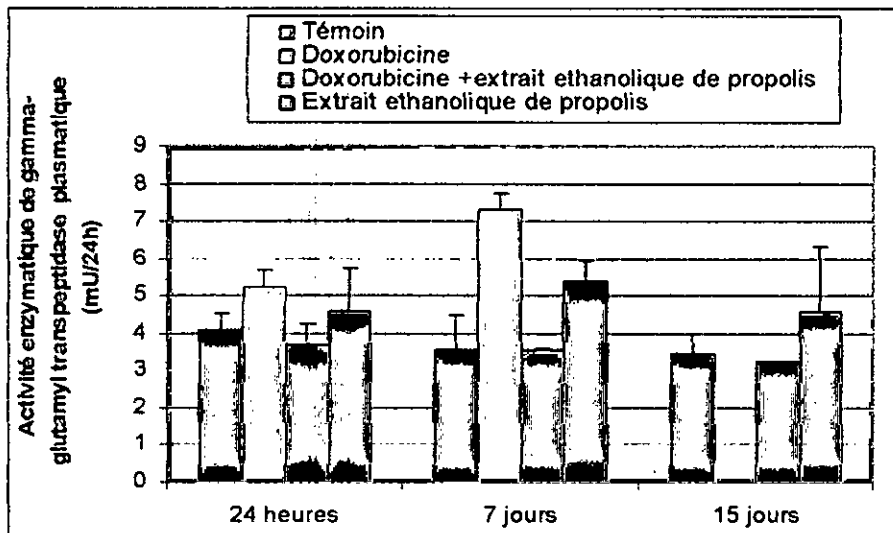


Figure 37 : Variations de l'activité enzymatique de la γ GT plasmatique après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à la dose de 100 mg/kg

III.4.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la gamma- glutamyl transpeptidase (γGT) tissulaire

Le tableau 12 et la figure 38 regroupent les résultats du traitement par la doxorubicine seule (10 mg/kg) ou en association avec l'extrait éthanolique de la propolis (100 mg/kg), sur l'activité enzymatique de la (γGT) tissulaire.

Administrée aux rats à dose 10 mg/kg, la doxorubicine entraîne une nette diminution de l'activité enzymatique de gamma-glutamyl transpeptidase tissulaire dès le premier jours du traitement, et qui se maintient jusqu'au 7^{ème} jours. Cette activité atteint (15.29 ± 0.41 mU/g de tissu contre 20.24 ± 0.84 mU/g de tissu chez les témoins).

Le prétraitement des rats par les flavonoïdes de la propolis donnés sous forme d'extrait éthanolique de la propolis et à dose 100 mg/kg, entraîne une diminution mais de façon non significative des activités enzymatiques tissulaires par rapport à celle des rats traités par la doxorubicine seule.

Tableau 12 : Variations de l'activité enzymatique de la γGT tissulaire après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à la dose de 100 mg/kg

Les groupes	γGT tissulaire (mU/g de tissus)		
	24 heures	7 jours	15 jours
Témoin	24.89 ± 4.29	20.75 ± 0.77	20.24 ± 0.83
Doxorubicine 10 mg/kg	23.33 ± 0.23 ns	19.27 ± 3.28 *	15.29 ± 0.41 *
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg + Doxorubicine 10 mg/kg	22.7 ± 0.26 ns	17.7 ± 0.42 *	13.85 ± 0.21 ns
Extrait éthanolique de la propolis 100 mg/kg	21.03 ± 0.64 ns	19.05 ± 0.21 *	17.12 ± 2.17 ns

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$) , (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

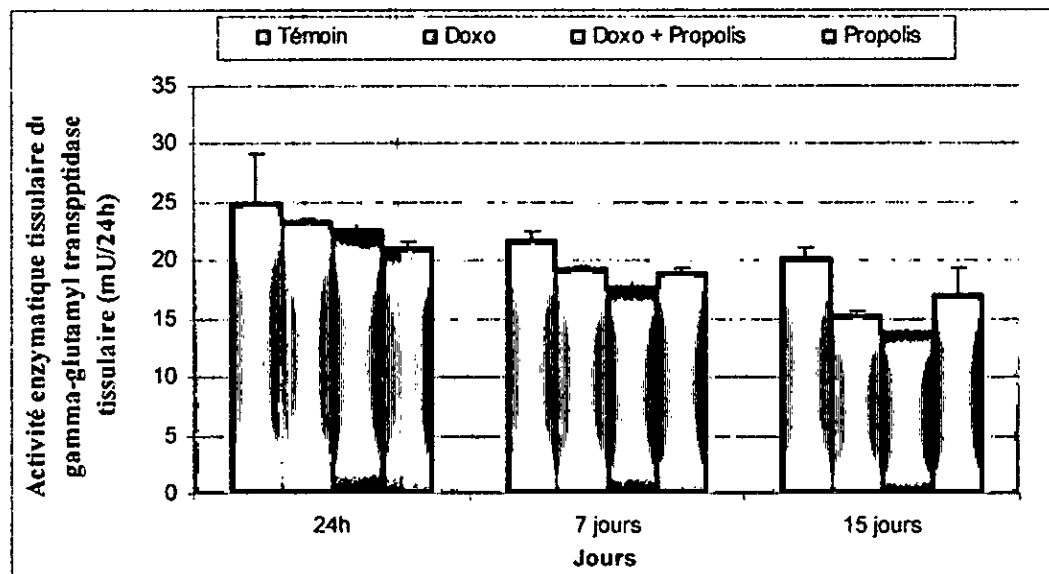


Figure 38 : Variations de l'activité enzymatique de la γ GT tissulaire après traitement par la doxorubicine 10 mg/kg seule ou associée à l'extrait éthanolique de la propolis à la dose de 100 mg/kg.

DISCUSSION

DISCUSSION

Le stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de plusieurs et peut être de la plupart des voies pathologique. C'est un syndrome au cours duquel les éléments prooxydants dépassent la capacité antioxydant de l'organisme. Il en résulte un déséquilibre entre prooxydants et antioxydants (Temple, 2000).

Les origines du stress oxydant sont multiples et mènent à la formation des espèces réactives de l'oxygène. En effet, il est clairement démontré aujourd'hui que les radicaux libres sont responsables de processus toxiques, et sont impliqués dans les maladies neurodégénératives, inflammation, diabète, atherosclérose, cancer, mais également dans les phénomènes de vieillissement (Szewczyk et Wojtczak 2002).

Plusieurs agents endogènes ou exogènes provoquent ce déséquilibre entre les éléments prooxydants et les antioxydants. Les médicaments anticancéreux telle que la doxorubicine constituent l'une des sources des ROS aux cours de leur élimination par le rein sous forme de métabolites réactifs. Ces derniers pourraient avoir des effets néfastes à différents niveaux soit en altérant la structure du rein soit en perturbant son fonctionnement. L'action toxique de la doxorubicine peut entraîner un effet néfaste sur le tissu rénal c'est pourquoi nous avons voulu rechercher un moyen de protéger les tissus contre les dégâts oxydatifs (Sylvie, 2004).

Pour se protéger des effets toxiques des radicaux libres, l'organisme a développé des systèmes de défenses qui permettent de contrôler et parfois de régler la production des ROS. Dans ces systèmes de défense, on inclut des composés antioxydant, vitamine C et vitamine A, le glutathion, principal antioxydant dans la cellule, les antioxydants enzymatiques, la SOD et la catalase (Bacot, 2004). En tant qu'antioxydant exogène les flavonoïdes de la propolis peuvent également entrer dans le système de protection contre le stress oxydant, plusieurs études ont montré que les flavonoïdes de la propolis possèdent un large spectre d'activité biologiques: Activité antiviral et antitumoral (Serra-bonvehi et al, 1994; Marcucci, 1995), activité antimicrobienne (Katircioglu et Marcan, 2006), anticancerogène, anti-inflammatoire et antioxydant (Kumazawa et al., 2004; Wang et al, 2004; Katircioglu et Marcan, 2006). L'objectif de notre travail était de tester l'effet de la propolis sur le stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine, afin de déterminer si elle pouvait les inhiber, et d'identifier les composés les plus actifs dans notre extrait.

La principale source des flavonoïdes que nous avons utilisée dans notre travail a été la propolis de la région de Kaous. Les analyses chromatographiques effectuées, chromatographie sur couche mince, chromatographe liquide à haute performance couplée à la spectrophotométrie UV, ainsi que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse ont permis d'avoir une idée sur la nature de ces principes actifs responsables de l'activité biologique de la propolis, il s'agit de flavonoïdes de type flavone, chalcone et flavanone. De plus, l'analyse des spectres de masse réalisée en impacte électronique (EI) indique que ces flavonoïdes sont: le pinostrobin chalcone, pinocembrine ou (galangine flavanone), naringénine (flavanone), et les deux flavone la chrysin et tectochrysin. La majorité de ces flavonoïdes sont de type aglycone. On addition à ces flavonoïdes la propolis contient une série de composés qui sont les ester, les acides aromatiques libres, les acides aliphatiques, les sucres et les alcools.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Abd El Hady et al (2002) réalisés sur la composition chimique de la propolis égyptien (East Nile Delta propolis) après une CG-SM, indiquant qu'elle est composée essentiellement des acides aliphatiques des acides aromatiques des esters des sucres, et des flavonoïdes comme le pinostrobin chalcone, pinocembrine, pinobankasine, chrysin et la galangine. Le même résultats obtenus par Bankova et al (2002) sur la composition chimique de la propolis Européen.

Donc les résultats obtenus permettent de conclure que la propolis de la région de Kaous contient les composés habituellement trouvés dans la propolis des autres pays.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressé à étudier le rôle potentiel antiradicalaire de nos extraits en adoptant la méthode ou DPPH° (1,1, Diphényle 2-hydrazyl). Nos résultat ont montré que l'extrait éthanolique de la propolis présente un effet antiradicalaire très puissant contre ce radical, il est plus actif à des concentrations jusqu'à 0.12 mg/ml. L'effet scavenger de la propolis est maximale à concentration 1 mg/ml avec un pourcentage de réduction de 88.30% contre 75.51% avec la quercétine le flavonoïdes de référence.

Le pouvoir antioxydant de la propolis est très puissant et comparable à celle de la quercétine aux différentes concentrations. Cet effet piègeur de la propolis contre le DPPH° est fonction des concentrations.

L'activité antioxydante de la propolis est probablement due à la diversité de leur constituants, jusqu'à présent il à été identifié plus de 300 composants dans la propolis et la majorité d'entre

autre sont la classe des flavonoïdes, on trouve aussi les résines et les cires, les huiles essentielles... etc. (Kosalec, et al, 2003)

Nos résultats confirment le rôle antioxydants des flavonoïdes de la propolis (Isla et al, 2001) ils sont également en accord avec ceux de la littérature montrant que les flavonoïdes ont la capacité de capter et de désactiver les radicaux libres (Erben-russ et al, 1987; Bors, 1994; Ritta, 2000; Rajendran et al, 2004). Des études très récentes ont montré que plus le contenu en polyphénols dans les fruits et légumes était important, plus la capacité antioxydante était totale (Ou et al, 2002; Pincemail et al, 2006; Stratil et al, 2006).

L'activité antiradicalaire des flavonoïdes est due à la capacité de piéger les radicaux libres, plusieurs études in vitro ont montré que les flavonoïdes peuvent directement piéger des espèces moléculaires de l'oxygène actifs comme les superoxydes, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle (Bors et al., 1990; Yamasaki et al., 1997; Yousfi et al, 2006) générés par notre organisme en réponse aux agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections, médicaments, etc.) et qui favorisent le vieillissement cellulaire. Ces composés renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires (Raj Narayana et al, 2001).

La capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres est liée essentiellement à leur structure moléculaire (Bors et al, 1990). En effet les composés les plus actifs sont ceux qui possèdent les caractéristiques suivantes:

- La structure ortho-dihydroxy sur le cycle B qui confère la stabilité au radical flavonoxy et participe à la délocalisation des électrons.
- La double liaison C2-C3 en conjugaison avec la fonction 4-oxo.
- La présence du groupe hydroxyles en position 3 et 5 qui permettent une activité antiradicalaire maximale (Yousfi et al, 2006).

A la lumière de ces données, seules la composition flavonoidique de nos extraits est en mesure de posséder une activité antioxydante. L'analyse chimique de la propolis de Kaous a révélé la présence des flavones, des flavanones et des chalcones. Ces flavonoïdes présentent les éléments de structure décrits ci-dessus et sont de ce fait des piègeurs efficaces des radicaux libres.

Le métabolisme de la doxorubicine par le cytochrome P450 génère des métabolites réactifs, ces derniers vont attaquer les constituants cellulaires. La conséquence est la perte de fluidité membranaire, la destruction de la microarchitecture membranaire, et la peroxydation

lipidique et l'augmentation des niveaux du MDA. Il est supposé que beaucoup des effets secondaires de la doxorubicine se produisent à travers la production de radicaux libres, substances dangereuses qui peuvent endommager les macromolécules du tissu hôte. Les antioxydants neutralisent ces RL, sur cette base un nombre d'antioxydants a été proposé comme un traitement pour réduire la toxicité de la doxorubicine (Venkatesan, 2000; Al-Majed, 2002; Balachandar, 2003; Conklin, 2005)

La peroxydation lipidique est l'un des effets majeurs de l'attaque radicalaire qui aboutit à la formation de nombreux dérivés toxiques dont le malondialdelyde (MDA). Dans notre étude réalisé *in vivo* sur le rein, nous avons trouvé une augmentation significative des taux du MDA dans les groupes d'animaux recevant le médicaments seuls, cette augmentation est un indicateur de la toxicité de la doxorubicine. Par contre, nous avons enregistré une diminution des taux du MDA dans les groupes d'animaux recevant les flavonoïdes avant le traitement médicamenteux. La réduction des taux du MDA observé chez les rats prétraité par les flavonoïdes prouve l'effet préventif des flavonoïdes de la propolis contre le stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Vijay Kumar et al (2000). Ses travaux réalisés sur le rein montrent que le traitement des rats par la gentamicine (aminoglycoside) seule à la dose (80 mg/kg i.p) pendant 8 jours augmente de façon significative le taux du MDA dans le plasma. Par contre le prétraitement des rats par le probucol (antioxydant) à une dose quotidienne de (10 mg/kg i.p) pendant 3 jours avant l'administration de la gentamicine (80 mg/kg i.p) est poursuivi jusqu'au 11^{ème} jours en association avec la gentamicine, diminue significativement le niveaux du MDA plasmatique.

Dans le même sens, une étude récente réalisé chez les rats montre que l'administration de la Cisplatine à (5 mg/kg i.p) augmente la peroxydation lipidique et les taux du MDA dans les tissus rénales et conduit à un état de néphrotoxicité. Par contre le prétraitement par la quercétine 50 mg/kg diminue significativement les taux du MDA rénale (Behling et al, 2006).

En effet le stress oxydant a été suggéré par Pavlovic et al (1998), pour jouer une rôle dans la physiopathologie rénal induit par les médicaments, ils ont observé une augmentation plasmatique de la concentration de MDA, un marqueur du stress oxydatif, dans le sang et dans le cortex rénal (Taulan, 2004). D'autres études ont démontré une augmentation de la peroxydation lipidique aux niveaux de rein chez les rats traité par la gentamicine (Vijay

Kumar et al, 2000). Pour cela l'acide polyaspartique a été utilisé comme agents néphroprotective contre la néphrotoxicité de la gentamicine (Gilbert, 1989). Un autre agent qui est l'acide époïque inhibe la néphrotoxicité induit par ce médicament chez les rats (Sandhya, 1995), réduire aussi la toxicité de l'adriamycine, diminue le niveau du MDA de cœur, protéger ainsi les animaux.

Il est généralement admis que le rein, véritable appareil d'épuration de l'organisme et le siège de la toxicité des agents anticancéreux (Sylvie, 2004), cette toxicité est enregistrée par l'augmentation du MDA l'un des produits finals de peroxydation lipidique qui est largement étudié, les flavonoïdes de la propolis ont été montré pour réduire son niveau dans la cellule (Inal, 2000). L'effet protecteur de la propolis due à la capacité de ces principes actifs à capturer les molécules du MDA, ou bien à l'inhibition des réactions en chaînes de la peroxydation lipidique.

D'un point de vue physiologique, des lésions au niveau du rein (filtre glomérulaire et épithéliums tubulaires) entraîne une augmentation des concentrations de la créatinine et de l'urée plasmatique. L'atteinte de la fonction rénale se traduit aussi par une protéinurie et une enzymurie, phosphatase alcaline et gamma-glutamyl transpeptidase (γ GT) (Anthony, 1994; Pedraza-Chaverri et al, 1995). La gamma-glutamyl transpeptidase catalyse la première étape du catabolisme du glutathion. En effet l'augmentation de gamma-glutamyl transpeptidase urinaire a été utilisée comme un indicateur sensible des dommages des tubules proximaux rénaux (Taulan, 2004).

D'après nos résultats obtenus, le traitement des rats par la doxorubicine 10 mg/kg seule augmente significativement l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl transpeptidase urinaire et plasmatique, cette activité est maximale au délai de 7 jours après traitement. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lahouel (1985) réalisé sur la toxicité de la doxorubicine montre que l'injection de ce médicament à 10 mg/kg augmente l'activité enzymatique urinaire. L'augmentation de cette activité enzymatique due à l'atteinte de la fonction rénale Par contre nous avons enregistré une nette diminution de l'activité enzymatique de (γ GT) tissulaire dans les groupes d'animaux recevant le médicament seul. Cette diminution est temps dépendant.

Concernant l'effet préventif de la propolis contre le stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine, nous avons remarqué une diminution de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl transpeptidase chez les animaux prétraité par l'extrait éthanolique de la propolis, ce qui prouve l'effet préventive des flavonoïdes de la propolis sur la toxicité de la doxorubicine. Dans le même sens, une étude récente a été portée sur les dommages oxydatives rénales induits par la gentamicine chez les rats, montre que le traitement des rats par ce médicament seul à la dose (100 mg/kg i.p) pendant 7 jours augmente de façon significative l'activité enzymatique de (γ GT). Par contre le prétraitement des rats par la curcumine à la dose quotidienne (200 mg/kg p.o) pendant 14 jours, suivi d'une administration de la gentamicine (100 mg/kg i.p) associée avec la curcumine jusqu'au 21^{ème} jours, atténue de manière significative cette activité enzymatique (Farombi et Ekor, 2006).

Parmi les tests les plus utilisés pour évaluer la fonction rénale, la mesure de la créatinine plasmatique. En effet, nous avons remarqué une augmentation significative des concentrations de créatinine dans le groupe d'animaux recevant le médicament seul. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lahouel (1985) et renforcent ceux de Raguenez-Viotte (1988) et ces collaborateurs montrant que l'injection de la doxorubicine à 10 mg/kg chez les rats augmente de façon significative la créatinine plasmatique.

Par contre, nous avons enregistré une diminution des concentrations de la créatinine plasmatique dans le groupe d'animaux recevant les flavonoïdes administrés sous forme d'extrait éthanolique de la propolis avant le traitement médicamenteux. Ces effets des flavonoïdes sont comparables à ceux obtenus à partir d'autre flavonoïde tel que la quercétine. En effet, les rats qui ont reçu une injection de Cisplatine (5 mg/kg i.p) après l'administration de la quercétine (50 mg/kg) ont montré une concentration de créatinine plus basse que celle des rats traités par la Cisplatine seule (Behling, 2006).

Parmi les principales stratégies utilisées pour protéger les reins contre la toxicité de la doxorubicine, les résultats les plus avantageux ont été obtenus avec l'utilisation d'antioxydants (Ben-Ismaïl et al, 1994; Kavutcu et al, 1996; Özbek et al, 2000) et plus particulièrement avec les flavonoïdes de la propolis. En effet, l'anticancéreux est distribué dans la plupart des organes mais les reins sont les cibles privilégiées (Lanore, 1994; Delistle et al, 1996). Lors de leurs éliminations sous forme de métabolites réactifs, les médicaments pourront avoir des effets néfastes à différents niveaux.

La cellule dispose pour sa protection du glutathion. C'est le principal antioxydant propre à la cellule en se liant par son pôle SH aux métabolites toxiques. On admet aussi aujourd'hui que la formation de métabolites consomme du glutathion quand elle est importante et que cela aboutit à une déplétion du glutathion ce qui a pour principale conséquence la peroxydation lipidique et une oxydation des groupes thiols des protéines (Lahouel, 2005). Par contre on peut éviter ces effets par l'apport de substances pouvant piéger les radicaux libres. Ces substances sont des polyphénols obtenus par la synthèse chimique comme les dérivés semi synthétique de la curcumine soit par voies extractives à partir de plantes médicinales. Ces substances sont regroupées sous le terme d'antioxydants. De nombreux travaux scientifiques ont démontré leurs origines, leurs effets biologiques et pharmacologiques. Ils ont été utilisés dans les affections vasculaires, bactériennes, inflammation, ulcères et même dans la prévention des cancers comme l'ont rapportés de nombreux travaux (Steel, 2003; Lahouel et al, 2004).

Les taux de glutathion enregistrés chez les rats traités par la doxorubicine seule sont inférieurs à ceux des témoins. Cette diminution est essentiellement due à l'effet toxique des métabolites réactifs instables du médicament qui sont fixés et neutralisés par le système de détoxification provoquant ainsi la baisse des concentrations du GSH, ou bien la dégradation de ce dernier par la gamm-glutamyl transpeptidase.

Par contre, nous avons enregistré une augmentation des taux de glutathion dans les groupes d'animaux prétraités par les flavonoïdes de la propolis (100 mg/kg) par. L'augmentation des taux de glutathion rénales après l'administration de l'extrait éthanolique de la propolis prouve l'effet préventif des flavonoïdes sur la toxicité des médicaments anticancéreux.

On peut expliquer cette augmentation des taux du GSH soit par l'induction de sa synthèse, soit par l'effets scavenger des flavonoïdes c'est-à-dire au lieu que les métabolites réactifs toxiques se fixent sur le glutathion et le consomment, ils vont être capter par les flavonoïdes.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Farombi et Ekor (2006) montre que le traitement des rats par la gentamicine à 100 mg/kg diminue significativement les taux du GSH des tissus rénaux. Par contres les taux de glutathion obtenus chez les rats prétraités par la curcumine à 200 mg/kg sont supérieurs à ceux des rats traités par la gentamicine seule. De plus, une étude récente a montré que la propolis administrée à 50 et à 100 mg/kg prévient la cardiotoxicité induit par la doxorubicine (10 mg/kg) par l'amélioration des taux du GSH intracellulaire et sérique (Sharma et al, 1997).

Les travaux de Mansour et al (2006) montrent que le traitement des rats par la Cisplatine un anticancéreux à (7.5 mg/kg i.p) diminue les taux du GSH hépatique. Par contre l'administration de la silymarine un flavonoïde complexe à (100 mg/kg i.p) pendant 5 jours, suivi d'une dose de Cisplatine à (7.5 mg/kg) 1heure après l'injection de silymarine augmente les taux du glutathion dans les cellules hépatique.

Donc, le glutathion (GSH) a souvent un rôle à jouer. Une de ses fonctions est de piéger les substances oxydatives dans la cellule et de les éliminer. Cette fonction protectrice du GSH a été démontrée par plusieurs études dans lesquelles la diminution de ce peptide intracellulaire est en bonne corrélation avec l'augmentation de toxicité. Le rôle du GSH dans la prévention de la toxicité rénale a été étudié chez les rats. Des travaux ont montré une déplétion du GSH rénale de 27 % une heure après l'administration de glycérol et de 38 % six heures plus tard comparativement au groupe contrôle. Après 16 heures, le niveau de GSH est retourné à la normale. D'autre part, si le GSH joue vraiment un rôle protecteur dans la toxicité rénale induite par le glycérol, alors l'administration de GSH aura un effet bénéfique tandis que sa déplétion aura un effet inverse.

En effet, les rats qui ont reçu une injection de GSH exogène après l'administration de glycérol ont montré une concentration de créatinine plus basse que celle des contrôles (glycérol seul), tandis que le groupe de rats traités avec du DL buthionine-(S, R) –sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la synthèse du glutathion, ont montré une concentration très élevée de créatinine (Hilal et al, 2005). Donc ces résultats et nos résultats obtenus suggèrent fortement que le GSH a un effet protecteur dans la toxicité rénale.

Le stress oxydant est aujourd'hui connue comme le principale cause des perturbations dans la balance métabolique cellulaire entre les antioxydant et les oxydant. De nombreuses situations peuvent être à l'origine d'introduction ou de production de ces oxydants dans l'organisme, par exemple : certains traitement comme l'adriamycine (doxorubicine), produisent des ROS probablement responsable de la toxicité et des effets néfastes (Pascoe et Reed, 1987). Cependant le mécanisme de la toxicité rénale de la doxorubicine n'est pas clairement déterminé. L'administration de la doxorubicine aboutit à la formation des métabolites réactifs. Ces derniers vont attaquer les membranes cellulaires ce qui conduit à la peroxydation des acides gras polyinsaturés et la libération massive du MDA et la déplétion du GSH. Ainsi les métabolites réactifs résultants du métabolisme de la doxorubicine par le cytochrome P450 vont altérer également la fonction rénale au cour de leur élimination, et

conduisant à l'augmentation de la créatinine et des activités enzymatique de gamma-glutamyl transpeptidase (γ GT).

Les effets des flavonoïdes comme des anti-oxydants puissants sont actuellement très largement étudiés, notamment pour définir s'ils sont ou non bénéfiques dans la prévention de certains situations de stress oxydant. Sur la base des données et d'après des études récentes, le mécanisme impliqué dans le processus de défense d'un flavonoïde est:

- *La Neutralisation des ROS ou inhibition de leur production*: en neutralisant les ROS ou en inhibant leur formation, les flavonoïdes protègent les cellules, notamment au niveau des lipides membranaires. Cette protection est assurée par atténuation ou inhibition de la peroxydation lipidique par le piégeage et la captation des métabolites réactifs ou l'interruption des réactions en chaîne conduisant à la conservation des taux de GSH, et la protection des cellules.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

2CONCLUSION

Actuellement, le concept d'une thérapie à l'aide d'antioxydants, dans le but de renforcer les défenses antioxydantes endogènes pour une protection plus efficace contre le stress oxydatif, représente un but thérapeutique important et est d'intérêt scientifique et public. Parmi les antioxydants naturels les plus étudiés on cite les flavonoïdes de la propolis. Ces derniers sont considérés comme un outil pharmacologique important pour prévenir la pathologie associée au stress oxydatif.

L'objectif de notre étude a porté sur l'étude pharmacochimique de la propolis de la région de Kaous (Jijel) au cours d'un stress oxydatif induit par un médicament anticancéreux, la doxorubicine.

La première partie de ce travail a été consacrée aux études chimiques de la propolis. L'utilisation d'une combinaison de deux techniques analytiques (CG/SM et CCM) pour obtenir une information sur la nature chimique et la masse des constituants, a permis de mettre en évidence 5 flavonoïdes connus dans les extraits. Parmi ces flavonoïdes, on trouve, un chalcone (pinostrobin), deux flavones la chrysin et la tectochrysin et deux flavanones la pinocembrin et la naringénin.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes intéressés plus précisément à étudier l'effet antioxydant et antiradicalaire des flavonoïdes de la propolis *in vitro* et *in vivo* (sur des tissus rénaux de rat). Les premiers résultats obtenus montrent clairement que la propolis possède un pouvoir antioxydant très puissant à travers:

- La neutralisation et le piégeage des radicaux libres tels que le DPPH°.
- La protection des membranes cellulaires contre les effets nocifs des RL, par inhibition de la peroxydation lipidique et la diminution des taux du MDA.
- La limitation des effets délétères des ROS résultants de la métabolisation de la doxorubicine, et la protection des fonctions rénales, par inhibition des activités enzymatiques de la γ GT soit urinaire ou plasmatique, ou bien par la réduction des taux de créatinine sérique.
- Le renforcement de l'activité antioxydante du GSH par la stimulation de sa synthèse.

Ces résultats sont avantageux, ils ouvrent une piste dans la compréhension du rôle joué par les flavonoïdes dans la prévention et la limitation de diverses pathologies associées au stress oxydatif. Cependant, cela nécessite des travaux complémentaires, dans ce cadre et comme perspective nous proposons:

- Après avoir eu l'idée sur le nombre et la nature des flavonoïdes dans la propolis nous pouvons proposer de séparer chaque flavonoïde afin de mesurer l'activité antioxydante de chaque composé séparé.
- Poursuivre l'étude chimique de la propolis afin d'identifier d'autres composés dans l'extrait.
- Tester l'effet antioxydant des flavonoïdes sur les différentes fonctions mitochondriales.
- Réaliser les études de relation «structure – activité» des flavonoïdes, pour bien déterminer les sites favorables à une meilleure capture des radicaux libres.
- Détermination des paramètres physicochimiques pour mieux connaître les Propriétés antioxydantes d'un flavonoïde.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abd El Hady F. K, and Hegazi AG., 2002.** Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. *Z. Naturforsch.* 57c, 386-394
- Adrain C.S, Lec E.A, Hart M.T, and Martin S.J., 1999.** Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem*, 274 (30): 60-20855.
- Aherne S.A., O'Brien N.M., 2002.** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18(1): 75-81.
- Alexandre F., 1999.** L'apiculture aujourd'hui. *Dargaud ed*, pp 121-125.
- Al-Majed AA, Gdo AM, Al-Shabanah OA, et al., 2002.** Alpha-lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. *Pharmacol Res*, 46:499-503.
- Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, and Cormier M., 1994.** Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3- methyl- but-2-enyl caffeate. *J. Nat. Prod.* 57: 644-647.
- Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt PA, Testa B, Bree F, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Guyot D, Chauvet-Monges AM, Crevat A, Le Ridant A., 1998.** Structure-property of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radic Biol Med*, 25: 113-120.
- Anthony ML, Gartland KP, Beddell CR, Lindon JC, Nicholson J K., 1994.** Studies of the biochemical toxicology of uranyl nitrate in the rat. *Arch Toxicol*; 68(1):43-53.
- Antonio S, Erica W. T, Giuseppina N, Dejair M., 2005.** Origin and Chemical Variation of Brazilian propolis. *E CAM*, 2(1): 33-38.
- Association Française des Enseignants de chimie Thérapeutiques (AFECT)., 2003.** Médicaments antitumoraux et perspectives dans le traitement des cancers. *TEC et DOC éd, paris*, pp 364-410.
- Atsumi T, Uwakura I, Kashiwagi Y, Fujisawa S, Ueha T., 1999.** Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. *Antioxid. Redox Signal.* 1(4), 537-546.
- Auer D.E, Nj J.C, Seawright A. A., 1993.** Free radical oxidation products in plasma and synovial fluid of horses with synovial inflammation. *Aust. Vet. J.* 70: 49-52.
- Bacot S., 2004.** Caractérisation d'une nouvelle aldéhyde d'origine plaquettaire (4-Hydroxydodecadienal) et formation d'adduit de michael avec les phospholipides à ethanolamine. *Thèse de doctorat de l'université de Lyon*, p 75-81

- Balachandar AV, Malarkodi KP, Varalakshmi P., 2003.** Protective role of DL alpha-lipoic acid against adriamycin-induced cardiac lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol*, 22:249-54.
- Ben-Ismaïl T. H, Alib. H, And Bashir A. A., 1994.** Influence of iron, deferoxamine and ascorbic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Gen. Pharmacol*, 25:1249-1252.
- Bankova V, Bourdourova-Krasteva G, Sforcin J.M, Frete X, Kujungiev A, Maimoni-Rodella R and Popov S ., 1999.** Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from Sao Paulo State. *Zeitschrif Fur Naturforsch*, 54c: 401-405.
- Bankova V. S, De Castro S. L, Marcucci M. C., 2000.** Propolis: recent advance in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15.
- Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini A G., 2002.** Chemical composition of European propolis: Expected and Unexpected Results. *N. Naturforsch*. 57c, 530-533.
- Bankova V., 2005.** Recent trends and important developments in propolis research. *E CAM*, 2(1): 29-33.
- Beck P.R, Thomson R.B, Chaudhuri A.K.R., 1977.** Aminoglycoside antibiotics and renal function: changes in urinary gamma-glutamyltransferase excretion. *J. Clin. Pat.* 30,432.
- Behling E.B., Sendão M.C, Heloisa D.C. Francescato H D.C, Antunes L M.G , Costa R S, Bianchi M L. P., 2006.** Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacological Reports*, 58: 526-532.
- Berta-Vanrullen I., 2005.** Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation – Recommandations. *Thèse*, p 95.
- Bodini M.E, Copia G, Tapia R, Leighton F, Herrera L., 1999.** Iron complexes of quercetin in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide anion radical. *Polyhedron*. 18(17), 2233-2239.
- Boharune T, Gressier B, Trotin F, Bruner C, Dine T, Vasseur J, Grazin J.C, Pinkas M, Luychx M, Gazin M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from Hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzeim-Forsch/Drug Res*, 1-6.
- Bonsnes R.W, Tausky H. H., 1945.** On the colorimetric determination of creatinine by the jaffe reaction. *J. Biol. Chem.* 158: 581-600.
- Borbulevych O.Y, Jankun J.; Selman S.H., 2004.** Skrzypczak-Jankun, E. Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2-1 Å resolution. *Proteins*. 54(1), 13-19.
- Bors W, Michel C, Saran M., 1994.** Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol*. 234, 420-429.

- Bravo A., Anacona J.R., 2001.** Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties. *Transition Met. Chem* 26 (1-2), 20-23.
- Brovo L., 1998.** Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Review*, 56(11): 317-333.
- Brunetton J., 1993.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, (2^{ème} éd). Paris: éditions Tec & Doc Lavoisier, pp 266-293.
- Brunetton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (3^{ème} éd). Paris : édition Tec & Doc Lavoisier p1120.
- Burdock G. A., 1998.** Review of the biological properties and toxicity of been propolis. *Food Chem Toxicol*, 36: 347-363.
- Castronovo V., 2003.** Alimentation et cancer. *Rev Med Liege*, 58: 231-239.
- Chen K, Suh J, Carr A.C, Morrow J.D, Zeind J, Frei B., 2002.** Vitamine C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, vol 279(6), p.E1406-1412.
- Comhair S.A, Erzyrum S.C., 2002.** Antioxidant reponses to oxidant-mediated lung diseases. *Am .J .Physiol*, 283: L246-L255.
- Conklin KA, et al., 2004.** Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutique effectiveness. *Integrative cancer therapies*, 3(4): 294-300.
- Conklin KA., 2005.** Coenzyme q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Integr Cancer Ther*, 4:110-30.
- Cook NC, Samman S., 1996.** Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(2): 66-76.
- Cotters M, Kanki P. J, Simon M., 1985.** Renal disease in five tumor-bearing cats treated with adriamycin. *J. Am. Anim .Hospit. Assoc*, 21: 405-409.
- Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Denigne C, and Remesy C., 2004.** Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glycosides in rats. *J Nutr*, 131: 2019-2114.
- Cuvelier C, Dotreppe O, Istasse L., 2003.** Chimie, sources alimentaires et dosage de la vitamine E. *Ann. Med. Vèt*, 147:315-324.
- Da Silva S.L, da Silva A, Honorio K.M, Marangoni S, Toyama M.H, da Silva A.B.F., 2004.** The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *J. Mol. Structure (Theochem)*. 684(1-3), 1-7.
- D'Arcy D.R., 2005.** Antioxidants in Australian floral honeys: Identification of health-enhancing nutrient components. *ISSN 1440-6845*.

- Delattre J, Beaudoux J.L, Bonnefort-Rousselot D., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Tec & Doc Lavoisier
- Delistle F, Devauchille P, Døliger S., 1996.** Le cisplatine- *Point Vet.* Vol. 28 (175) 69-71.
- De Moffarts B, Kirschvink N, Pincemail J, Lekeux P., 2005.** Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Ann. Méd. Vét.*, 149: 1-9.
- De Souza R.F, De Giovanni W.F., 2004.** Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep* 9(2), 97-104.
- Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A.A, Capasso F., 1999.** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci*, 65(4): 337-353.
- Donatiello C., 2002.** La toxicité cardiaque des anthracyclines dans le traitement des tumeurs de l'enfant. *Thèse de doctorat de l'université de Genève*, p 5.
- Dragan A, et al., 2003.** Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 76(1):55-61.
- Droge W., 2002.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev*, 82: 47-95.
- Dubois C., 1998.** Effets indésirables des principaux anticancéreux chez les carnivores domestiques. *Thèse D.V Lyon*.
- Ducrocq, C., et al., 2001.** Intervention by nitric oxide, NO, and its oxide derivatives particularly in mammals. *Can J Physiol Pharmacol*, 79(2): 95-102.
- Ellman G.L., 1959.** Plasma antioxidants. *Arch Biochem Biophys*, 82:70-77.
- Erben-Russ M, Bors W, Saran M., 1987.** Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol.* 52, 393-412.
- Farombi E.O, Ekor M., 2006.** Curcumin attenuates gentamicin-induced renal oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1443-1448.
- Favier A., 2003.** Stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique novembre*, pp 108-115.
- Fiorucci S., 2006.** Activité biologique de composés de la famille des flavonoïdes: approches par des méthodes de la chimie quantique et de dynamique moléculaire. *Thèse de doctorat de l'université de Nice-Sophia Antipolis*, pp 10-29.
- Geetha A, Catherine J, and Shyamala Devi C.S., 1989.** Effect of alpha-tocopherol on doxorubicin induced alterations in glucose metabolism-A pilot study. *J.Biosci*, Vol.14, 3: 243-247.

- Ghuysen M.S., 2005.** Les médicaments dangereux pour le rein. *Archives de pédiatrie* 12 :728-730
- Gilbert DN, Wood CA, Kohlepp S.J, et al., 1989.** Polyaspartic acid prevents experimental aminoglycosides nephrotoxicity. *J Infect Dis*, 159: 945-53.
- Gonin D, Senior DF., 1995.** Progression of chronic renal failure and the effects of diet in dogs. *J. Am. Vet*, 207: 1411-1415.
- Gonwales R, Corcho I, Ramirez D, Rodriguez S, Ancheta O, Merino N, Gonzales A, and Pascual C., 1995.** Hepathoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytoth. Res.* 9: 114-117.
- Green P.S, Leeuwenburgh C., 2002.** Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 62146: 1-8.
- Greenaway W, Scaysbrook T and Whatley F. R., 1990.** The composition and plant origin of propolis: a report of work at oxford. *Bee World*, 71: 107-118.
- Gutteridge JM., 1993.** Free radicals in diseases processes: a complication of cause and consequence. *Free. Radic .Res. Commun*, 19: 141-158.
- Halliwell B., 1995.** Oxidation of low-density lipoproteins: questions of initiation, propagation, and the effect of antioxidants. *Am. J. Clin. Nut.* 61: 670S-677S.
- Harborne J.B and Williams C.A., 2000.** Advances in flavonoid research since. *Phytochemistry*, 55 (6): 481-504.
- Haton C., 2005.** Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *Thèse de doctorat de l'université Paris VI*, p. 48- 51.
- Hertog M.G, Feskens E.J, Hollman P.C, Katan M.B, Kromhout D., 1993:** Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 342:1007-1011.
- Hilal G, Albert C, et Vallée M., 2005.** Mécanisme impliqué dans la néphrotoxicité. *Ann Biol Clin*, 42(3): 29-35.
- Hollman P.C, Katan M.B., (1997).** Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, 51: 305-10.
- Hortobágyi GN., 1997.** Anthracyclines in the treatment of cancer. *Drugs*, 54: 1-7.
- Hwang E, Kaneko M, Ohnishi Y and Horinouchi S., 2003.** Production of plant- specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Applied and environmental microbiologie*, 69: 2699-2706.

Inal ME, Kahraman A., 2000. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet-induced oxidative stress in rats. *Toxicology*, 154: 21-29.

Isla M., Moreno M, Sampitro A, and Vattune M. A., 2001. Antioxidant activity of argentine propolis extract. *J Ethnopharma*, 76: 165-170.

Jaakola L., 2003: Flavonoid biosynthesis in Bilberry (*VACCINIUM MYRTILLUS L*)

Thèse, p 14

Janero D. R., 1990. Malondaldehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic of lipid peroxidation and peroxidative injury. *Free. Radic. Biol. Med*, vol 9: 515-540.

Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Philips T, Selman C, Julian D, Leeuwenburgh C., 2004. Doxorubicin in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS Letters*, 577: 483-490.

Januel C., 2003. Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète. Etude du glutathion et de la glutathion peroxydase 4. *Thèse de doctorat. Université Lyon1 / INSA-Lyon*, pp 42-43

Jovanovic S.V, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic M.G., 1994. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4846-4851.

Kartal M, Kaya S, and Kurucu S., 2002. GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z. Naturforsch.* 57c, 905-909.

Katircioglu H and Mercan N., 2006. Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 5 (11), pp. 1151-1153,

Kavutcu M, Canbolat O , Ozturk S , Olcay E , Ulutepe S , Ekinici C, And Durak I., 1996. Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin-treated guinea pigs: effects of vitamins E and C- *Nephron*, 72: 269-274.

Kim S.R, et al., 2006. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Experimental and molecular medicine*, 38: 535-545.

Klarh S., 1999. Mechanism of progression of chronic renal damage. *J.Nephrol*, 12. (suppl.2):S53-62.

Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S., 2003. Analysis of propolis from the continental and Adriatic region of Croatia. *Acta Pharm.* 53: 275-285.

Krishna D.R.; 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16

Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84:329-339.

- Lahouel M., 1985. Etude de la toxicité hématologique hépatique et rénale de deux médicaments anticancéreux: La doxorubicine et le CCNU chez e rat. Thèse de doctorat de l'université de Haute Normandie. pp 220.
- Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, Fillastre J.P., 2004. The flavonoids effect against vimblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathion concentration, *Heama*, issue 7(1): 59-67.
- Lahouel M., 2005. Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. *Thèse de doctorat d'Etat*, pp150.
- Lamb J.F, Ingram C.G, Johnston I.A, Pitman R.M., 1990. Manuel de physiologie. *éd paris*, pp 214 - 235
- Lanore D., 1994. Le cisplatine : une nouvelle drogue en cancérologie vétérinaire- *PMCAC*, 29:189-196.
- Laraoui H., 2007. Etude phytochimique de l'extrait chloroformique de *bubleurum atlanticum*. *Thèse*, p 12.
- Louis S., 2004. Diversité structurale et d'activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses. *Thèse de doctorat de l'université de lyon*. p44.
- Manach C, Morand C, Texier O, Favier M. L, Agullo G, Regerat F and Remesy C.,1995. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nut*, 125: 1911-1922.
- Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Régérat F, Demigné C, Rémésy C., 1999. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 1259-1266
- Manach, C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr*, 79(5), 727-747.
- Mansour H.H, Hafez F. H and Fahmy N. M., 2006. Silymarin Modulates Cisplatin-Induced Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 39, No. 6, pp. 656-661
- Marcucci, M.C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26: 83-99.
- Marcucci M.C, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova V.S, De Gastro S.L, Dantas A.P, Valent P.H. M and Paulino N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74: 105-112.
- Marfak M., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: Formation de depsides. *Thèse de doctorat de l'université de limoges*. pp 29-34

- Marieb E.N., 1999.** Anatomie et physiologie humaines, 2e édition. Édition du Renouveau Pédagogique Inc., Saint-Laurent: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Maritim A.C., R.A. Sanders, and J.B. Watkins, 2003.** Diabetes, oxidative stress, and antioxidants 3rd: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, 17(1): 24-38.
- Markham K. R., 1982.** Techniques of flavonoid identification. *New York: Academic Press, London.*
- Markham K. R., Bloor S.J., 1998.** Analysis and identification of Flavonoids in Practice. In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans C. A.; Packer L., Eds. Marcel Dekker: New York pp 1-34.
- Marnett L.J., 1999.** Lipid peroxydation-DNA damage by maondiadehyde. *Mutat. Res.*424: 83-95.
- Martin S, Andriantsitohaina R., 2002.** Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols aux niveaux de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angiologie*, 51: 304-315.
- Masson E., 2005.** Rôle des gangliosides dans les perturbations de la prolifération des péricytes rétinien et des cellules mésangiales rénales: implication dans le développement de la rétinopathie et de la néphropathie diabétiques. *Thèse de doctorats Université de Rennes.* pp 24-23
- Matés J.M, Segura J.M, Pérez-Gomez C, Rosado R, Ollola L, Blanca M, and Sanchez-Jiménez F.M., 1999.** Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after allergic reaction to pollen or house dust mite. *Blood Cells, Molécules, and Diseases*, 25 (7): 103-109.
- Ma Y.-L, Li Q.M. , van den Heuvel H. and Claeys M., 1997.** Rapid Commun. Mass Spectrom. 11:1357-1364.
- McCord J.M, Fridovich I., 1968.** The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem*, 243(21), 5753-5760.
- Meister A., 1983.** Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220 (4596): 7-472.
- Middleton E.Jr, Chithan K, and Theoharides T.C., 2000.** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52): 673-751.
- Mila I, Scalbert A., 1994:** Tannin antimicrobial properties through iron deprivation: a new hypothesis. *International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*, 381(2) : 749-755.
- Milan H., 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur Strasbourg*, pp 21-32.

- Miller N.J, Rice-Evans C.A., 1996. Spectrophotometric determinations of antioxydant activity. *Redox Rep*2, 161-171.
- Minotti G, et al., 1998. The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/ iron regulatory protein-1 n cytosolic fractions from human myocardium. *The FASEB journal*. Vol.12: 541-552.
- Mirto H., 1997. Nephrotoxicité et decorporation de l'uranium et moyens de les étudier *in vitro*. Thèse p 8.
- Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigné C, Rémésy C., 1998. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am.J.Physiol*. 275: R212-R219.
- Moridani M.Y, Pourahmad J, Bui H, Siraki A, O'Brien P.J., 2003. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biol. Med*. 34(2), 243-253.
- Murad J.M, Calvi S. A, Soares A. M.V.C., Bankova V, and Sforcin J. M., 2002. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages agains paracoccidioides brasiliensis. *J. Ethnopharm*. 79: 331-334.
- Muzykantov V.R., 2001. Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Control Release*, 71(1): 1-21.
- Mylène B, 2006. Effets d'un antioxydant, le TEMPOL, sur les actions métabolique et vasculaires de l'insuline chez le rat insulino-résistant avec un surplus de poids. Effets de l'insuline sur le transport du glucose dans le muscle squelettique, la réactivité vasculaire, l'expression des protéines eNOS, le stress oxydatif et les effets hémodynamiques régionaux. *Thèse de doctorat de l'université Laval Québec*, pp 35-37.
- Nagai T, Inoue R, Suzuki N, Myoda T and Nagashima T., 2005. Antioxidative ability in a linoleic acid oxidation system and scavenging abilities against active oxygen species of enzymatic hydrolysates from pollen *Cistus ladaniferus*. *International journal of molecular medicine*, 15: 259-263.
- Neiva-Moreno MI. N, Isla M. I, Sampietro A. R, and Vattuone M.A., 2000. Comparaison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions in Argentina. *Journnal of Ethnopharmacology*, 71: 109-114.
- Okhawa H, Ohishi N, and Yagi K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
- Ong K.C, Khoo H.E., 2000. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci*. 67: 1695-1705.
- Ou B, Huang D, Hampsh-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem*, 50: 8-3122.

- Özbek E, Turkoz Y, Sahna E, Ozugurlu F, Mizrak B And Ozbek M., 2000. Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin - JU International; Volume 85 Issue 6 Page 742.
- Park Y.K, Koo M.H, Ikegaki M. & Contado J.L. 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arg. Biol. Technol.* 40(1): 97-106.
- Pascoe G A, and Reed D J., 1987. Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. II. Evidence for a threshold effect of cellular A-tocopherol in prevention of adriamycin toxicity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 256(1): p. 159-166.
- Pavlovic D, Vlahovic P, Cvetkovic T, Savic V, Kocic G., 1998. Is oxidative stress the biochemical basis of uranyl nitrate-induced acute renal failure? *Ren Fa*; 20(3):539-42.
- Pedraza-Chaverri J *et al.*, 1995. Angiotensin I converting enzyme activity in uranyl nitrate induced acute renal failure in rats. *Ren Fail*; 17(4): 377-88.
- Pein F, Vassal G, Sakiroglu C, Tournade MF, Lemerle J., 1995. Aspects pédiatriques de la toxicité cardiaque des anthracyclines et implications pratiques pour sa prévention. *Archives Pédiatriques*, 2(10) : 988-999.
- Peterson J, Dwyer J., 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.* 18(12), 1995-2018.
- Pincemail J, Degrune F, Voussure S, Malherbe C, Paquot N, Defraigne J.O., 2007. Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme*, 21:66-75
- Polack E. W, King J.M, Cummings J.F, Mohammed O.H, Birch M, Cronin T., 2000. Concentration of trace minerals in the spinal cord of horses with equine motor neuron disease. *Am. J. Vet. Res.*, 61: 609-611.
- Raguenez-Viotte G, Lahouel M, Ducastelle TH, Morin J. P and Fillastre J. P., 1988. CCNU-Adrimycin association induces earlier and more severe nephropathy in rats. *Arch Toxicol.* 61: 282-291.
- Rajendran M, Manisankar P, Gandhidasan R, Murugesan R., 2004. Free Radicals Scavenging. Efficiency of a Few Naturally Occurring Flavonoids: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 52 (24), 7389-7394.
- Raj Narayana K, Sripal ReddyM, Chaluvadi MR, D.R. Krishna D. R., 2001. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33: 2-16
- Renauld I., 2005. Effet d'un traitement combiné du périndopril inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, et d'un agent diurétique, l'indapamide, sur la progression de l'insuffisance rénal chez e rat zucker obèse. *Thèse de doctorat.* pp.89-90.
- Ritta P. G., 2000. Flavonoids as antioxydants. *J Nat Prod*, 63: 1035-1042.

- Rodriguez-Proteau R, Mata J.E, Miranda C.L, Fan Y, Brown J.J, and Buhler D.R., 2006. Plant polyphenols and multidrug resistance: Effects of dietary flavonoïdes on drug transporters in Caco-2 and MDCKII-MDR1 cell transport models. *Xenobiotica*, January, 36(1): 41-58.
- Sandhya P, Mohandass S, Varalakshmi P., 1995. Role of DL-lipoic acid igitamicin-induced nephrotoxicity. *Mol Cell Biol*, 145:11-7.
- Sawaya. A. C.H.F, Palma M. A, Caetano F. M, Marcucci M. C, da Silva Cunha I.B, Araujo. CE. P and Shimizu M.T., 2002. Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions agains species of *Candida*. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 203-207
- Scalbert A, Williamson G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr* 130(8S Suppl), 2073S-2085S.
- Sera-Bonvehi J, Ventura C. F and Escola J. R., 1994. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 71: 529-532.
- Servais S., 2004. Altération mitochondriales et stress oxydants pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'age et d'une supplémentation en Oméga-3. *Thèse de doctorat, Université ClaudeBernard-Lyon1, France*, p33.
- Sharma M, Pillai K. K, Husain S. Z, Giri D. K.,1997. Protective role of propolis against alcohol carbon tetrachlorde-induced hepatotoxicity in rats. *Ind. Jur. Pharm*, 29(2): 76-81.
- Siso S, Hanzli-Ek D, Fluehmann G, Kathmann I, Tomek A, Papa V, Vandavelde M., 2005. Neurodegenerative diseases in domestic animals: a comparative review. *Biochem Mol Biol*
- Sohal R.S, Mockett R.J, Orr W.C., 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Rad. Biol. Med.* 33(5), p575.
- Spencer J. P, Chowrimootoo G, Ghoudhuery R, Debram E.E, and Rice Evans C., 1999. The small intestine can both absorb and glucuronidete luminal flavonoïdes. *FEBS Lett*, 458: 224-230.
- Steel V E., 2003. Current mechanistic approaches to the chemoprevention of cancer. *J. Biochem Mol Biol*, 36(1): 78-81.
- Stratil P, Klejdus B, Kuban V., 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables — evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem*, 54: 16-607.
- Strehl E, Volpert R, and Elstner E. F., 1993. Biochemical activities of propolis extract III. Inhibition of dihydrofolate reductase. *Z. Naturforsch.* 49: 39-43.
- Stryer L., 1992. *Biochemistry*. Flammarion édts: Paris.

Su-Hsiang F, Ming-Hua Y, Hwei-Mei W and Jiing-Chuan C., 2004. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 13: 43-50.

Sun F, Hayami S, Haruna S, Ogiri Y, Tanaki K, Yamada Y, Ikeda K, Yamada H, Kawai N and Kojo S., 2000. *In vivo* antioxydative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamin C and vitamin E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1462-1465.

Sylvie M., 2004. Néphropathies d'origine médicamenteuse chez les carnivores domestiques. *Thèse de doctorat de l'université Claude- Bernard –Lyon1*.pp 21-22.

Szewczyk A, and Wojtczak L., 2002. Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol Rev*, 54:101–127

Tanaka Y et Al., 2006. Molecular characterization of the flavonoid biosynthesis of verbena hybrida and the functional analysis of verbena and clitoria ternatea F3-5-H genes in transgenic verbena. *Plant Biotechnology*, 23: 5–1.

Taulan M., 2004. Conséquences moléculaires des expositions aigüe et chroniques à l'uranium sur le transcriptome murin. *Thèse de doctorat de l'Université Montpellier*,pp30-38.

Temple NJ., 2000. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Res*, 20: 449-459.

Thomas S. R, Chen K, and Keaney J. F., 2003. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal*, 5: 94-181.

Van der Woud H, Alink G. M, Van Rossum B. E.J, Walle K, Van Streeg H, Walle T, Rietjens I M. C M., 2005: Formation of transient covalent protein and DNA adducts by quercetin in cells without oxidative enzyme activity. *Chem. Res. Toxicol.* 18 (12), 1907-1916.

Vanessa C, Christine M, Catherine B, Nicole C., 2003. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of compound. *Mol Microbiol*, 32:1013-1021.

Venkatesan N, Punithavathi D, Arumugam V., 2000. Curcumin prevents Adriamycin nephrotoxicity in rats. *Br J Pharmacol*, 129: 231-4.

Velikova M, Bankova V, Tsvetkova I, Kujumgiev A, and Marcucci M.C., 2000. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fito-terapia*. 71: 693-696.

Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Houcine S, Tsvetkova I. & Kujumgiev A. 2000b. Propolis from the Mediterranean Region: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Z. Naturforsch.* 55c (9/10), 790-793.

Vijay Kumar K, Naidu M.U.R. , Shifow A.A, Ratnakar K.S., 2000. Probucol protects against Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 32: 108-113

Virost S., 2004. Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R120G de l'BB-cristalline. *Thèse de doctorat de l'université Claude Bernard-Lyon 1*, pp 11-23.

Wang BJ, Lien YH, Yu Z R., 2004. Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chem.* 86:237-243.

Wassmann S, Wassmann K, and Nickenig G., 2004. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44 (4): 6-381

Williams R.I, Spenser J.P, Rice-Evans C., 2004. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. *Free Radic Biol Med*, 36(7): 838-849.

Wilson A, Salamatian L., 2003. Les radicaux libres: une question d'équilibre. Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines DESS IST.

Winkel-Shirley B., 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.*, 126(2), 485-493.

Winkel-Shirley B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol* 5(3), 218-223.

Yamasaki H, Sakihama Y, and Ikehara N., 1997. Flavonoid-peroxydase reaction as detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant physiol.* 115: 1405-1412.

Yoshino K, Tomita I, Sano M, Oguni I, Hara Y, Nakano M., 1994. Effects of long-term dietary supplement of tea polyphenols on lipid peroxide levels in rats. *Media, Pennsylvania* 17(3): 79-85.

Youdim K.A, Spencer JP. E, Schroeter H, and Rice-Even C., 2002. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Review-Biol. Chem*, vol.383: 503-519.

Yousfi H, Tahri EL.H, El Amrani A, Serghini Caid H., 2006: Etude de l'effet antioxydants des anthocyanes de l'Olive, du raisin rouge, du Chou rouge et de la fraise. *Biochimie Substances Naturelles et Environnement*; 452-455

Zhou J., Wang, L, Wang J, Tang, N., 2001. Antioxidative and antitumour activities of solid quercetin metal (II) complexes. *Transition Met. Chem.* 26(1-2), 57-63.

Zubkova E.V and Robaire B., 2004. Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. *Biology of reproduction*, 71: 1002-1008.

ANNEXE

ANNEXE

Tampon (Tris-MgCl₂): 10 ml

Tris.....1.211 g
Mgcl₂..... 0.095 g
pH 9

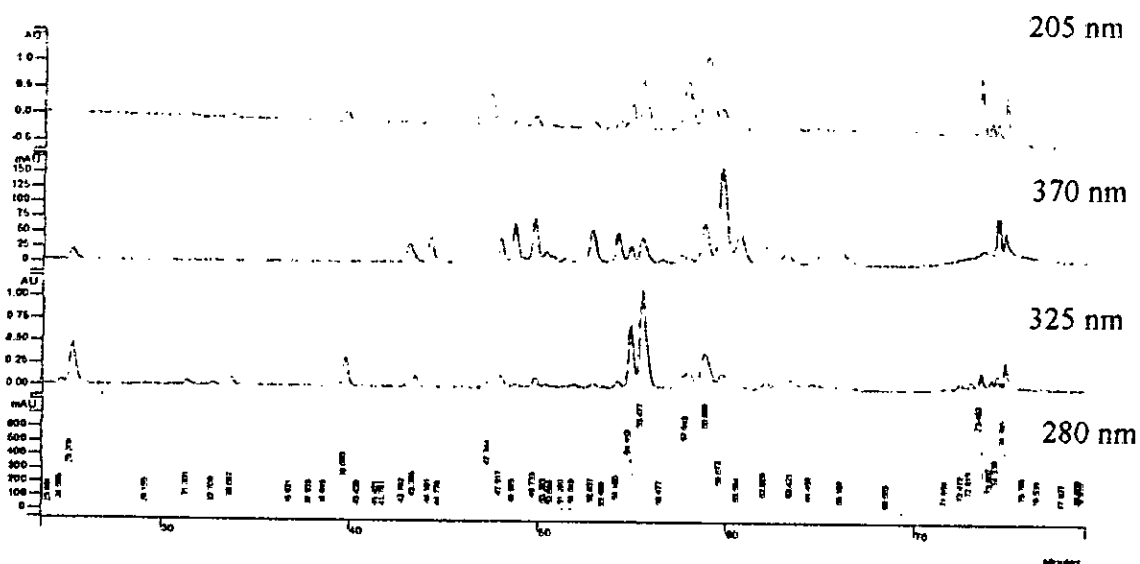
Substrat: L- γ -Glutamyl paranitroanilide: 100 ml

L- γ -Glutamyl paranitroanilide 133.6 mg
Eau distillée.....100 ml

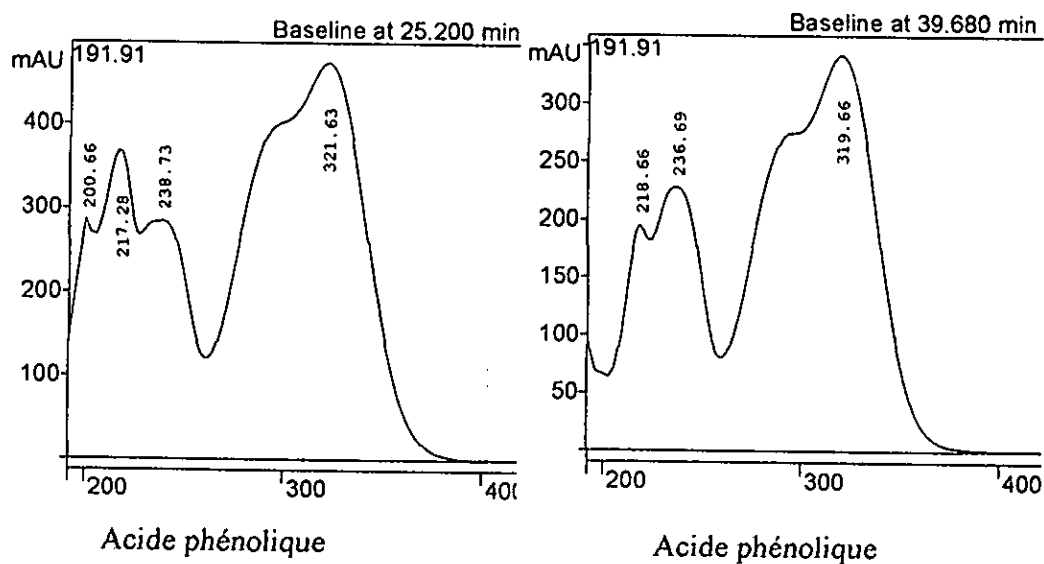
Tampon phosphate: 500 ml

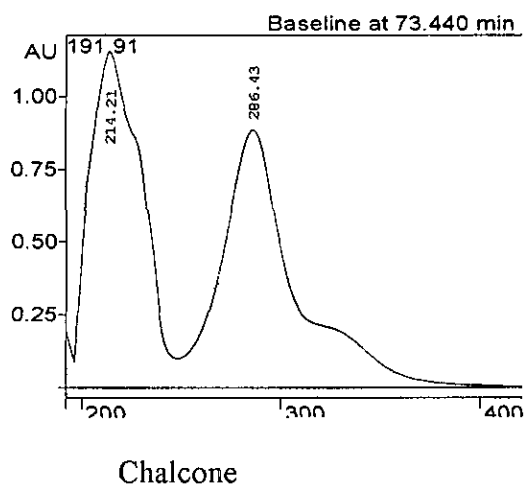
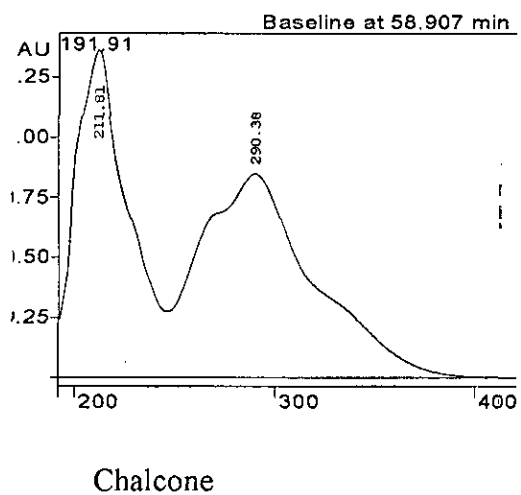
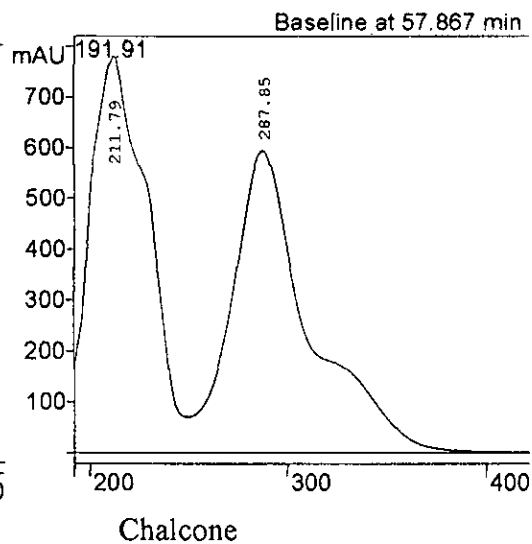
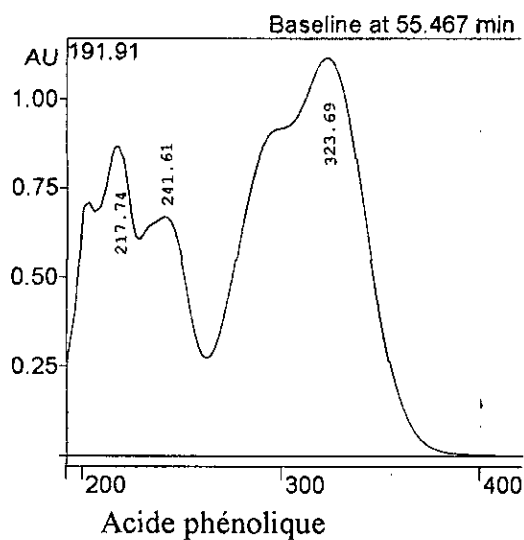
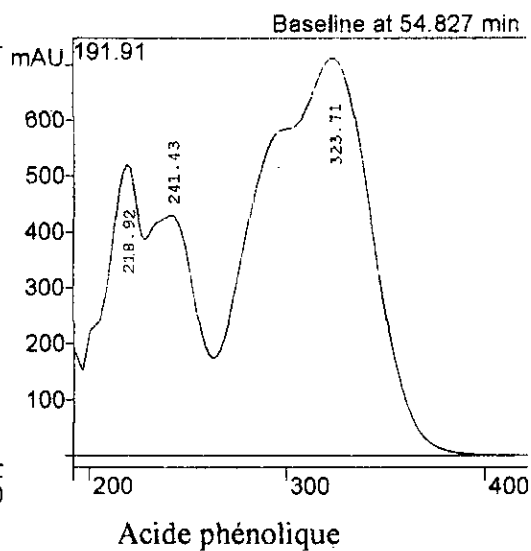
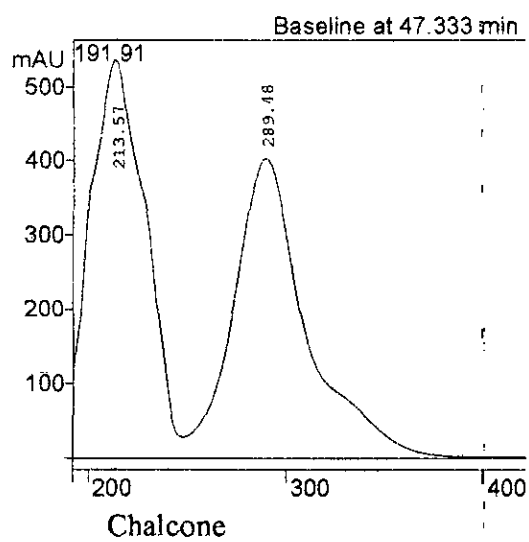
Na₂HPO₄.....7.1 g
NaH₂PO₄..... 6.0 g
pH 8

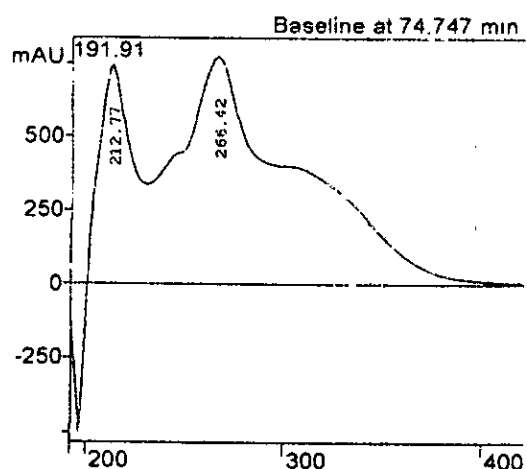
Zoom du profil HPLC de l'EEP



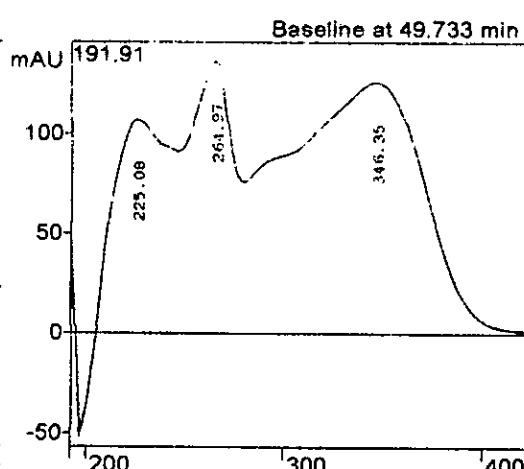
Spectres UV de composés phénoliques de L'EEP



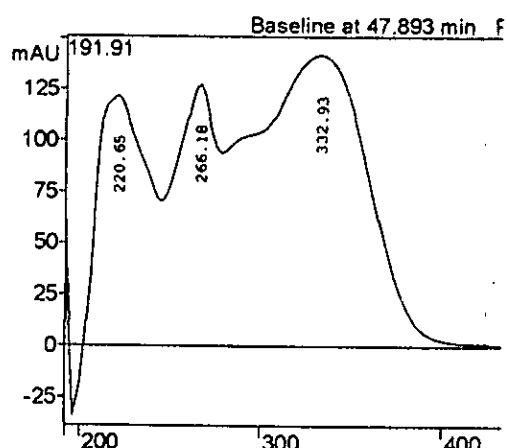




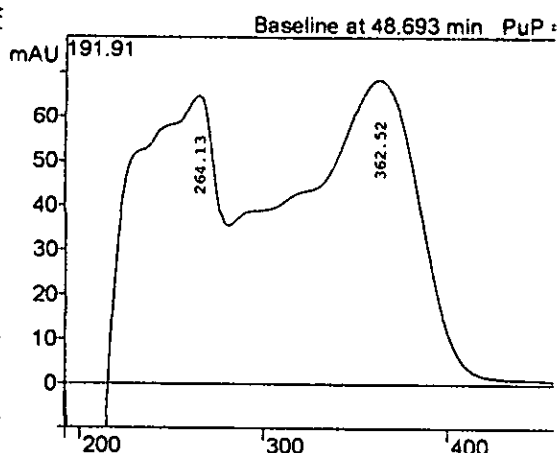
Chalcone



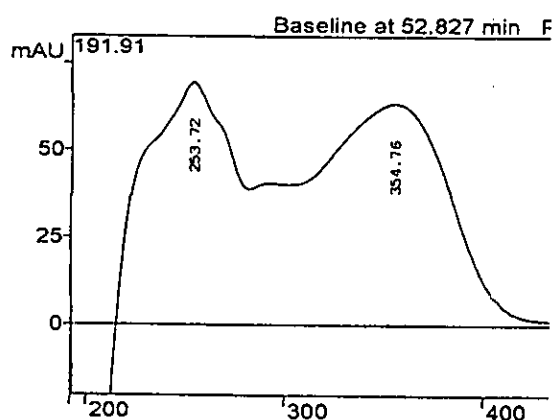
Flavonoïde



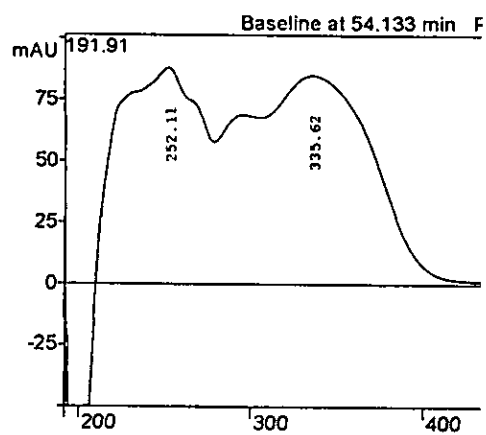
Flavonoïde



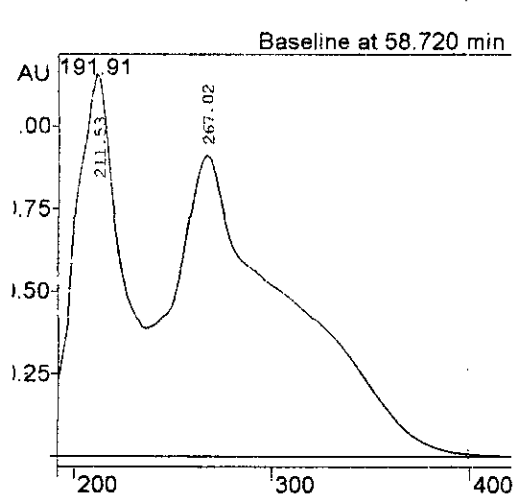
Flavonoïde



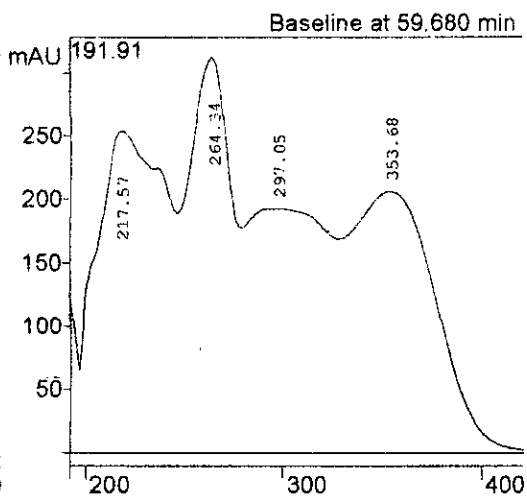
Flavonoïde



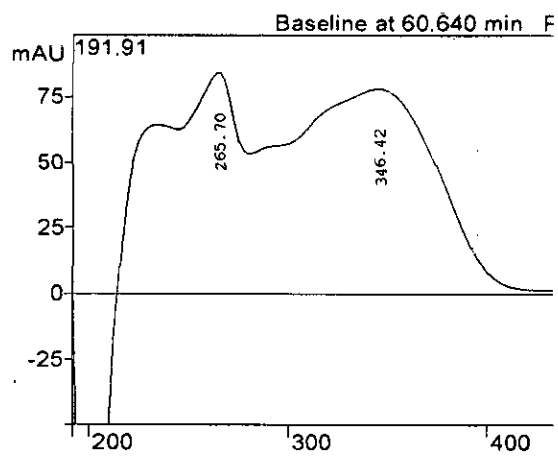
Flavonoïde



Chalcone



Inconnu



Flavonoïde

Protocole d'extraction de propolis

20 g (de propolis) dans 200ml (Ethanol à 95 %)



Macération (15 jours)



Filtration avec du papier filtre ou du coton



Evaporation (évaporateur) extrait brut



Ajouter 200ml (méthanol à 70 %)



Macération (1 nuit)



Evaporation (évaporateur) extrait sec

RESUME

Dans notre recherche sur les composés antioxydants naturels, notre étude a été axée sur l'activité biologique des flavonoïdes de la propolis en déterminant leur efficacité contre la peroxydation lipidique et le piégeage des radicaux libres de la doxorubicine. L'analyse chimique de l'extrait éthanolique de propolis par les méthodes chromatographiques en CCM et CGSM, nous a permis d'identifier les composés flavoniques majeurs.

Aussi, notre étude effectuée chez le rat wistar a montré l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis sur le rein après l'induction d'un stress oxydatif cellulaire par la doxorubicine. En effet, nous avons enregistré un effet toxique de la doxorubicine sur le rein à la dose de 10 mg/kg, à travers l'augmentation de la concentration de MDA dans les cellules rénales, aussi bien qu'une augmentation significative de la créatinine plasmatique et une augmentation très significative γ GT urinaire et plasmatique. Par contre, l'administration des flavonoïdes à la dose de 100 mg/kg avant l'administration de la doxorubicine réduit la toxicité ce qui explique l'effet préventif de la propolis. Ainsi, nous pouvons conclure que les flavonoïdes ont la capacité de protéger la cellule rénale par le piégeage des radicaux libres et l'inhibition de leur production.

Mots Clés : Antioxydants, flavonoïdes, peroxydation lipidique, MDA, créatinine, γ GT, radicaux libres.

SUMMARY

In our search on natural antioxidant compounds, our study was centered on the biological activity of propolis flavonoids while determining their effectiveness against lipid peroxidation and scavenging free radicals of doxorubicin. The chemical analysis of ethanolic extract of propolis flavonoids by chromatography methods in LTC and CGMS us enabled to identify the major flavonoid compounds.

Also, our study carried out in rat wistar has shown preventive effect of ethanolic extract of propolis on kidney cells after doxorubicin induced cellular oxidative stress. Indeed we have noticed a toxic effect of doxorubicin on the kidney at the dose of 10 mg/kg, through the increase of MDA concentration in kidney cells, as well as a significant increase of creatinin in rats plasma and a very significant increase of γ GT in urine and plasma.

On the other hand, the administration of flavonoids at 100 mg/kg dose before administrating doxorubicin has been found to reduce the toxicity what explains the preventive effect of propolis. Thus, we can conclude that flavonoids have the ability to protect the renal cell via scavenging free radicals and inhibiting their production.

Key Words : Antioxidants, flavonoids, lipid peroxidation, MDA, creatinin, γ GT, free radicals.

ملخص

في بحثنا عن المركبات الطبيعية المضادة للأكسدة، تمحورت دراستنا على تقييم النشاط البيولوجي لفلافونويدات الدنج بتحديد لها لبيتها ضد الأكسدة الليبيدية و لسر الجذور الحرة. التحليل الكيميائي للمستخلص الإيثانولي للدنج بطرق الجروما توغرافيا المتمثلة في CCM و CGSM مكنتنا من تحديد المركبات الفلافونويدية الرئيسية.

دراستنا المنجزة أيضا على فئران التجارب تبين التأثير الوقائي للمستخلص الإيثانولي للدنج على خلايا الكلية بعد تحريض إجهاد تأكسدي خلوي بواسطة الدوكسوروبسين. في الحقيقة سجلنا التأثير السام للدوكسوروبسين على الكلية في جرعة 10مغ/كغ من خلال ارتفاع تركيز دي الدهيد مالونيك في خلايا الكلية، ارتفاع محتوى الكرياتينين في بلازما الجرذان، ارتفاع جذ مؤثر للغماسي تي تي في البول وفي البلازما. غير أن إضافة فلافونويدات بتركيز 100مغ/كغ قبل إعطاء الدوكسوروبسين يقلل هذه التسمية مما يؤكد الفعل الوقائي للمستخلص الإيثانولي للدنج. ومنه فإن فلافونويدات لها القدرة على حماية الخلية بواسطة التسمية الأسرة للجذور الحرة وتثبيط إنتاجها.

الكلمات المفتاح: مضادات الأكسدة، فلافونويدات، الأكسدة الليبيدية، دي الدهيد مالونيك، الكرياتينين، غلما جي تي، الجذور الحرة.