

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

Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences De La Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 16/D3C/2019

N° de série : 03/BA/2019



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
Domaine : Biotechnologie et Biologie de l'Environnement
Option : Physio-toxicologie Cellulaire

Présentée et soutenue par :

Bioud Kenza

Intitulée :

**Etude de l'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante
Centaurea choulettiana Pomel contre la néphrotoxicité induite
par le cisplatine chez les souris.**

Devant le jury :

| | | |
|---------------------|---------------------|--|
| Président : | Lalaoui Korichi Pr | Université des frères Mentouri Constantine 1 |
| Directeur: | Benrebai Mouad M.CA | Université des frères Mentouri Constantine 1 |
| Examineurs : | Dhamna Saliha Pr | Université Ferhat Abbas Sétif 1 |
| | Khenouf Seddik Pr | Université Ferhat Abbas Sétif 1 |
| | Zouaghi Youcef M.CA | Université des frères Mentouri Constantine 1 |

Année universitaire : 2018/2019

Dédicace

Je dédie ce travail :

*À ma chère mère, qui m'a soutenue moralement et matériellement
« Tu es précieuse dans ma vie dans la joie comme dans l'ennui ; merci pour tout et que Dieu
te garde pour nous ».*

À l'âme de mon feu cher père.

À mon frère Housseem.

À mon frère Imed et sa femme Roumaïssa.

À mon fiancé Hichem.

À mon amie Wissem que je considère comme sœur.

À mes chères amies : Heyem, Ibtisseem, Maya, Amina Maya

Remerciements

Je remercie Dieu, le tout-puissant, de m'avoir donnée la force et la Patience.

*Je tiens à remercier et à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur **Benrebai M**, maitre de conférence (A) à, l'Université Des frères Mentouri Constantine 1 d'avoir accepté la direction de mon travail et pour sa générosité scientifique.*

*J'adresse mes vifs remerciements aux membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir acceptés l'examen de ce travail, à savoir messieurs et madame **Pr Lalaoui.K., Pr Khennouf .S ,Dr Zouaghi .Y et Pr Dhamna .S***

*Sans omettre professeur **Ameddah S**, de l'université Des frères Mentouri, Constantine 1, pour son aide et ses conseils, et sa générosité scientifique. Qu'elle trouve ici ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements iront au professeur **Maned A**, de l'université Des frères Mentouri, Constantine 1, pour son aide, ses conseils précieux. Qu'il trouve ici ma profonde considération.*

*Un simple merci n'est pas suffisant à ma camarade et sœur **Imen Aissous**, qui m'a toujours soutenue, encouragée et conseillée dans toutes les situations.*

En fin, à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude et mes remerciements.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

1

Première partie : Synthèse bibliographique

I. Le rein

4

1. Anatomie du rein

4

1.1. Le néphron

4

1.1.1. Corpuscule rénale (corpuscule de Malpighi)

5

1.1.1.1. Le glomérule

5

1.1.1.2. La capsule de Bowman

6

1.1.2. Le tubule rénal

6

1.1.2.1. Le tube contourné proximal (TCP)

6

1.1.2.2. L'anse de Henlé

7

1.1.2.3. Le tube contourné distal (TCD)

7

1.1.2.4. Canal collecteur (CC)

7

1.2. Appareil juxta-glomérulaire

7

1.1.3. Fonction du néphron

8

1.1.3.1. La filtration glomérulaire

8

1.1.3.2. La réabsorption tubulaire

8

1.1.3.3. La sécrétion tubulaire

8

2. Fonction du rein

8

II. Néphrotoxicité médicamenteuse

10

1. Les différents types de néphrotoxicité médicamenteuse

10

1.1. Atteinte pré-rénale

10

1.2. La nécrose tubulaire aiguë (NTA)

10

1.3. La néphrite interstitielle aiguë (NIA)

10

1.4. Les néphropathies glomérulaires

10

2. Les Bio -marqueurs de la néphrotoxicité

11

2.1. Définition

11

2.2. Les différents bio-marqueurs de la néphrotoxicité

11

III. Cisplatine

13

| | |
|---|----|
| 1. Historique | 13 |
| 2. Définition | 13 |
| 3. Structure | 13 |
| 4. La pharmacocinétique | 14 |
| 5. La pharmacodynamique | 14 |
| 6. Mécanisme d'action | 15 |
| 7. Mécanismes cellulaires de la néphrotoxicité | 15 |
| IV. Stress oxydatif et système antioxydant | 17 |
| 1. Définition | 17 |
| 2. Sources des espèces réactives oxygénées ROS | 17 |
| 2.1. Sources exogènes | 17 |
| 2.2. Sources endogènes | 17 |
| 3. Les radicaux libres | 18 |
| 3.1. Définition | 18 |
| 3.2. Les radicaux libres oxygénés | 18 |
| 3.2.1. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ | 18 |
| 3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 | 19 |
| 3.2.3. Le radical hydroxyle OH^{\cdot} | 19 |
| 3.2.4. L'oxygène singlet 1O_2 | 19 |
| 3.2.5. L'oxyde nitrique NO^{\cdot} | 19 |
| 3.2.6. Le nitrique dioxyde NO_2 | 20 |
| 4. Les cibles biologiques des ROS | 21 |
| 4.1. Les lipides | 21 |
| 4.2. Les protéines | 21 |
| 4.3. Les acides nucléiques | 22 |
| 5. Stress oxydatif et pathologies | 23 |
| 5.1. Maladie d'Alzheimer | 23 |
| 5.2. Maladie cardiovasculaires | 23 |
| 5.3. Le vieillissement | 24 |
| 5.4. Cancer | 24 |
| 6. Les systèmes de défenses antioxydants | 24 |
| 6.1. Les antioxydants enzymatiques | 24 |
| 6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD) | 24 |

| | |
|--|----|
| 6.1.2. Glutathion peroxydase (GP _x) | 24 |
| 6.1.3. Catalase (CAT) | 24 |
| 6.1.4. Le système thiorédoxine | 25 |
| 6.2. Les antioxydants non enzymatiques | 25 |
| 6.2.1. Le glutathion | 25 |
| 6.2.2. Les oligoéléments | 25 |
| 6.2.2.1. Le zinc | 25 |
| 6.2.2.2. Le cuivre | 25 |
| 6.2.2.3. Le Fer | 25 |
| 6.2.2.4. Le sélénium | 25 |
| 6.2.3. Le β-carotène | 26 |
| 6.2.4. La vitamine C | 26 |
| 6.2.5. La vitamine E | 26 |
| 6.2.6. Les polyphénols | 26 |
| 6.2.7. Les flavonoïdes | 26 |
| V. Le genre <i>Centaurea</i> | 27 |
| 1. Description générale du genre <i>Centaurea sp</i> | 27 |
| 2. Description de l'espèce <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel | 28 |
| 2.1. Classification | 29 |
| 2.2. Métabolites secondaires isolés du <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel | 29 |
| 3. Utilisation en médecine traditionnelle | 29 |
| 4. Quelques activités biologiques | 30 |
| <i>Deuxième partie : Etude expérimentale</i> | |
| I. Matériels et Méthodes | 32 |
| 1. Etude <i>in vitro</i> | 32 |
| 1.1. Matériel biologique végétal | 32 |
| 1.1.1. Préparation de l'extrait | 32 |
| 1.2 Screening phytochimique | 34 |
| 1.2.1. Dosage des polyphénols totaux | 34 |
| 1.2.2. Dosage des flavonoïdes | 34 |
| 1.3. Evaluation de l'activité antioxydante | 34 |
| 1.3.1. Dosage de pouvoir réducteur | 34 |
| 1.3.2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire DPPH • | 35 |

| | |
|--|----|
| 1.3.3. Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique | 35 |
| 2. Etude <i>in vivo</i> | 36 |
| 2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire | 36 |
| 2.1.1. Induction de l'œdème dans la patte par la carragénine | 36 |
| 2.1.2. Estimation du volume de l'œdème de la patte | 36 |
| 2.1.3. Mesure de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) | 36 |
| 2.1.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA) | 37 |
| 2.2. Evaluation de l'activité néphroprotectrice | 37 |
| 2.2.1. Induction et traitement de la néphrotoxicité des souris | 38 |
| 2.2.2. Le sacrifice des animaux | 38 |
| 2.3. Dosage biochimiques | 38 |
| 2.3.1. L'urée | 38 |
| 2.3.2. La créatinine | 39 |
| 2.4. Evaluation du statut oxydatif rénal | 39 |
| 2.4.1. Préparation de l'homogénat et la fraction cytosolique rénale | 39 |
| 2.4.2. La peroxydation lipidique | 39 |
| 2.4.3. Dosage de la catalase | 39 |
| 2.4.4. Dosage du superoxydedismutase (SOD) | 40 |
| 2.4.5. Dosage de la glutathion-S- transférase (GST) | 40 |
| 2.4.6. Dosage de la glutathion peroxydase (GP _x) | 41 |
| 2.4.7. Dosage de glutathion réduit (GSH) | 41 |
| 2.5. Dosage de la myéloperoxydase (MPO) rénal | 41 |
| 2.6. Etude histologique | 42 |
| 2.7 Analyse statistique | 42 |
| II. Résultats | 43 |
| 1. Screening phytochimique | 43 |
| 1.1. Dosage des polyphenols et des flavonoïdes | 43 |
| 2. Evaluation de l'activité antioxydante | 43 |
| 2.1. Pouvoir réducteur | 43 |
| 2.2. Effet scavenger du radical DPPH • | 43 |
| 2.3. Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique | 44 |
| 3. L'activité anti-inflammatoire | 45 |
| 3.1. Activité de la myéloperoxydase (MPO) dans les tissus des pattes | 46 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Taux de malondialdéhyde (MDA) dans les tissus des pattes | 46 |
| 4. Les marqueurs de la fonction rénale | 47 |
| 5. Marqueurs de stress oxydatif rénal | 48 |
| 5.1. La peroxydation lipidique | 48 |
| 5.2. Activité enzymatique de CAT et SOD | 49 |
| 5.3. Activité enzymatique de système glutathion | 50 |
| 6. Niveau de MPO rénal | 51 |
| 7. Examen histopathologique | 52 |
| III. Discussion | 54 |
| Conclusion | 62 |
| Références bibliographique | |
| Résumé | |
| Annexes | |
| Publication | |

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdienne.

ARN : Acide Ribonucléique.

Bcl2: B-cell Lymphoma 2.

BECC : Butanolic extract of *Centaurea choulettiana*

CAT: Catalase.

CC : Canal collecteur.

CDDP : Cis-Dichloro Diammine Platinum (II)

CP : Cisplatine.

DPPH : 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle

DTNB: 5, 5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid).

EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic.

EOA : Espèces Oxygénées Activées.

Ext : **Extrait**

GLD : Glutamate Déshydrogénase.

GPx : Glutathion Peroxydase.

GSH : Glutathion Réduit.

GSSG : Glutathion Oxydé.

GST: Glutathionne-S-Transférase.

H2O2 : Peroxyde D'hydrogène (Eau oxygénée).

IECA : Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine.

Ip : Intra-péritonéale.

IRA : Insuffisance Rénale Aigue..

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien.

MAT : Microangiopathie Thrombotique.

MDA: Malondialdéhyde.

MPO : Myéloperoxydase.

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide.

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

NADP+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate oxydé.

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit.

NIA : Néphrite Interstitielle Aigue.

NTA : Nécrose Tubulaire Aigue.

PM : Poid Moléculaire.

PTT: Purpura Thrombotique Thombocytopénique.

RL: Radical Libre.

ROS: Reactive oxygen species

SHU : Syndrome Hémolytique et Urémique.

SOD: Superoxyde Dismutase.

TBA: Thiobarbiturique acid.

TCA: Tricholor-Acetic-Acid.

TCD: Tube Contourné Distal.

TCP: Tube Contourné Proximal.

TNB: Thionitrobenzoïque.

Vit. E : Vitamine

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau.1 : Les différentes bio-marqueurs de la néphrotoxicité | 11 |
| Tableau 2 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques | 20 |
| Tableau.3 : Teneur en polyphénols totaux et des flavonoïdes | 43 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure.1. Coupe sagittal d'un rein | 4 |
| Figure 2 : Anatomie du néphron et sa localisation dans le rein | 5 |
| Figure3: Représentation schématique d'un glomérule | 6 |
| Figure.4. Le système tubulaire | 7 |
| Figure.5: La structure de la cis-platine [(NH ₃) ₂ Pt(OH) ₂] | 13 |
| Figure.6: Hydrolyse du cis-platine | 15 |
| Figure.7: Origine des ROS et réponse cellulaire | 18 |
| Figure.8: Les différentes Espèces Réactives de l'Oxygène | 20 |
| Figure.9. Schéma des étapes de la peroxydation lipidique | 21 |
| Figure.10. Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire | 22 |
| Figure.11. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules | 23 |
| Figure.12 : Quelques espèces de genre <i>Centaurea</i> (Asteraceae) | 28 |
| Figure.13 : Image de l'espèce <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel | 29 |
| Figure.14 : protocole d'extraction de <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel | 33 |
| Figure.15 : Pouvoir réducteur de l'extrait <i>n-BuOH</i> de <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel | 43 |
| Figure.16 : L'effet scavenger de DPPH [*] de l'extrait <i>n-BuOH</i> de <i>Centaurea choulettiana</i> Pomel et les standards | 44 |
| Figure.17 : l'inhibition de la peroxydation lipidique de <i>C. choulettiana</i> | 45 |
| Figure.18 : L'effet protecteur d'BECC sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat | 46 |
| Figure.19 : Effet anti-inflammatoire de l'extrait <i>n-BuOH</i> de <i>C.choulettiana</i> sur l'activité de la MPO et la production de MDA dans les tissus des pattes des rats | 47 |
| Figure.20: L'effet protecteur de BECC (150mg/kg) sur le dysfonctionnement renal induit par CP (8mg/kg) chez les souris | 48 |
| Figure.21 : L'effet protecteur de BECC (150mg/kg) sur le taux du MDA induit par | 49 |

le CP (8mg/kg)

Figure.22 : L'effet protecteur de BECC (150mg/kg) sur l'activité des enzymes antioxydants : CAT et SOD dans le rein chez des souris traité par CP (8mg/kg) 50

Figure.23 : l'effet protecteur de BECC (150mg/kg) sur le système glutathion dans le rein des souris traité par CP (8mg/kg) 51

Figure.24 : L'effet de BECC (150 mg / kg) sur MPO rénale chez les souris CP (8mg/kg) 52

Figure.25 : Photomicrographie de l'analyse histopathologique du cortex rénal des souris (H&E X400) 53

Introduction

Introduction

Le traitement des cancers repose, actuellement, sur la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicaux, notamment, la chimiothérapie. Parmi les agents chimiothérapeutiques les plus efficaces on cite le cisplatine (**Sweetman, 2002**).

Le cisplatine (cis-dichlorodiamineplatinum (II)), est un médicament anticancéreux synthétique largement utilisé dans le traitement de plusieurs tumeurs malignes comme les carcinomes de l'ovaire, testicules, la vessie, et du col utérin (**Brahmi et al. 2012**). Son utilisation est souvent limitée à cause de ses effets indésirables et graves sur les organes vitaux notamment les reins (néphrotoxicité) (**Sueishi et al., 2002**).

L'administration du cisplatine provoque un déséquilibre de certains marqueurs biochimiques en relation étroite avec les reins (créatinine et urée) (**Rybak et Whitworth, 2005**). D'autre part on constate une diminution du glutathion (GSH) intracellulaire et une baisse de l'activité des enzymes anti-oxydant (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et de la glutathion réductase) tout cela s'accompagne par une augmentation de la concentration du marqueur de la peroxydation lipidique intracellulaires (malondialdehyde) (**Rybak et al.,2000 ; Rybak et Whitworth, 2005 ; Rybak et Ramkumar, 2007**).

Des lésions cellulaires ont été constatées lors de l'administration du cisplatine. Ces lésions cellulaires sont le résultat d'un mécanisme complexe au niveaux du rein (**Dobyan et al., 1980 ; Lieberthal, 1996 ;Pabla et Dong, 2008**). Ces effets sont confirmé chez des patients ayant reçu un traitement par le cisplatine, soit 25 à 35 % qui ont présenté des lésions rénales irréversibles associées à une nécrose tubulaire aiguë (**Arany et al., 2004 ; Yao et al.,2007**).

la néphrotoxicité se manifeste par un important stress oxydatif et une inflammation (**Kuhad et al., 2006 ;Santos et al., 2007**).

La protection du tissu rénal a fait l'objet de l'utilisation de certain nombre d'agents chimioprotecteurs qui ont montré leurs effets antioxydant et anti-inflammatoires dans les différents types de néphrotoxicité induite par le cisplatine. Ainsi, parmi ces agents on cite la glutamine (**Mora et al., 2003**), des compléments alimentaire multivitaminés (**Ajith et al., 2007 ; Maliakel et al., 2008**), le mirtazapine (**Sener et al. , 2012**), la N-acétylcystéine (**Dickey et al., 2008 ; Luo et al., 2008 ; Abdelrahman et al., 2010**), la

vitamine E et le sélénium (**Antunes et al., 2001 ; Naziroglu et al., 2004; Nematbakhsh et Nasri, 2013**).

Actuellement, l'utilisation des produits naturels semble avoir des résultats positifs à l'égard des dommages oxydatifs causés par le CDDP (**Yilmaz et al., 2013**).

L'intérêt de l'exploitation des plantes employées en médecine traditionnelle nous a incités à étudier une plante endémique appartenant à la famille des Asteraceae (**Mabberley, 1987**). On l'occurrence *Centaurea chouletiana* Pomel. Parmi les effets positifs de cette famille on note les effets antidiabétiques (**Kaij-A- Kamb et al., 1992**), anti-rhumatismales (**Gonzalez, 1977**) ,anti-oxydant (**Azzouzi et al., 2016a**), et anticancéreuse (**Arhoghro, 2012**).

L'objectif de notre étude consiste en l'évaluation des effets rénoprotecteur de l'extrait butanolique de la plante *Centaurea chouletiana* Pomel contre les dommages induits par le cisplatine chez les souris.

A cet effet une étude phytochimique s'impose ainsi que l'estimation de l'activité antioxydante , anti-inflammatoire et néphroprotectrice de l'extrait butanolique.

Première partie : Synthèse bibliographique

I. Le rein

1. Anatomie du rein

La coupe frontale d'un rein permet de distinguer, le parenchyme rénal, sous une capsule fibreuse lisse, ce parenchyme rénal est composé de deux parties externe (corticale) et interne (médullaire). La partie médullaire est formée par les pyramides de Malpighi, dont la base s'appuie sur le cortex et le sommet pénètre dans la médullaire profonde. Au niveau du sommet des pyramides se forment les papilles rénales qui sont percées de 15 à 20 orifices correspondant à l'ouverture des tubes collecteurs de Bellini dans les calices sous-jacents.

La partie corticale s'étend de la capsule rénale aux bases des pyramides, et entre les pyramides se trouve les colonnes de Bertin. En périphérie on trouve les tubes urinifères qui prennent naissance au niveau des corpuscules de Malpighi. (Silverthorn, 2007 ; Floege *et al.*, 2010).

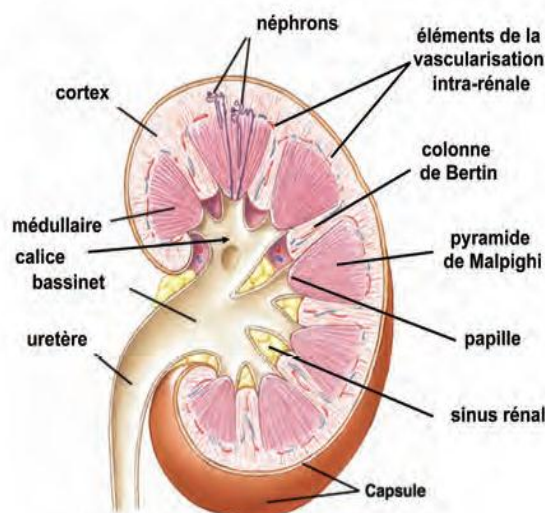


Figure.1.Coupe sagittal d'un rein (Lacour, 2013).

1.1. Néphron

Chaque rein contient plus d'un million de minuscules structures appelées néphrons, ces unités structurales et fonctionnelles des reins assurent la formation de l'urine. (Marieb, 2008).

Le néphron comporte deux parties physiologiquement et anatomiquement distinctes ; une partie filtrante, portant le nom de glomérule, unité de filtration, et une partie tubulaire conduit l'ultra filtrat vers un urètre collecteur (Raymond *et al.*, 2004).

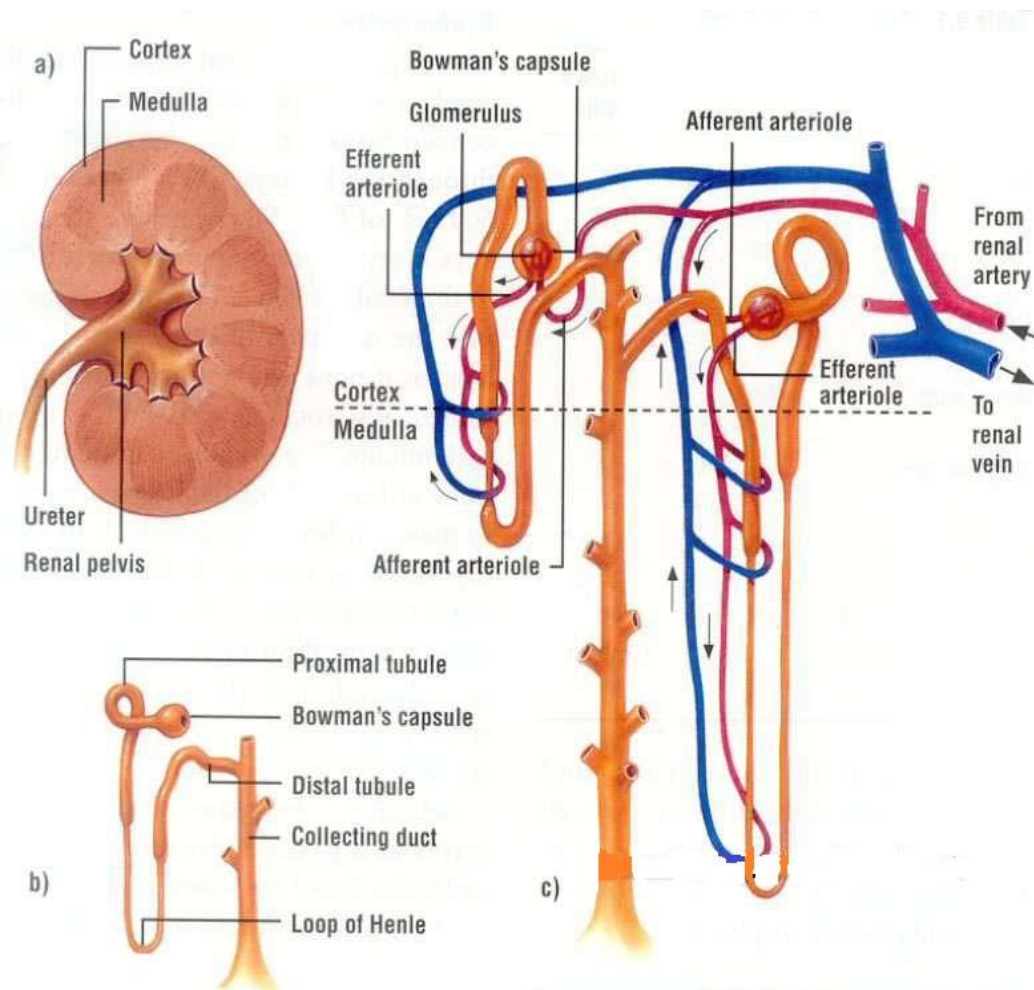


Figure 2 : Anatomie du néphron et sa localisation dans le rein (Raymond *et al.*, 2004).

1.1.1. Corpuscule rénale (corpuscule de Malpighi)

Chaque corpuscule rénal est constitué d'une touffe compacte d'anses capillaires interconnectées appelées glomérules ou capillaires glomérulaires. Chaque glomérule reçoit du sang par une artériole appelée artériole afférente. Le glomérule fait saillie dans une capsule remplie de liquide appelé capsule de Bowman.

Le couple glomérule et capsule de Bowman forme le corpuscule rénal. Quand le sang traverse le glomérule près de 20% du plasma est filtré dans la capsule de Bowman. Le reste quitte le glomérule par l'artériole efférente (Widmaier *et al.*, 2013).

1.1.1.1. Glomérule

Le glomérule est un peloton de capillaires d'où sort par filtration une partie de l'eau et des substances dissoutes contenues dans le sang qui y circulent (Fig 3) (Sherwood, 2006). L'artériole afférente se divise en un réseau capillaire glomérulaire dense, enroulé autour d'une tige mésangiale. Ce réseau capillaire, qui conflue pour donner l'artériole efférente qui sort du glomérule, est contenu dans la capsule de Bowman (Hervé *et al.*, 2001).

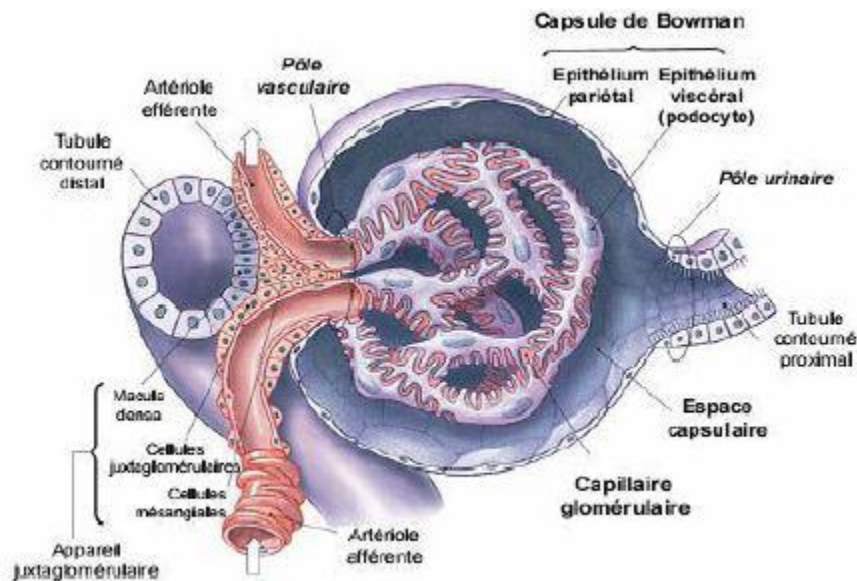


Figure 3: Représentation schématique d'un glomérule (Godin, 2010).

1.1.1.2. Capsule de Bowman

Elle est évasée et en forme de coupe ; elle enveloppe complètement le glomérule (Marieb, 2008). La capsule de Bowman est formée de deux feuillets séparés par une cavité appelée espace de Bowman ou chambre de filtration (Manuelle, 2008). Ces deux couches qui séparent le sang du filtrat glomérulaire sont ; l'endothélium des capillaires et l'épithélium spécialisé de la capsule qui est formé de podocytes recouvrant les capillaires glomérulaires (Ganong, 2003).

1.1.2. Tubule rénal

C'est un conduit long d'environ 6 cm très fin, de 0,1 mm de large où va cheminer le liquide filtré par le glomérule pour déboucher dans un calice jusqu'au bassinnet (Marchal *et al.*, 1994).

On distingue quatre parties : le tubule proximal, l'anse de Henlé, tubule distal, canal collecteur (Blanchard *et al.*, 2008).

1.1.2.1. Tube contourné proximal (TCP)

Le tube contourné proximal fait suite à la capsule de Bowman, c'est le plus long segment du néphron, il est situé uniquement dans la corticale rénale (Hélardot *et al.*, 2006). La partie apicale des cellules porte des microvillosités denses (bordure en brosse) ce qui augmente considérablement la surface de contact des cellules avec le filtrat (Marieb, 2008).

1.1.2.2. Anse de Henlé

L'anse de Henlé fait suite au tube contourné proximal. Cette partie est une véritable épingle à cheveux. Elle est constituée de quatre parties : la branche descendante, la branche fine ascendante, la branche large ascendante (BLA) médullaire et la BLA corticale qui se termine au niveau de la *macula densa* (Gueutin *et al.*, 2011).

1.1.2.3. Tube contourné distal(TCD)

Le TCD fait suite à l'anse de Henlé. Lieu des mécanismes principaux de régulation comme la régulation de l'excrétion de sodium de protons, de calcium ou de l'osmolarité urinaire (Gueutin *et al.*, 2012).

1.1.2.4. Canal collecteur (CC)

Le canal collecteur fait suite au tube contourné distal il comporte au moins 3 types cellulaires qui permettent la régulation de différents systèmes (Gueutin *et al.*, 2011).

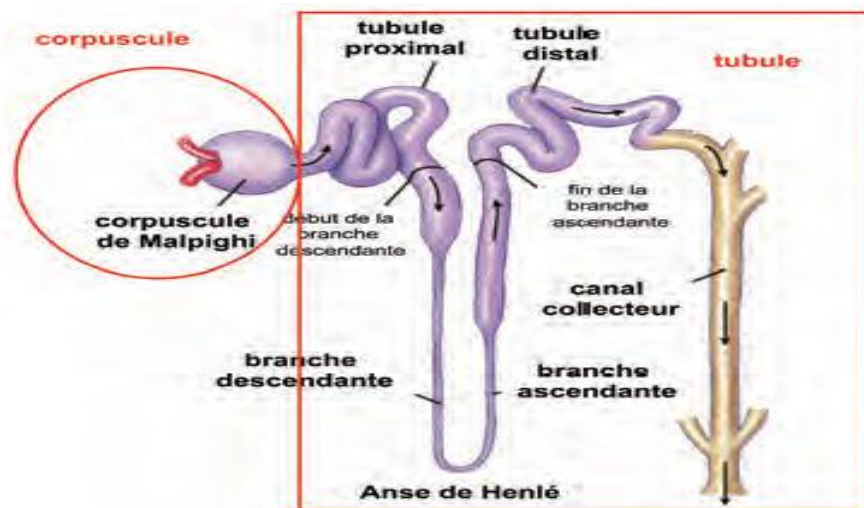


Figure.4. Le système tubulaire (Lacour, 2013).

1.2. Appareil juxta-glomérulaire

L'appareil juxta-glomérulaire est une structure complexe formée par des cellules modifiées du tube contourné distal et de l'artère afférente (Gal et Jeanguiot, 2010).

Il comprend la macula densa et formé par un épaissement localisé d'une vingtaine de cellules de la paroi du tube contourné distal. Le média de l'artériole afférente présente en regard de la macula densa quelques cellules spécialisées, les juxta-glomérulocytes. Au contact de ces cellules et de la macula densa, on trouve des cellules mésangiales situées entre l'artériole afférente et l'artériole efférente (Faller *et al.*, 2004).

1.1.3. Fonction du néphron

1.1.3.1. La filtration glomérulaire

La filtration est le mouvement du sang vers la lumière du néphron. La filtration a lieu uniquement dans le corpuscule rénal, où les parois des capillaires glomérulaires et de la capsule de Bowman sont agencées de manière à permettre le flux net du liquide (**Sherwood, 2006**).

Au passage du sang dans le glomérule, de l'eau et des substances dissoutes, à l'exception des protéines, normalement près de 20% du plasma qui entre dans le glomérule est filtré, la filtration glomérulaire est la 1^{ère} étape de la formation de l'urine (**Silverthorn, 2007**).

1.1.3.2. La réabsorption tubulaire

la réabsorption tubulaire correspond au passage de substances de la lumière tubulaire vers les capillaires péri-tubulaires (**Nguyen et al., 2008**). Elle aboutit à la formation de l'urine définitive ou secondaire dont le volume est de 1 à 2 litres par jours ; le reste de l'urine primitive est réabsorbée par le tubule (**Mellal, 2010**).

1.1.3.3. La sécrétion tubulaire

Le troisième processus rénal de base est la sécrétion tubulaire. Il s'agit du transport sélectif de substances du sang des capillaires péri-tubulaires vers la lumière du tubule (**Sherwood, 2006**). Au cours de la sécrétion tubulaire, une substance quitte les capillaires péri-tubulaires ou les vasa recta pour rentrer dans le filtrat tubulaire. Sur les 180 L de filtrat produits chaque jour par les reins, 99 % sont réabsorbés et retournent dans la circulation sanguine (**Bare et al., 2011**).

2. Fonction du rein

Les reins sont les organes d'élimination les plus importants du corps, ils reçoivent le sang par les artères rénales droite et gauche. Les veines rénales se jettent dans la veine cave inférieure et ramènent le sang qui a traversé le parenchyme rénal. Les urètres représentent les conduits des voies urinaires, qui vont rejoindre la vessie.

Les reins assurent plusieurs fonctions à savoir

- L'élimination des déchets endogènes provenant des différents métabolismes essentiellement des produits azotés, urée (catabolisme des protéides), créatinine, bilirubine; hormones.
- Le maintien de l'homéostasie c.à.d. le maintien de l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique de l'organisme (contrôler les concentrations des électrolytes telles que : sodium, calcium, potassium, chlore, réabsorber des petites molécules telles que : acides aminés, glucose, peptide).

Première partie : Synthèse bibliographique

- La détoxification et élimination de déchets exogènes comme les toxines, les antibiotiques, les médicaments et leurs métabolites.
- La sécrétion de certaines hormones (fonction endocrinienne) telles que :
 - Rénine qui participe à la régulation du volume extracellulaire et ainsi de la pression artérielle (la rénine provoque une augmentation du taux d'angiotensine « globuline synthétisée par le foie »)
 - Erythropoïétine est une glycoprotéine produite dans le stroma rénal qui stimule la maturation des globules rouges dans la moelle osseuse
 - Prostaglandines, calcitriol (vitamine D₃).
- Fonction métabolique : néoglucogenèse (20%). Au cours d'un jeûne prolongé, les reins synthétisent du glucose à partir d'acides aminés et d'autres précurseurs, et le libèrent dans le sang. **(Ramé et Thérond ,2007).**

II. Néphrotoxicité médicamenteuse

De par ses fonctions même de filtration, de concentration et d'élimination, le rein est une cible d'élection pour la toxicité médicamenteuse (**Lord et Ménard, 2002**).

Les médicaments peuvent provoquer une insuffisance rénale aiguë (IRA) par atteinte directe des tubules rénaux (aminosides), par diminution de l'irrigation rénale (anti-inflammatoire non stéroïdienne (AINS), inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), (cyclosporine), ou par néphrite interstitielle aiguë. Ils peuvent aussi provoquer une insuffisance rénale chronique par néphrite interstitielle chronique et nécrose papillaire (AINS) (**Bennett, 1997 ; Matzke et Frye, 1997**).

1. Les différents types de néphrotoxicité médicamenteuse

1.1. Atteinte pré-rénale

L'insuffisance rénale aiguë est dite pré-rénale s'il y a hypoperfusion rénale; le rein ne reçoit pas suffisamment d'apport sanguin. La récupération de la fonction rénale peut être complète si elle est prise en charge suffisamment tôt. Cependant, si elle n'est pas stoppée, l'IRA fonctionnelle peut évoluer vers l'IRA organique (**Leriverend, 2016**).

1.2. La nécrose tubulaire aiguë (NTA)

La nécrose tubulaire aiguë est une atteinte parenchymateuse rénale. Elle est caractérisée sur le plan histo-pathologique par une nécrose des tubules rénaux avec rupture de la membrane basale, la présence de matériel nécrotique dans la lumière tubulaire et un infiltrat tubulo-interstitiel. Les médicaments classiquement impliqués dans ce type d'atteintes sont les aminoglycosides, l'amphotéricine B, le cisplatine et les produits de contraste iodés utilisés en radiologie (**Livio, 2002**).

1.3. La néphrite interstitielle aiguë (NIA)

Les néphrites interstitielles aiguës forment un groupe hétérogène d'affections dont la plupart sont d'origine médicamenteuse. Elles sont caractérisées par une altération de la fonction rénale secondaire à une inflammation du tissu interstitiel et des tubules rénaux. Mais il existe également des formes secondaires à des désordres immunitaires ou à des infections (**Gauthier et Wauters, 2000**).

1.4. Les néphropathies glomérulaires

Les néphropathies glomérulaires désignent des affections au cours desquelles les lésions histologiques touchent principalement les glomérules. Les deux principaux signes glomérulaires sont la protéinurie et l'hématurie, ces signes peuvent être associés à une hypertension artérielle et/ou à une insuffisance rénale (**Niaudet, 2005**).

2. Les Bio -marqueurs de la néphrotoxicité

2.1. Définition

Un bio-marqueur est une substance trouvée dans le sang, les sécrétions ou les tissus et qui fournit une mesure de l'état biologique normal, pathologique ou d'une réponse à un médicament ou une autre substance étrangère. Il existe un vaste choix de bio-marqueurs comprenant des ARN messagers, des protéines, des peptides et des molécules lipidiques. Ils peuvent aussi être classés selon le type d'atteinte qu'ils identifient, fonctionnelle (marqueurs de fonction) ou organique (marqueurs d'intégrité tissulaire). Ces derniers peuvent encore être subdivisés selon la structure touchée, on parlera donc de marqueurs glomérulaires et de marqueurs tubulaires (Gueguen *et al.*, 2012).

2.2. Les différents bio-marqueurs de la néphrotoxicité

Le tableau 1 représente le classement des bio-marqueurs d'atteintes rénales selon leur type, leur fonction ou leur structure rénale cible (glomérulaire, tubulaire. etc...) et leur utilisation expérimentale ou clinique.

Tableau.1 : Les différents bio-marqueurs de la néphrotoxicité (Gueguen *et al.*, 2012).

| bio-marqueur | Fonction ou structure cible | Utilisation expérimentale/clinique |
|--|--|--|
| Marqueurs classiques -créatinine -Urée -électrolytes, glucose, pH et volume urinaire | -La clairance de la créatinine permet d'estimer le débit de filtration glomérulaire -Fonction tubulaire (réabsorption) évaluée même en cas de faible altération | -Marqueur de référence pour classer les atteintes rénales en clinique mais déficit de sensibilité et de spécificité -Utilisation clinique malgré un manque de spécificité |
| Protéines de haut PM -Albumine - Immunoglobuline - Transferrine | -Excrétion élevée de protéines qui indique une altération glomérulaire | -Marqueur d'atteinte aigue ou chronique en clinique (micro-albuminurie), degré d'atteinte glomérulaire |
| Protéines de bas PM - α 1-micro-globuline - β 2-micro-globuline - β –trace protein - retinolbindingprotein | - Marqueurs précoces de dysfonction tubulaire -La BTP et la RBP permettent une meilleure estimation du débit de filtration glomérulaire | - Utilisation pour prévoir si une greffe rénale est nécessaire |

Première partie : Synthèse bibliographique

| | | |
|--|--|---|
| <p>Enzymes</p> <ul style="list-style-type: none"> -N-acétyl-b-glucosaminidase. - phosphatase alcaline | <ul style="list-style-type: none"> - Tubule proximal, papille rénale, glomérule. - Tubule proximal | <ul style="list-style-type: none"> - Utilisation comme marqueur tubulaire peut être limitée car augmentation lors de pathologies glomérulaires chroniques |
| <p>Marqueurs de l'inflammation</p> <ul style="list-style-type: none"> - NGAL - IL-18 | <ul style="list-style-type: none"> - Tubule distal et proximal | <ul style="list-style-type: none"> - Marqueurs de diagnostic et pronostic masqué en cas d'atteinte glomérulaire chronique - Utilisation clinique comme marqueur précoce de dysfonction rénale |

III. Le Cisplatine

1. Historique

Le cisplatine a été synthétisé pour la première fois en 1844 par un chimiste italien (**Peyrone, 1844**) et sa structure chimique identifiée en 1893 par le suisse Alfred Werner. Cependant le composé n'a fait l'objet d'études scientifiques que dans les années soixante lorsque les premières observations de Rosenberg de l'université du Michigan (**Rosenberg et al., 1965**) ont montré que certains produits de l'électrolyse des électrodes de platine pouvaient inhiber la division cellulaire chez *Escherichia coli*. Depuis l'identification du cis- dichloro diammine platinum II comme agent responsable de cette activité, un intérêt a été accordé à l'utilisation combinée des complexes de platine, de palladium ainsi que d'autres métaux nobles dans le traitement du cancer (**Dasari et Tchounuwou, 2014**). La néphrotoxicité du cisplatine apparut très vite comme un facteur limitant et malgré l'instauration de l'hyperhydratation, cet effet indésirable ne fut jamais totalement maîtrisé. Néanmoins, l'hyperhydratation a permis d'augmenter la marge thérapeutique du cisplatine (**Arany et Safirstein, 2003**).

2. Définition

Le cisplatine (CP) est un composé inorganique, divalent, hydrosoluble contenant l'élément platine. Le CP est un médicament antinéoplasique hautement efficace couramment utilisé pour le traitement de diverses tumeurs solides telles que : le cancer de l'estomac, le cancer de l'ovaire, le cancer du poumon, le cancer de la vessie. (**Nasr et Saleh, 2014**).

3. Structure

Le cisplatine est un complexe de métal lourd renfermant un atome central de platine, à l'état oxydé II, Pt^{2+} , entouré de 4 ligands deux ligands chlore, de nature anionique et facilement échangeables par divers nucléophiles, et deux groupements amines inertes non échangeables. Sa formule brute est $Cl_2H_6N_2Pt$.

La molécule est plane et carrée (Fig.5), la disposition cis de la molécule est essentielle à son activité car c'est elle qui lui assure une certaine planéarité. La forme trans est totalement inactive (**Alderden et al, 2006**).

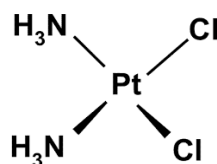


Figure.5: La structure de la cis-platine $[(NH_3)_2Pt(OH)_2]$ (**Alderden et al., 2006**).

4. La pharmacocinétique

Le platine plasmatique est hautement lié aux protéines. Cependant la majorité du cisplatine présente dans la cellule n'est pas liée aux protéines mais localisée dans le cytosol (Barabas *et al.*, 2008).

- **Distribution**

- Faible passage dans le liquide céphalo-rachidien (LCR)
- Liaison avec les protéines plasmatiques: très forte (90-95 %).

- **Elimination**

- Faible élimination biliaire (<10 %).
- Élimination rénale (30 % / 24 heures) par sécrétion tubulaire sous forme métabolisée, d'abord rapide, puis très lente.

-La demi-vie terminale peut être très longue (3 à 8 jours) par contre la demi-vie du platine ultra filtrable est très courte, elle est de l'ordre de 30 minutes (Jacobs *et al.*, 1980).

5. La pharmacodynamique

Le cisplatine est un cytotoxique appartenant à la famille des agents alkylants et forme donc des liaisons covalentes avec l'acide désoxyribonucléique (ADN). Sa structure plane lui permet d'entrer en contact de part et d'autre du plan avec les molécules environnantes. Comme évoqué précédemment, le cisplatine interagit avec des molécules nucléophiles, c'est-à-dire ayant beaucoup d'affinité pour les sites chargés positivement. Ces molécules tendent à former avec lui des liaisons covalentes en entraînant le départ de substituants chlore très mobiles. Le cisplatine est ainsi capable d'interagir avec de multiples constituants cellulaires, comme les phospholipides membranaires, le cytosquelette, l'acide ribonucléique (ARN), l'ADN mitochondrial mais surtout avec l'ADN nucléaire, ce qui constitue le fondement de son activité thérapeutique (Alderden *et al.*, 2006).

Le cisplatine est capable de se lier à toutes les bases de l'ADN, avec une liaison préférentielle pour la position N7 des guanines et des adénines. Ces adduits peuvent être monofonctionnels (liés à une seule base) ou bi-fonctionnels (liés à deux bases) (Eastman, 1986).

Du fait de la liaison importante du cisplatine avec l'ARN et les protéines, certains autres mécanismes d'action conduisant à la mort cellulaire ont été proposés, tels qu'une inhibition de la chaîne respiratoire des mitochondries (Andrews et Albright, 1992), une interaction avec des protéines du cytosquelette comme la tubuline (Peyrot *et al.*, 1986) ou

encore le déclenchement d'un stress au niveau du réticulum endoplasmique (**Mandic et al., 2003**).

Enfin, plusieurs travaux ont rapporté que le dernier événement de la mort d'une cellule sous l'effet des dérivés du platine est l'apoptose, sous le contrôle de gènes comme le p53 ou comme la famille de gènes bcl-2 (**Desoize, 1994 ; Simonian et al., 1997**). Certaines protéines ayant une activité anti-apoptotique ont un rôle potentiel dans la résistance au cisplatine de certaines lignées de cancer du sein (**Li et al., 2001**).

6. Mécanisme d'action

De nombreuses études ont tenté d'élucider le mécanisme d'action du cisplatine (**Rosenberg, 1978 ; Jamieson et Lippard, 1999**). Il a tout d'abord été montré que le complexe reste dans son état neutre tant qu'il circule dans le sang. La concentration en ions chlorures y est relativement forte (100 mM), et empêche l'hydrolyse du composé. Le cisplatine entre ensuite dans la cellule par diffusion passive à travers la membrane, la diminution de la concentration en ions chlorure facilite alors l'hydrolyse en complexes très réactifs (**Bentefrit, 1996**).

Dans un milieu salin riche en ions chlorures tels que le plasma, le cis-platine est inactif et stable, mais dans le cytoplasme des cellules, pauvres en ions chlorures, il se produit une dissociation du cis-platine en ses différents composants.

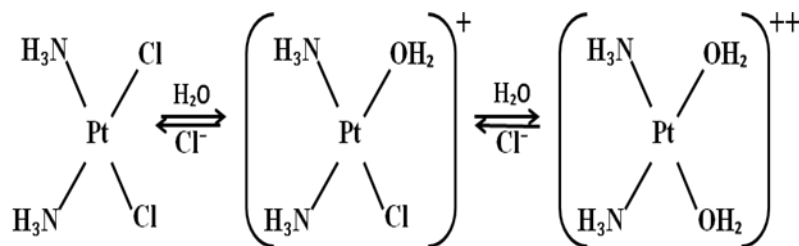


Figure.6: Hydrolyse du cis-platine (**Rosenberg, 1978**).

Les complexes très électrophiles obtenus par l'hydrolyse peuvent réagir avec divers nucléophiles cellulaires, comme l'ARN, les protéines, le glutathion ou la méthionine. Plus particulièrement le platine se fixe alors de façon covalente sur l'ADN au niveau des bases de la guanine et les liaisons intra et inter brins qu'il provoque empêchant la réplication de l'ADN lors du cycle cellulaire (**Scott et Bradbury, 1994**).

7. Mécanismes cellulaires de la néphrotoxicité

Dans le plasma, où la concentration en chlore est d'environ 103 mM, le cisplatine reste électriquement neutre puisqu'il conserve ses groupements chlorures. La concentration

Première partie : Synthèse bibliographique

intracellulaire en chlore étant d'environ 4 mM, le déplacement des deux groupements chlorures par des molécules d'eau est favorisé, formant ainsi une molécule hydratée plus toxique à cause des charges positives qui réagissent avec les sites nucléophiles. Ces charges positives sont responsables à la fois de l'activité antinéoplasique et de la néphrotoxicité du cisplatine.

Le cisplatine est filtré librement par le glomérule à cause de son faible poids moléculaire (300,01 g/mol) et à l'absence de charges (**Weinberg, 1993**). Il a été démontré que les cellules épithéliales du tubule proximal peuvent accumuler le cisplatine jusqu'à 5 fois le niveau sérique grâce en partie à un processus de transport actif (**Kuhlmann et al., 1997**). Les dégâts rénaux sont présents dans les tubules proximal, distal et collecteur alors que le glomérule est relativement bien préservé.

La néphrotoxicité du cisplatine s'accompagne de divers changements structuraux au niveau du tubule proximal (nécrose tubulaire, perte des villosités, altérations cellulaires dans le nombre et la taille des lysosomes et vacuolisation des mitochondries). Ces changements structuraux s'accompagnent de changements fonctionnels (**Alderden et al., 2006 ; Kuhlmann et al., 1997**) faisant appel à des mécanismes physiopathologiques primaires comme (inhibition de la synthèse des protéines et déplétion du glutathion), causant ainsi des séquelles secondaires (altérations au niveau des mitochondries, inhibition du transport membranaire et peroxydation lipidique).

L'inhibition de la synthèse des protéines est le phénomène biochimique le plus précoce à la suite d'un traitement par le cisplatine. Ce médicament agirait sur le nucléole et causerait une diminution de la formation des ribosomes inhibant ainsi la synthèse protéique.

Une autre explication serait possible, est que le cisplatine interfère avec l'assemblage des sous-unités 48S et 60S des ribosomes conduisant à une diminution des protéines de transport et à certains dommages mitochondriaux (**Kuhlmann et al., 1997**).

Le cisplatine interagit avec le radical sulfhydryl des protéines et avec le glutathion pour former des adduits stables résultant d'un dysfonctionnement de plusieurs protéines membranaire et cytoplasmique, exemple, les transporteurs de Na-phosphate et Na-glucose, les glutathion-S-transférase, réductase et peroxydase qui voient leur activité diminuée (**Kuhlmann et al., 1997**), à cela s'ajoute, la diminution du glutathion (GSH) disponible pour éliminer les radicaux libres qui mène à leur augmentation et à la peroxydation des lipides (**Kuhlmann et al., 1997 ; Baliga et al., 1999**).

IV. Stress oxydatif et système antioxydant

1. Définition

Le stress oxydant correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire. Il se définit comme étant le résultat d'un changement du rapport radicaux libres et systèmes de défense antioxydant dont dispose la cellule, menant à des dégâts souvent irréversibles (**Pincemail et al., 2002**).

2. Sources des espèces réactives oxygénées ROS

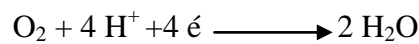
Les ROS sont produits dans l'organisme par de nombreux mécanismes aussi bien exogènes qu'endogènes (**Halliwell, 2006**).

2.1. Sources exogènes

L'organisme humain est souvent soumis à l'agression de différents agents chimiques capables de donner naissance à des espèces réactives oxygénées. Les sources exogènes peuvent être représentées par des facteurs environnementaux (**Priyadarsini, 2005**).

2.2. Sources endogènes

L'une des sources endogènes majeures des ROS est la chaîne respiratoire mitochondriale. Cette production résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire suivant la réaction catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial (**Marfak, 2003**).



D'autre part l'inflammation est également considérée comme une source importante de ROS. Qu'une grande quantité de ROS est produite par les cellules immunitaires, plus particulièrement les cellules phagocytaires. Ces cellules produisent des $\text{O}_2^{\bullet-}$, des OH^\bullet et du H_2O_2 pour éliminer les microorganismes pathogènes et les cellules cancéreuses. En effet, afin d'assurer la défense de l'organisme, les phagocytes utilisent le phénomène d'explosion oxydative, qui consiste à l'activation du complexe NADPH oxydase. Cette enzyme utilise l'oxygène pour produire des $\text{O}_2^{\bullet-}$ en grande quantité au niveau de la membrane cytoplasmique et ceux-ci sont libérés à la face externe de cette membrane (**Favier, 2006 ; Salganik, 2001**).

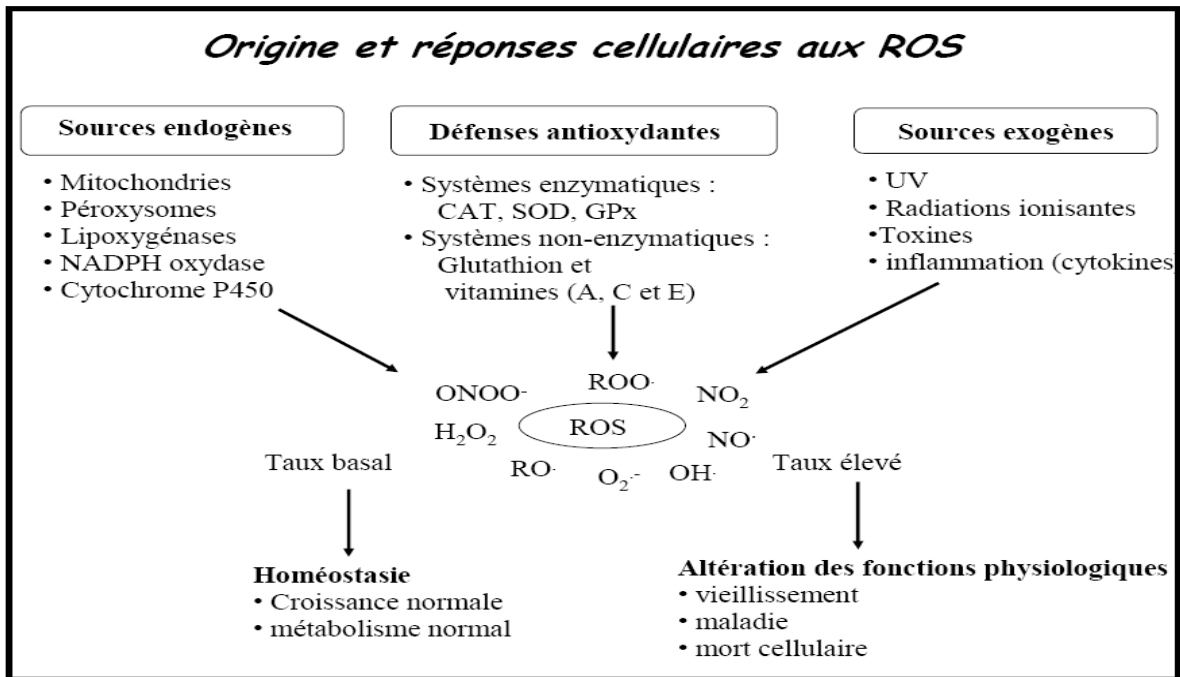


Figure.7: Origine des ROS et réponse cellulaire (Petropoulos, 2003).

3. Les radicaux libres

3.1. Définition

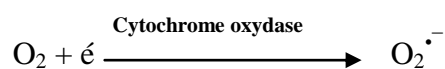
Les radicaux libres peuvent être définis comme étant des molécules ou atomes ayant un seul électron non apparié sur une orbite externe. Cette configuration instable crée de l'énergie qui est libérée par des réactions avec des molécules adjacentes, telles que des protéines, des lipides, des hydrates de carbone et des acides nucléiques. La majorité des radicaux libres qui endommagent les systèmes biologiques sont des radicaux libres d'oxygène, plus généralement appelés "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). (Rahman, 2007).

3.2. Les radicaux libres oxygénés

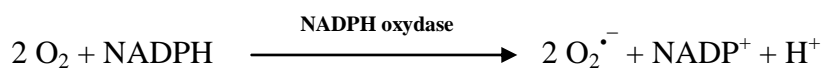
3.2.1. L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$

L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (Harman, 2000).

Le cytochrome oxydase qui se trouve dans la mitochondrie peut également catalyser cette réaction selon l'équation suivante :

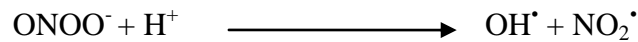


L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ peut aussi se former grâce à la NADPH oxydase présente au niveau des cellules vasculaires endothéliales (Gardés- Albert *et al.*, 2003).



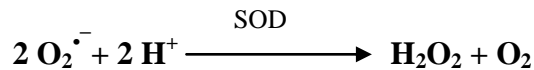
L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ joue un rôle très important dans la génération d'autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle OH^{\cdot} , et l'oxygène singlet O_2^{\cdot} (Stief, 2003).

L'anion superoxyde est capable de réagir avec l'oxyde nitrique pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) qui est capable de donner par la suite des composés très toxiques comme le radical hydroxyle et le dioxyde nitrique (Halliwell, 1997).



3.2.2. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2

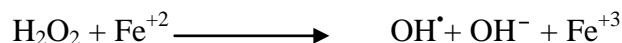
Il n'a pas d'électrons non appariés et n'est donc pas un radical. Le peroxyde d'hydrogène se forme par la dismutation du radical superoxyde, catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) selon la réaction suivante (Pal Yu, 1994) :



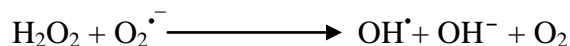
Le peroxyde d'hydrogène est un produit plus stable que les produits qui lui donnent naissance, ainsi sa réactivité est moins importante. La nature non ionique de cette molécule lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires et par conséquent diffuser facilement d'où une possibilité d'action à distance (Halliwell, 1997).

3.2.3. Le radical hydroxyle OH^{\cdot}

Le radical hydroxyle OH^{\cdot} est le radical le plus dangereux dans l'organisme. Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique. Il est formé par la dégradation du (H_2O_2) en présence de métaux de transition sous leur forme réduite comme le fer. Ainsi, le (H_2O_2) associé au fer ferreux conduit à la réaction de Fenton suivante :



Le (H_2O_2) peut également réagir avec ($O_2^{\cdot-}$), aboutissant là encore à la production du (OH^{\cdot}), ce mécanisme réactionnel dénommé réaction *d'Haber-Weiss* (Sorg, 2004).



3.2.4. L'oxygène singlet 1O_2

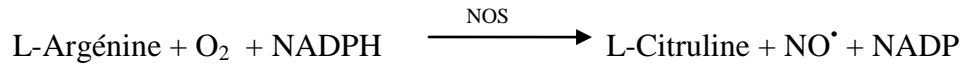
La forme excitée (O_2) est souvent assimilée à un radical libre en raison de sa forte réactivité, il réagit avec les macromolécules biologiques (ADN, Protéines, etc....) (Borg et Reeber, 2008).

3.2.5. L'oxyde nitrique NO^{\cdot}

Le monoxyde d'azote NO^{\cdot} est un radical avec un électron non apparié, il est formé par l'action du NO synthétase sur L-arginine (Fang *et al.*, 2002).

Première partie : Synthèse bibliographique

L'oxyde nitrique lui-même moins réactif que les autres radicaux libres, mais sa surproduction dans des conditions spécifiques capable de provoquer la déplétion des principaux antioxydants au niveau du plasma, tel que l'acide ascorbique et l'acide urique. Ce radical est capable d'entamer la peroxydation lipidique (**Halliwell, 1997**).



3.2.6. Le nitrique dioxyde NO₂

Le dioxyde d'azote (NO₂[•]) est formé à partir de la réaction du radical peroxy avec NO. Le (NO₂[•]) est un puissant déclencheur de la lipide peroxydation par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés (**Fang et al., 2002**).

Tableau 2 : Les principales espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (**Bartosz, 2003**).

| Espèces réactives de l'oxygène radicalaires | | Espèces réactives de l'oxygène non radicalaires | |
|---|------------------------------|---|-------------------------------|
| Nom | Formule chimique | Nom | Formule chimique |
| anion superoxyde | O ₂ ^{•-} | Le peroxyde d'hydrogène | H ₂ O ₂ |
| Le radical hydroxyle | OH [•] | Nitrique dioxyde | NO ₂ [•] |
| Oxyde nitrique | NO [•] | l'oxygène singlet | ¹ O ₂ |

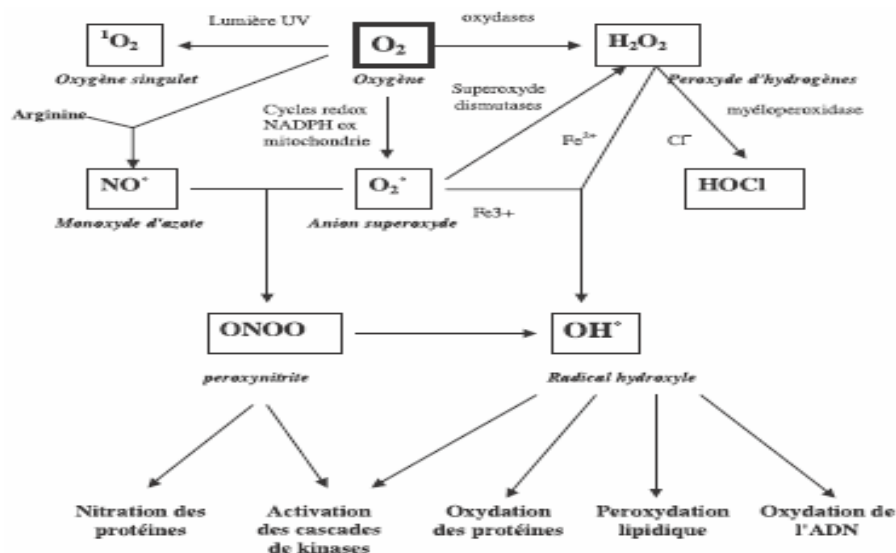


Figure.8: Les différentes Espèces Réactives de l'Oxygène (**Favier, 2003**).

4. Les cibles biologiques des ROS

4.1. Les lipides

Les cibles privilégiées de l'attaque par le radical hydroxyle sont les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés.

La peroxydation lipidique se déroule en trois phases. Une phase d'initiation qui implique l'attaque du radical hydroxyle lequel est capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, il abouti à la formation d'un radical diène conjugué, ce radical réagit avec une molécule d'oxygène et donne un radical peroxy. Ensuite ce radical peut réagir avec un autre acide gras polyinsaturé et forme un hydroperoxyde (c'est la phase de propagation). Ces hydroperoxydes peuvent subir plusieurs modes d'évolution, être réduits et neutralisés (c'est la phase de terminaison) par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidique des membranes, ou continuent à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes. Parmi ces aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, on a le malondialdéhyde ou l'hydroxynonanal, (fig.9), (Favier, 2003).

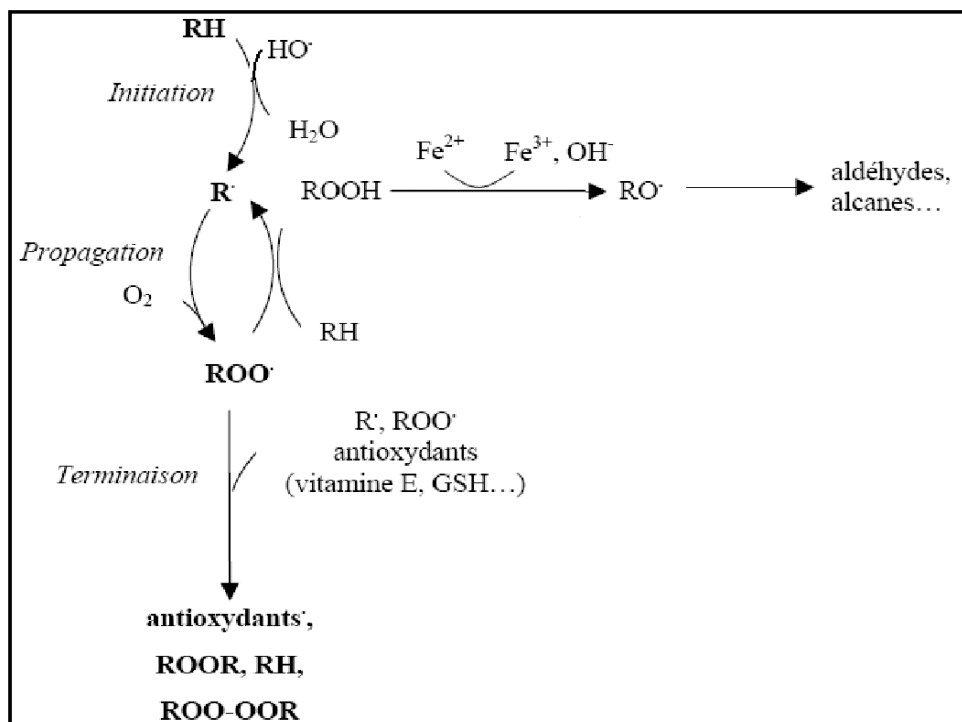


Figure.9. Les étapes de la peroxydation lipidique (Moussaoui, 2010).

4.2. Les protéines

Les protéines qui comportent une fonction thiol (SH), (l'histidine, la proline, l'arginine et la lysine) sont les plus sensibles aux attaques radicalaires. Toute attaque radicalaire provoque l'oxydation avec pour conséquence la formation des ponts bi-tyrosine intra- et inter-

Première partie : Synthèse bibliographique

chaînes, des clivages de chaînes peptidiques et l'apparition de groupements carbonylés. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles biologiques (perte d'activité enzymatique, non-reconnaissance d'un récepteur par un ligand). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng *et al.*, 2007).

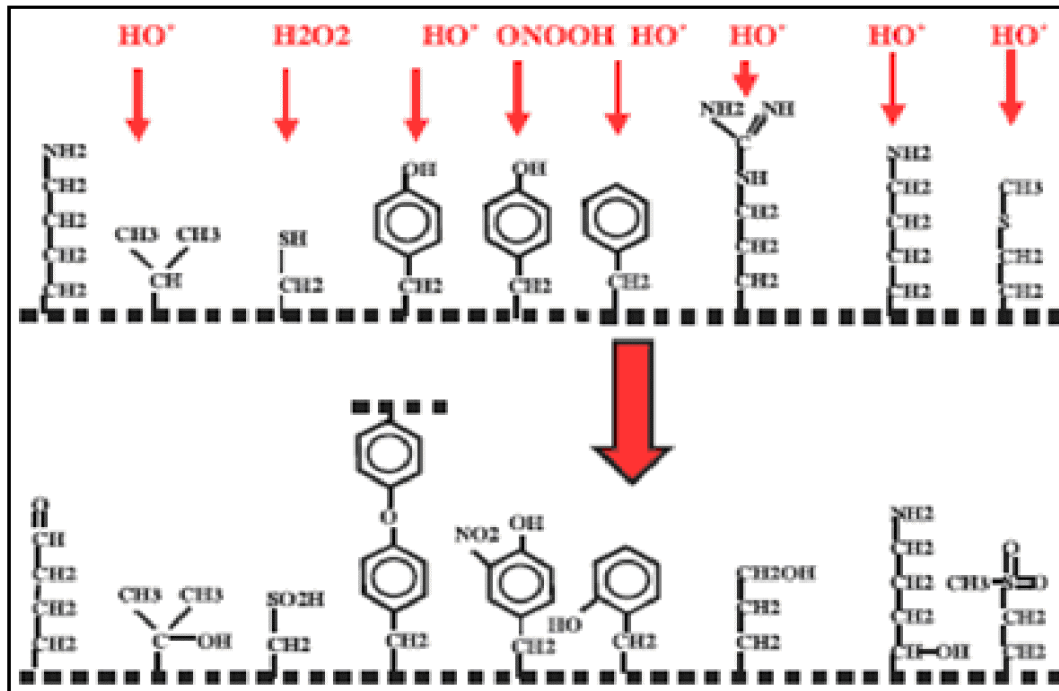


Figure.10. La nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

4.3. Les acides nucléiques

L'ADN est une cible privilégiée pour l'attaque radicalaire. Au minimum, cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH• peuvent être générées, parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténares, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines (Favier, 2003 ; Cadet *et al.*, 2002).

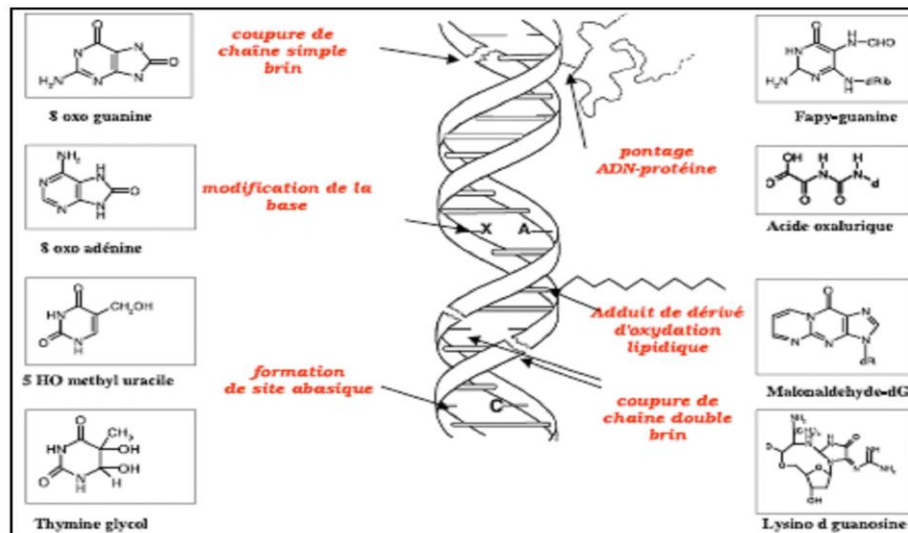


Figure.11. Les lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

5. Stress oxydatif et pathologies

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications de l'évolution. (Sohal *et al.*, 2002).

Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement accéléré. Il est admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, et la maladie d'Alzheimer (Montagnier *et al.*, 1998).

5.1. Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative conduisant progressivement et irréversiblement à la perte de la mémoire (amnésie) et des fonctions cognitives (aphasie, apraxie et agnosie) (Delacourte *et al.*, 2007). Les principaux radicaux libres intervenant dans cette maladie sont le radical hydroxyl, le peroxy-nitrite ainsi que ses précurseurs, le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde, et le peroxyde d'hydrogène (Desport, et Couratier, 2002).

5.2. Maladies cardiovasculaires

L'oxydation des lipides est un facteur favorisant la survenue de maladies cardiovasculaires (Defraigne et Pincemail, 2008). L'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, concourent fortement à l'altération des fonctions vasculaires, et aboutissent aux accidents cardiovasculaires exemple l'infarctus du myocarde, hémorragies cérébrales, angine de poitrine, artérites (Baudin, 2006).

5.3. Le vieillissement

Le vieillissement s'accompagne d'une altération globale d'un ensemble de fonctions physiologiques ainsi que d'une susceptibilité plus élevée face à différentes maladies. La théorie radicalaire explique ces altérations par l'accumulation de molécules oxydées et par les conséquences de cette oxydation comme l'apparition de mutations, la carbonylation des protéines, l'oxydation des lipides. Il a été observé au cours du vieillissement une élévation des marqueurs biologiques du stress oxydant tel que la 8-oxo-guanine, le malondialdéhyde (MDA) et les isoprostanes (**Barouki, 2006**).

5.4. Cancer

Les radicaux libres intervenant dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogènes, provoquant les lésions de l'ADN, amplifiant les signaux de prolifération et inhibant les antioncogènes comme la protéine p53 (**Favier, 2006**).

6. Les systèmes de défenses antioxydants

Les antioxydants ont été prouvés pour jouer un rôle important dans la régulation d'une vaste gamme physiologique et des processus pathologiques, ils contribuent principalement à la protection des cellules et des tissus contre les effets délétères des ROS (**Barber et Harris, 1994**).

Les antioxydants ont pour rôle d'inhiber la production, de limiter la propagation ou de détruire les ROS (**Sies, 1997; Favier, 2003**).

6.1. Les antioxydants enzymatiques

6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

C'est une enzyme qui assure l'élimination de l'anion super-oxyde par dismutation. Il existe deux types de superoxyde dismutase, l'une localisée dans le cytosol contient du cuivre et du zinc (Cu,Zn-SOD), l'autre située dans les mitochondries contenant du manganèse (Mn-SOD) (**Gardès-Albert et al., 2003**).

6.1.2. Glutathion peroxydase (GP_x)

La GP_x est une protéine séléno-dépendante (cinq isoformes) qui réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). Son rôle principal est d'éliminer les peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (**Haleng et al., 2007**).

6.1.3. Catalase (CAT)

C'est une enzyme qui est présente dans le peroxysome des cellules aérobies, capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (**Rahman, 2007**).

6.1.4. Le système thiorédoxine

La thiorédoxine est l'antioxydant majeur responsable du maintien des protéines à l'état réduit, qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique (**Haleng *et al.*, 2007**).

6.2. Les antioxydants non enzymatiques

6.2.1. Le glutathion

Le glutathion est un tri-peptide, dont les propriétés réductrices et nucléophiles jouent un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques (**Gérard-Monnier et Chaudière, 1996**). Le glutathion (GSH) joue un rôle unique et essentiel dans la préservation des formes actives de divers antioxydants de faible taille (vitamines C, E, ubiquinone et, polyphénols) (**Defraigne et Pincemail, 2008**).

6.2.2. Les oligoéléments

6.2.2.1. Le zinc

Cet oligoélément est l'un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège également les groupements thiols des protéines. Le zinc peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (**Mezzetti *et al.*, 1998**).

6.2.2.2. Le cuivre

Cet oligoélément est l'un des cofacteurs essentiels de la SOD, il joue, en tant que métal dit de transition, un rôle important dans le déclenchement des réactions conduisant à la formation d'espèces oxygénées activées, par ses propriétés anti-oxydantes (**Del Corso *et al.*, 2000**).

6.2.2.3. Le Fer

Le fer joue un rôle de catalyseur dans la formation des EOA, en situation physiologique, il n'est pas présent sous une forme libre responsable de cet effet néfaste. Un grand nombre de travaux suggèrent l'implication des métaux de transition comme le fer ou le cuivre dans le développement de l'athérosclérose (**Combs, 2001**).

6.2.2.4. Le sélénium

Le sélénium joue un rôle clé dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire. Cette fonction est due à sa présence dans le site actif des glutathions peroxydases séléno-dépendantes et à l'activité biologique antiradicalaire des sélénoprotéines (**Roussel et Ferry, 2002**).

6.2.3. Le β -carotène

Le β -carotène est cependant le chef de file des caroténoïdes, également appelé provitamine A car, après hydrolyse hépatique, il donne naissance à deux molécules de vitamine A (**Haleng et al., 2007**).

6.2.4. La vitamine C

L'acide ascorbique est un antioxydant hydrosoluble important et puissant (**Rahman, 2007**), est un désactivateur de l'oxygène singlet, il élimine aussi l'oxygène moléculaire, il est aussi un donneur d'hydrogène aux radicaux lipidiques et aux radicaux tocophéroxyles pour régénérer le tocophérol (**Cillard et Cillard, 2006**).

6.2.5. La vitamine E

La vitamine E désignée sous un terme générique l'ensemble des différents tocophérols, et des différents tocotriénols (**Stahl et Sies, 1997**). D'un point de vue biochimique, la vitamine E existe sous huit formes différentes, 4 tocophérols (α - β - γ - δ) et 4 tocotriénols (α - β - γ - δ). Ils diffèrent les uns des autres par la position des groupes méthyles sur le cycle aromatique. L' α -tocophérol est biologiquement la forme la plus active et la plus efficace, il s'insère au sein des membranes cytoplasmiques (phospholipides) riches en acides gras polyinsaturés (**Burton et al., 1998**). Le rôle essentiel de la vitamine E est de capter les radicaux peroxydes lipidiques qui propagent les chaînes de peroxydation (**Gardès-Albert et al., 2003**).

6.2.6. Les polyphénols

Les polyphénols, sont des molécules de structures variées (**Hennebelle et al., 2004**), et ce sont, par ailleurs, les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils sont classés en flavonoïdes, anthocyanes, tanins et stilbènes. (**Derbel et Ghedira, 2005**).

Ce sont d'excellents piègeurs des ROS et de très bons chélateurs de métaux de transition comme le cuivre et le fer (**Haleng et al., 2007**).

6.2.7. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et sont couramment consommés dans des fruits, légumes et boissons telles que le vin et le thé (**Ghedira, 2005**). Les flavonoïdes sont des agents antioxydants capables de piéger les radicaux libres (RL). Les flavonoïdes inactivent les RL grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif (**Derbel et Ghedira, 2005**).

V. Le genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea* appartenant à la famille des Asteraceae, contient plus de 700 espèces réparties dans le monde. En Algérie, il est représenté par 45 espèces (**Azzouzi et al., 2016_a**), parmi ces espèces, *Centaurea choulettiana* Pomel..

1. Description générale du genre *Centaurea sp*

Les centaurees sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, à feuilles alternées. Capitules multiflores à fleurs homomorphes ou dimorphes. Involucre ovoïde ou globuleux à bractées imbriquées sur plusieurs rangs. Bractées soit homomorphes soit dimorphes, soit polymorphes. On y distingue pour la classification les bractées extérieures (ou inférieures) plus courtes; les bractées moyennes (dont la morphologie sera particulièrement exploitée); les bractées internes ou supérieures. Les bractées sont surmontées ou non par un appendice différencié. Cet appendice, très utilisé en systématique, peut être scarieux ou non, penné, pectiné, triangulaire, décurrent (se prolongeant sur le corps de la bractée), armé, constitué par une ou plusieurs épines, etc. Réceptacle plan ou subplan, garni de soies abondantes. Fleurs marginales généralement neutres et souvent rayonnantes; celles du disque hermaphrodites et plus au moins irrégulières. Anthères sagittées à la base. Style à branches courtes. Akènes oblongs ou ovoïdes, lisses, à hile latéral, profond, barbu ou non. Aigrette soit absente, soit présente et simple ou double, persistante ou caduque (**Quezel et Santa, 1963**).



Figure.12 : Quelques espèces de genre *Centaurea* (Asteraceae) (Azzouzi, 2017).

2. Description de l'espèce *Centaurea choulettiana* Pomel

C'est une plante vivace à bractées moyennes (au moins les moyennes du type palmé), très large (1cm) et très court (5-6 mm), scarieux et cilié de part et d'autre d'une épine courte, acaule ou subacaule. Les fleurs jaunes ou jaunâtres et les akènes soit sans aigrette soit à aigrette double (Azzouzi, 2017).



Figure.13 : Image de l'espèce *Centaurea choulettiana* Pomel (Azzouzi, 2017).

2.1. Classification de la plante

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Astérales

Famille : Asteraceae

Sous-famille : Tubiflores

Tribu : Cynarées

Genre : *Centaurea*

Espèces : *Centaurea choulettiana* Pomel (Quezel et Santa, 1963).

2.2. Métabolites secondaires isolés du *Centaurea choulettiana* Pomel

L'huile essentielle de *C. choulettiana* Pomel, récoltée dans la région de M'Sila, était caractérisée par la présence principale de phtalate (18,38%), de β -eudesmol (6,8%), de 1,5-époxyvalial-4 (14) -ène (6,6%), l'oxyde de caryophyllène (4,28%), le tricosane (3,31%), l'épi- α -eudesmol (3,08%) et l'heptacosane (3,06%). Il a été rapporté que les hydrocarbures monoterpènes et les acides gras étaient totalement absents dans cette huile. L'étude comparative des principales substances volatiles identifiées chez les espèces de *Centaurea* a montré que *C. choulettiana* avait une composition d'huile unique (Azzouzi *et al.*, 2016_b).

3. Utilisation en médecine traditionnelle

Plusieurs espèces du genre *Centaurea* ont été utilisées en médecine populaire. Parmi les propriétés thérapeutiques reconnues chez les espèces de ce genre nous pouvons citer :

- Propriétés thérapeutiques de certains symptômes comme la fièvre, et certaines pathologies comme le diabète (**Font Quer, 1995**).
- Un pouvoir antidiabétique (**Kay-A-Kamb et al., 1992**).
- Un pouvoir anti-rhumatismale (**Gonzalez, 1977**).
- Traitement du cancer (**Arhoghro, 2012**).
- Des pouvoirs diurétiques (**Masso et al., 1979**).

Dans la médecine traditionnelle chinoise, *C.uniflora* est utilisée pour le traitement de la fièvre et l'intoxication (**Wei et al., 1997**).

4. Quelques activités biologiques

Plusieurs études biologiques ont révélé des activités de certaines espèces de *Centaurea* (**Khammar et Djeddi, 2012**) telle que:

- Activité anti-inflammatoire
- Activité antipyrétique
- Activité anti-ulcérogène
- Activité anti-bactériale
- Activité anti-oxydante
- Activité hépatoprotective
- Activité cytotoxique

Deuxième partie : Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes

1. Etude *in vitro*

1.1. Matériel biologique végétal

La récolte de *Centaurea choulettiana* Pomel (*Asteraceae*) a été effectuée durant le mois de mai en 2013 dans la région de M'sila, et authentifiée par Dr Sarri Djamel, département de biologie Université de M'sila en Algérie on se basant sur (**Quezel et Santa, 1963**). Un spécimen (CCA/05/2013) a été déposé au niveau de l'herbarium de l'unité de recherche VARENBIOMOL Université des frères Mentouri Constantine 1.

1.1.1. Préparation de l'extrait

Une quantité de 1370g de feuilles de *Centaurea choulettiana* Pomel a été séchée à température ambiante et coupée en petits morceaux puis macéré trois fois (24 heures pour chaque fois) avec du méthanol / H₂O (70/30). L'extrait obtenu après filtration et évaporation a été partitionné avec des solvants à polarité croissante : chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol (*n*-BuOH). Chaque phase a été évaporée sous pression réduite. On a obtenu 14 g d'extrait séché *n*-BuOH de feuilles de *Centaurea choulettiana* Pomel (BECC) afin de les employer comme substances néphroprotectrices. La (Fig.14) récapitule les différentes étapes d'extraction réalisées.

Le choix des feuilles de *Centaurea choulettiana* Pomel pour la présente étude revient à sa richesse en composés bioactifs (**Azzouzi et al., 2016a**).

Deuxième partie : Etude expérimentale

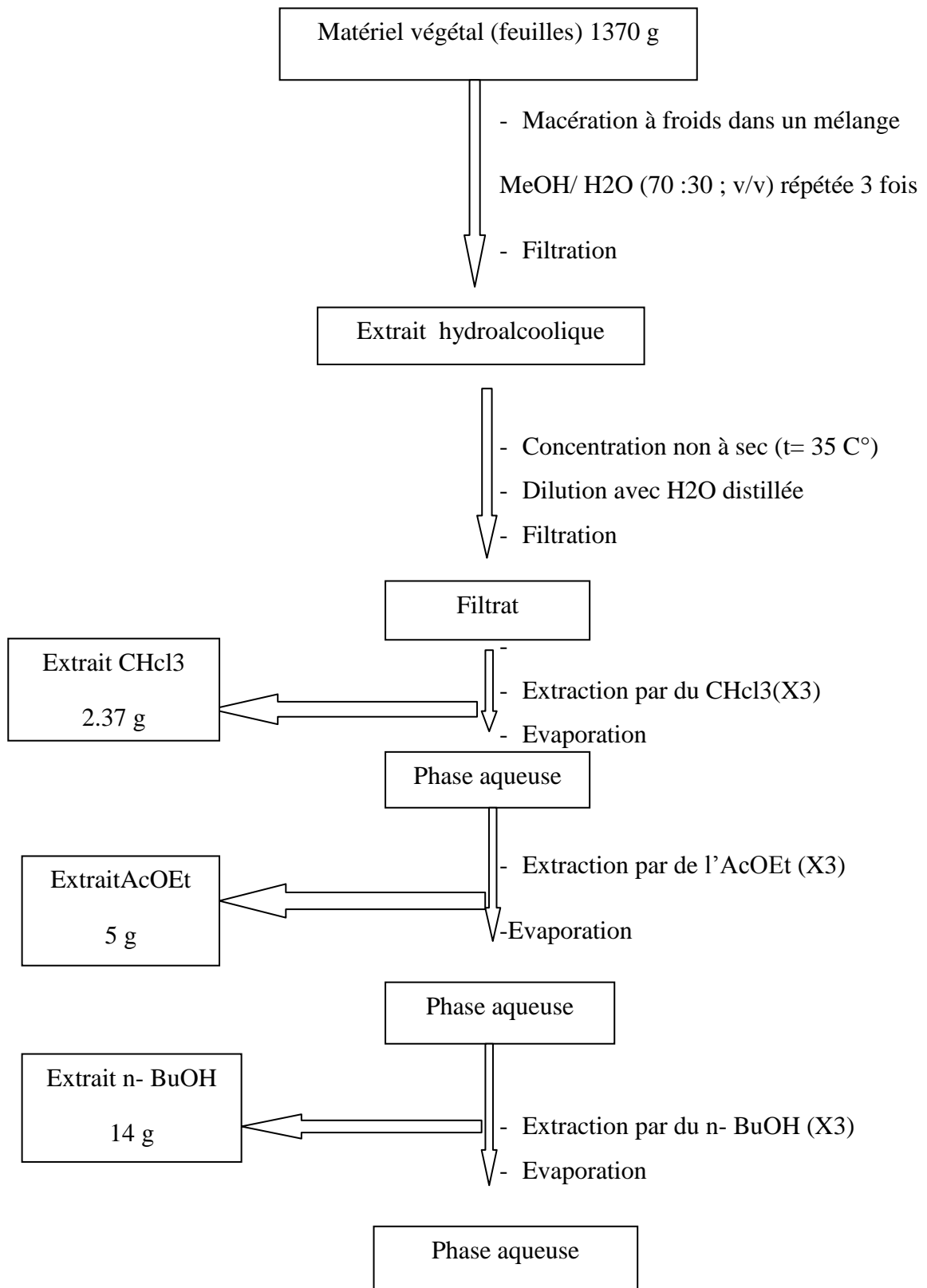


Figure.14 : protocole d'extraction de *Centaurea choulettiana* Pomel (Azzouzi, 2017).

1.2 Screening phytochimique

1.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont évalués par la méthode de Folin- Ciocalteu (**Li *et al.*, 2007**) en utilisant l'acide gallique (5-320 ug/mL) comme standard. Ce dosage repose sur la réduction en milieu alcalin du mélange phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques. L'oxydation des phénols réduisent ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène, ces derniers ont un maximum d'absorption à $\lambda = 765$ nm dont l'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés présents dans le milieu (**Georgé *et al.*, 2005**). Les concentrations des polyphénols totaux sont extrapolées à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, les valeurs sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg GAE/ g d'extrait).

1.2.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée selon (**Ordonez *et al.*, 2006**) en ajoutant le réactif trichlorure d'aluminium (AlCl_3 2%) à la solution contenant l'extrait. Après une heure d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 420 nm. Le taux des flavonoïdes est déduit à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de la quercetin, les valeurs sont exprimées en mg équivalent de quercetin par g d'extrait (mg QE/ g d'extrait).

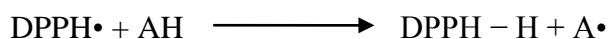
1.3. Evaluation de l'activité antioxydante

1.3.1. Dosage du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon (**Oyaizu, 1986**), différentes quantités des extraits ont été mises en suspension dans de l'eau distillée et mélangées avec 2.5 mL de tampon phosphate 0.2 M (ph 6.6) et 2.5 mL de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%. Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 min, 2.5 mL de (TCA 10%) ont été ajoutés au mélange et centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. ensuite 2.5 mL de surnageant ont été mélangés avec 2.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de (FeCl_3 1%), l'absorbance a été mesurée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique le pouvoir réducteur. L'acide ascorbique a été utilisé comme référence

1.3.2. Evaluation du pouvoir antiradicalaire DPPH •

L'effet antiradicalaire de l'extrait (*n-BuOH*) a été évalué par la méthode de DPPH° (2,2-diphényl -2- picryl – hydrazyle) (Ohinishi *et al.*, 1994). Le DPPH° (diphénylpicrylhydrazyle) est un radical libre de couleur violette qui devient jaune (diphénylpicryl – hydrazine) quand il est réduit par un donneur de proton H⁺ (Maataoui *et al.*, 2006).



1mL de différentes concentrations (0-700ug/mL) de l'extrait a été ajouté à 1 mL de solution méthanol de DPPH• (0.2mM), après 30 min d'incubation dans l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance a été lue à 517 nm. les BHA et BHT ont été utilisés comme référence. L'effet antioxydant de l'extrait (*n-BuOH*) est exprimé en pourcentage de réduction de DPPH• comme le montre la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction} = \frac{\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Abs_{contrôle} : Absorbance du contrôle (contenant tous les réactifs excepté le composé d'essai)

ABS_{échantillon} : Absorbance de l'essai (échantillon ou standard)

1.3.3. Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique

L'effet anti-peroxydatif de l'extrait *n-BuOH* a été estimé par la méthode de thiocyanate ferrique en utilisant l'acide linoléique. Le peroxyde généré réagit avec le chlorure ferreux (Fe²⁺) pour former les ions ferriques (Fe³⁺) monitoré sous forme d'un complexe de thiocyanate. L'émulsion de l'acide linoléique est préparée par l'homogénéisation de l'acide linoléique avec le Tween-40 émulsifié dans le tampon phosphate (0,2M, pH 7). Les échantillons sont préparés dans un mélange MeOH /eau et les concentrations sélectionnées pour l'étude sont 800 et 1000 µg/mL. Après l'incubation à 37 °C on ajoute le thiocyanate d'ammonium et le chlorure ferreux. Le mélange préparé par la même procédure est utilisé comme contrôle. La référence utilisée pour la comparaison est le trolox. La coloration développée est lue à 500 nm durant 4 jours successifs (Yen et Hsieh, 1998).

2. Etude *in vivo*

2.1. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

2.1.1. Induction de l'œdème dans la patte par la carragénine

L'expérience a été effectuée selon (Srivastava *et al.*, 2013), elle a été réalisée sur des rats *wistar Albinos*.

Les rats pesant (200-220g) sont regroupés par lot de cinq. Ils ont été mis à jeun 12 heures avant l'administration des substances expérimentales et répartis en trois groupes :

- **Groupe 1** : les rats témoins qui reçoivent par gavage l'eau physiologique
- **Groupe 2** : les rats recevant oralement le Diclofénac- sodique à la dose de (10 mg/kg) (Srivastava *et al.*, 2013)
- **Groupe 3** : les rats recevant l'extrait *n- BuOH* de *Centaurea Choulettiana* Pomel à la dose de (150 mg/kg)

Une heure plus tard, l'inflammation a été provoquée par l'injection de 0.1 mL de carragénine à (1%) dans une solution saline isotonique sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche des rats.

2.1.2. Estimation du volume de l'œdème de la patte

La progression du volume de l'œdème de la patte gauche des rats a été mesurée une heure avant l'induction de l'œdème et à (1, 2, et 6 h) après l'injection de la carragénine en utilisant le vernier caliper numérique. L'œdème a été traduit par une augmentation en épaisseur des pattes (mm) due à l'effet inflammatoire. Pour chaque groupe traité, les diamètres moyens obtenus à ces différents relevés, extrait ou diclofénac, (D_t) ont été comparés à celui obtenu avant tout traitement (D_0), nous permettant ainsi de calculer les pourcentages d'œdème (pourcentage d'inhibition), à partir de la formule suivante :

$$3. \% \text{ Inhibition} = \frac{(D_t - D_0)_{\text{témoin}} - (D_t - D_0)_{\text{traité}}}{(D_t - D_0)_{\text{témoin}}} \times 100$$

2.1.3. Mesure de l'activité de la myéloperoxydase (MPO)

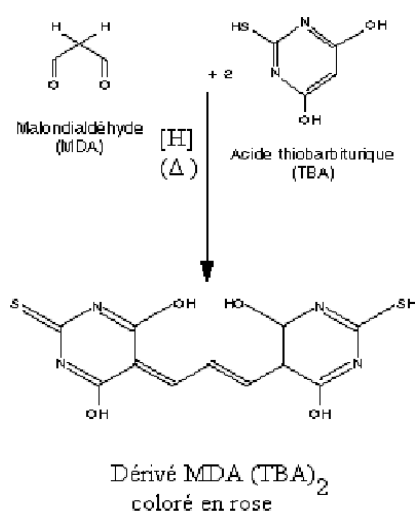
L'accumulation des neutrophiles dans la patte œdémateuse des rats a été estimée par l'évaluation de l'activité de la MPO. Après 24 heures de l'induction de l'inflammation, les rats ont été sacrifiés par dislocation cervicale et les tissus des pattes arrière (50-100 mg) ont été recueillis et homogénéisés. L'activité de la MPO dans les homogénats des pattes a été calculée par la mesure du changement d'absorption à $\lambda = 450$ nm en présence d'O-dianisidinedihydrochlorure et 0.006% de H_2O_2 (Posadas *et al.*, 2004). L'activité de la MPO

Deuxième partie : Etude expérimentale

est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ($1.13 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) d'o-dianisidine oxydé. Les résultats sont exprimés en MPO U/mg de tissu dont l'unité (U) de l'activité MPO a été définie par la conversion de 1 μmol de H_2O_2 en eau dans 1 min à 25 C° .

2.1.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits terminaux de l'oxydation des acides gras polyinsaturés par les radicaux libres libérés au cours du stress oxydant. En milieu acide et à chaud (100C°), une molécule de MDA est condensée avec deux molécules de thiobarbiturique acide (TBA) pour former un complexe coloré en rose ayant une absorbance maximale à 532 nm selon cette réaction :



Le taux de MDA a été mesuré dans les homogénats des pattes des rats selon (**Ohkawa et al, 1979**). L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda = 532 \text{ nm}$ et les résultats sont exprimés en nmol par mg de tissu intra-plantaire (nmol/mg tissu en utilisant le coefficient d'extinction molaire $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$).

2.2. Evaluation de l'activité néphroprotectrice

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris mâle de souche *Albinos Wistar* pesant ($30 \pm 2 \text{ g}$) issus d'un élevage au niveau de l'animalerie de l'institut de Pharmacie, Constantine. Ils ont été placés aléatoirement dans des cages standards pour une période d'acclimatation de deux semaines avant d'être soumis à l'étude. Pendant cette période les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture standard (*ad libitum*) et ils sont maintenus dans une animalerie et à une température constante ($22 \pm 2 \text{ C}^\circ$) et soumis à un cycle de lumière / obscurité de 12/12h.

2.2.1. Induction et traitement de la néphrotoxicité des souris

Pour provoquer une telle néphrotoxicité, les souris ont reçus par une injection intrapéritonéale (Ip) du cisplatine (cis- dichlorodiammine- platine II, CP) Mylon 1mg/mL (obtenu du centre anti cancéreux de Constantine).

Vingt- quatre souris divisées en quatre lots (6 souris dans chaque lot):

Lot témoins: reçoivent par gavage 1mL d'eau physiologique (NaCl 0.9 %) pendant 10 jours.

Lot CP: reçoit par voie orale 1mL de l'eau physiologique (NaCl 0.9 %) pendant 10 jours, au dernier jour, une heure après le gavage, une dose unique (8mg/kg) de CP à été injectée par voie intra péritonéale.

Lot Vit E- CP: reçoit par voie orale 100mg/kg de la vitamine E pendant 10 jours, au dernier jour, une heure après le gavage, une dose unique (8mg/kg) de CP à été injectée par voie intra péritonéale.

Lot EXT- CP: reçoit par voie orale 150 mg/kg de BECC pendant 10 jours, au dernier jour, une heure après le gavage, une dose unique (8mg/kg) de CP à été injectée par voie intra péritonéale

2.2.2. Le sacrifice des animaux

Tous les lots ont été sacrifiés au 11^{ème} jour par décapitation après 18 heures de provocation par CP, les échantillons de sang ont été recueillis dans des tubes héparinés et centrifugés à 3000 tours/ minute pendant 10 minutes à 4 C°. Le plasma est séparé puis stocké au congélateur (-20 C°) jusqu'à l'utilisation pour l'analyse des paramètres biochimiques (urée, créatinine). Les fragments des reins récupérés sont conservés à -80 C° pour le dosage des paramètres du stress oxydatif.

2.3. Dosage biochimiques

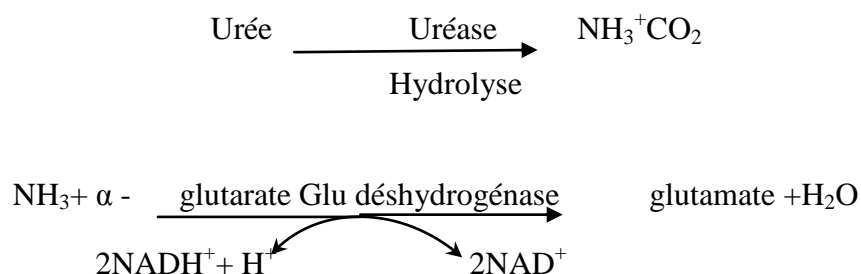
Les dosages biochimiques sont effectués on utilisant des Kits commerciaux dont le principe est le suivant :

2.3.1. L'urée

Le dosage de l'urée a été effectué par la méthode enzymatique en deux étapes. La première est une hydrolyse de l'urée en ammoniacque (NH₃) et le dioxyde de carbone(CO₂) par l'intermédiaire d'une enzyme uréase. La deuxième étape est une transformation de l'ammoniacque et le α -Glutamate par la glutamate déshydrogénase en glutamate et H₂O₂. Cette réaction est accompagnée d'une oxydation du NADH⁺+H⁺ en NAD⁺. La diminution de

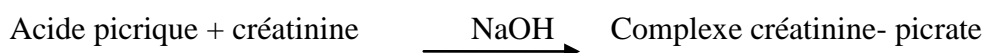
Deuxième partie : Etude expérimentale

l'absorbance à une longueur d'onde de 340 nm est proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.



2.3.2. La créatinine

La créatinine a été dosée dont le principe est la formation d'un complexe créatinine-picrate par la réaction de la créatinine de l'échantillon avec le picrate dans un milieu basique. L'augmentation de l'absorbance à 500 nm est proportionnelle à la concentration de la créatinine dans le plasma.



2.4. Evaluation du statut oxydatif rénal

2.4.1. Préparation de l'homogénat et la fraction cytosolique rénale

Après la dissection, les reins récupérés sont rincés avec de l'eau physiologique, puis coupés en petites pièces et pesés ;in aliquot du rein est homogénéisé dans 2.5mL de solution tampon Tris- EDTA (0.1mM, PH 7.6) contenant du KCl (1.15%) puis destiné après centrifugation (1000 tours/min pendant 10 min à 4 C°) au dosage du MDA.

Le surnageant collecté est centrifugé une deuxième fois à 9600 tours/min pendant 45 min à 4 C°. La fraction cytosolique récupérée est utilisée pour le dosage de, l'activité enzymatique de la catalase (CAT), superoxydedismutase (SOD), glutathion -S- transférase (GST), glutathion peroxydase (GP_x) et glutathion réduit (GSH).

2.4.2. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été évaluée en dosant le taux de MDA (Ohkawa *et al.*, 1979) décrite auparavant. Les résultats sont exprimés en nmol par gramme de rein (nmol / g tissu).

2.4.3. Dosage de la catalase

L'activité de la catalase a été calculée suivant (Aebi, 1984). Le principe repose sur la disparition de H₂O₂ à 25C° en présence de source enzymatique dans la fraction cytosolique comme le montre la réaction suivante :

Deuxième partie : Etude expérimentale



La quantité de H_2O_2 décomposée est proportionnelle à la concentration en substrat et la concentration en enzyme. L'absorbance est lue à 240 nm chaque minute dans un intervalle de temps de 2 min et l'activité de l'enzyme est calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire : $0.043 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Les résultats sont exprimés en nmol/min/mg de protéine.

2.4.4. Dosage du superoxydedismutase (SOD)

L'activité enzymatique de la SOD a été estimée conformément à (**Marklund et Marklund, 1974**) son principe repose sur la capacité d'inhibition de l'autooxydation du pyrogallol par la SOD.

L'activité de l'enzyme est exprimée en U/mg de protéine du tissu rénale (U/mg tissu). Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50% de l'autooxydation du pyrogallol. L'activité de l'enzyme est calculée comme suit.

$$\text{Inhibition totale} = \frac{\text{Densité optique du blanc} - \text{Densité optique de l'échantillon}}{\text{Densité optique du blanc}} \times 100$$

$$\text{L'Unité de SOD/mg de protéine} = \frac{\text{inhibition totale}}{n \times 50}$$

n : mg de protéines en mg présentes dans le volume de l'échantillon utilisé.

2.4.5. Dosage de la glutathion-S- transférase (GST)

Le dosage de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) a été réalisé d'après (**Habig et al., 1974**). La GST catalyse la réaction de conjugaison entre le glutathion et le 1-chloro-2,4 dinitrobenzen (CDNB) comme substrat. La conjugaison se fait par le biais du groupement thiol du glutathion comme le montre la réaction suivante :



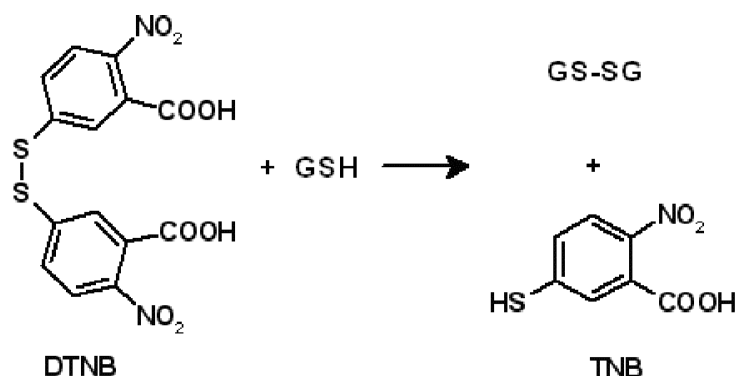
L'augmentation de l'absorption est proportionnelle à l'activité de la GST de l'échantillon. Cette dernière est déterminée par la mesure du produit (GSH-DNB) à 340 nm issu de la réaction de conjugaison du CDBN avec le glutathion réduit. Les résultats sont déduits en utilisant un coefficient d'extinction molaire de CDBN : $9.6 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ et exprimés en umol/mg de protéine.

2.4.6. Dosage de la glutathion peroxydase (GP_X)

Le dosage de la glutathion peroxydase (GP_X) a été effectué selon (**Rotruck *et al.*, 1973**). Le GP_X de l'homogénat tissulaire oxyde le glutathion, et simultanément le H₂O₂ est réduit en 2H₂O. La quantité du glutathion restante réagit avec la solution DTNB pour donner un composé coloré qui est mesuré par spectrophotométrie à 420 nm. L'activité de GP_X est exprimée en nmol/min/mg de protéine.

2.4.7. Dosage de glutathion réduit (GSH)

Le dosage du glutathion réduit (GSH) a été réalisé suivant (**Sedlak et Hanus , 1982**). Le principe consiste à scinder la molécule d'acide 5.5'dithiodis-2- nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH et la libération de l'acide thionitrobenzoïque (TNB). Ce dernier, à PH (8-9), présente une absorbance maximale à 412 nm:



Les concentrations sont exprimées en nmol de GSH/mg de protéine.

2.5. Dosage de la myéloperoxydase (MPO) rénal

Pour la réalisation de ce dosage on a utilisé 24 souris divisées en 4 lots (n=6) comme décrit auparavant. Tous les animaux sont sacrifiés par décapitation après 10 jours de traitement. Les reins sont récupérés pour le calcul de l'activité de la myéloperoxydase (MPO).

L'activité de la myéloperoxydase (MPO) a été calculée comme indiquée par (**Bradley *et al.*, 1982**). Le tissu du cortex rénal a été mis en suspension dans 6 ml de tampon phosphate (50 mmol/l, PH ,6) contenant 1% HTAB. Les échantillons homogénéisés ont été congelés puis décongelés, et centrifugés à 4500 tr/min pendant 15 min à 4 C°. L'activité de la myéloperoxydase a été estimée après addition de 0.167 mg/ml de dihydrate -O- dianisidine et 0.0005% de H₂O₂. Le changement d'absorbance à 460 nm a été enregistré par spectrophotométrie sur 10 minutes.

2.6. Etude histologique

Des petits morceaux des reins des souris sont mis dans du formaldéhyde 10% puis stockés pour l'examen histologique. Ils ont été inclus dans la paraffine, coupés par microtome (5 μ m) et ont subis une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (x400).

2.7. Analyse statistique

Pour l'étude *in vivo* (n =6) les résultats sont exprimés comme valeurs de moyenne \pm écart-type. L'étude *in vitro* a été réalisée en triplet et les résultats exprimés en moyenne \pm écart-type. La valeur IC₅₀ (μ g extrait / ml) est la concentration efficace 50% d'activité, a été calculée pour chaque dosage. L'évaluation statistique a été réalisée au moyen d'une analyse de variance (ANOVA). Le niveau de signification entre les différents groupes a été évalué par le test *t* (Student test) et les valeurs ont été considérées comme significatives à P <0,05.

II. Résultats

1. Screening phytochimique

1.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Les résultats de dosage des polyphénols et flavonoïdes révèlent que l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel contient (40.288 ± 1.917 mgGA/g extrait) de polyphénols, et de (13.287 ± 1.13 mgQE/g extrait) des polyphénols sous forme de flavonoïdes comme l'indique le (tableau.3).

Tableau.3 : Teneur en polyphénols totaux et des flavonoïdes.

| Extrait | Teneur en polyphénols (mgGA/g extrait) | Teneur en flavonoïdes (mgQE/g extrait) |
|---------|---|---|
| BECC | 40.288 ± 1.917 | 13.287 ± 1.13 |

2. Evaluation de l'activité antioxydante

2.1. Pouvoir réducteur

La (fig.15) montre que l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel a un pouvoir reducteur faible par rapport à l'acide ascorbique utilisé comme référence.

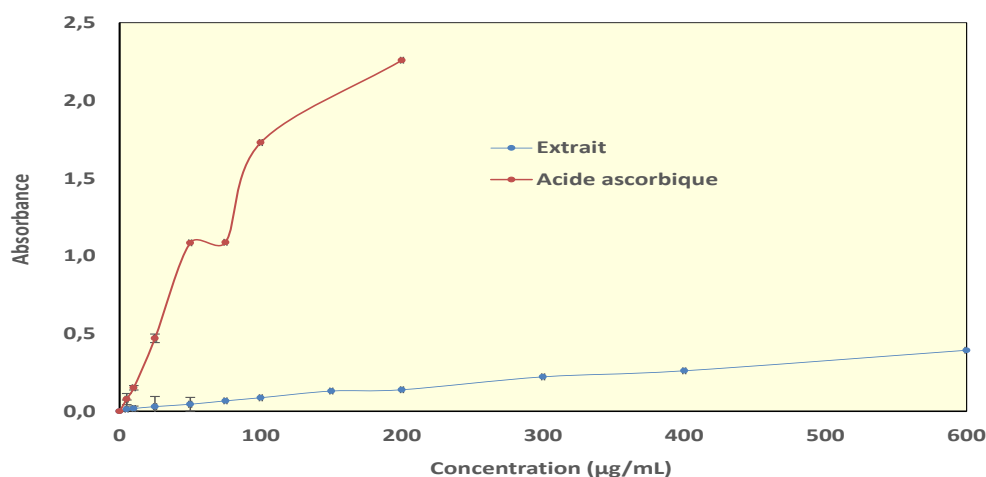


Figure.15 : Pouvoir réducteur de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel
Chaque point représente la moyenne \pm SD (n=3).

2.2. L'effet scavenger du radical DPPH •

L'extrait butanolique du *Centaurea choulettiana* Pomel a fait augmenter progressivement l'activité de piégeage des radicaux DPPH d'une manière dépendante de la dose (fig.16), il a révélé une capacité de piégeage des radicaux DPPH très élevée à la

Deuxième partie : Etude expérimentale

concentration comprise entre 500-700 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Ces résultats ont été comparés avec des standards de BHA et du BHT. Selon la valeur IC_{50} , l'effet scavenger des radicaux DPPH était suivant l'ordre BHT: $9.80 \pm 0.55 < \text{BHA}: 14 \pm 2.93 < \text{BECC}: 142.96 \pm 8.17$ (fig.16).

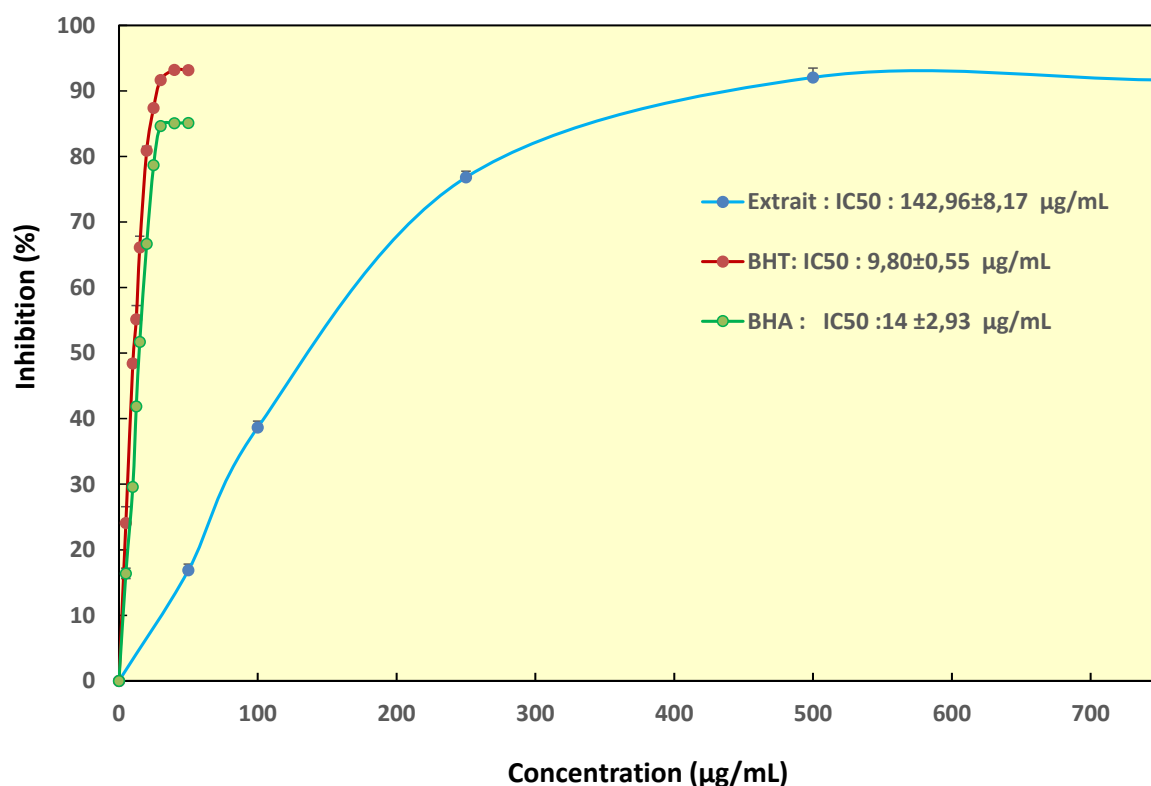


Figure.16 :L'effet scavenger de DPPH' de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel et les standards. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD (n=3)

2.3. Inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique

La (fig.17) montre l'inhibition de la peroxydation lipidique de *C.choulettiana* pour deux concentration différentes (800 et 1000 ug/ml), l'augmentation de l'absorbance du contrôle, trolox, *n-BuOH* (800 ug/ml), *n-BuOH* (1000 ug/ml) a atteint le maximum (1.60, 0.44, 0.99, 0.82) respectivement à 72 heures.

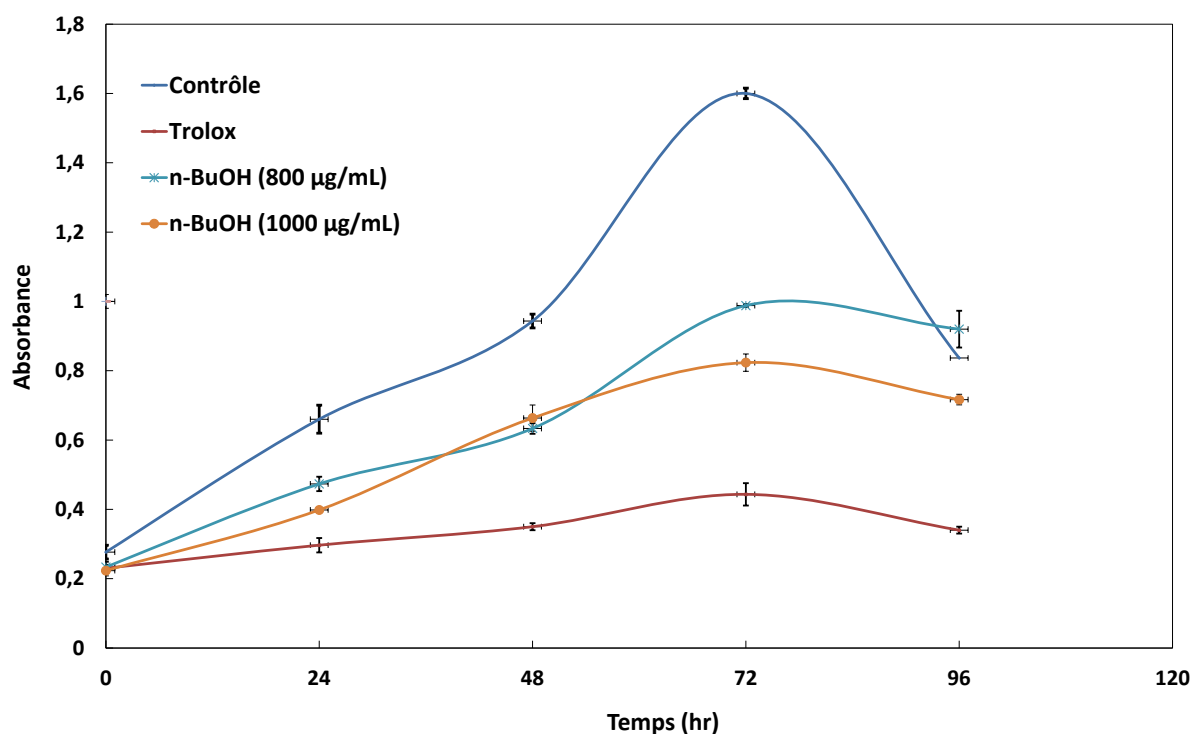


Figure.17 : l'inhibition de la peroxydation lipidique de *C. choulettiana*.

3. L'activité anti-inflammatoire

L'étude de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée suite à l'inflammation aiguë, après l'injection sous-plantaire de λ -carragénine (1%) qui a provoqué un gonflement progressif de la patte gauche du rat et a atteint un niveau maximal à la deuxième heure, le BECC avait un effet significatif ($P < 0,01$) à la concentration 150 mg / kg PC(fig.18) en réduisant significativement le gonflement à la phase précoce (2h, 63,77%), et la phase tardive (6 h, 63.93%) de l'œdème provoqué par la λ -carragénine, cet effet est comparé à l'effet du diclofénac-sodique (10 mg / kg), aux pourcentages suivants 71% et 69.4% d'inhibition respectivement (fig.18).

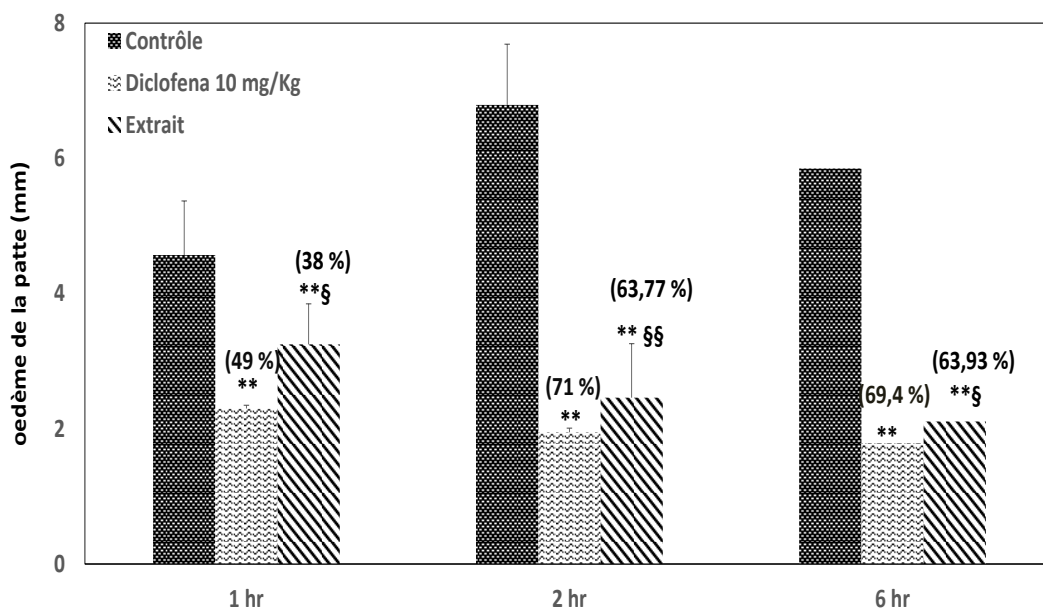


Figure.18 : L'effet protecteur d'BECC sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5). (**P < 0.01) différence significative par rapport au témoin. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

3.1. Activité de la myéloperoxydase (MPO) dans les tissus des pattes

L'injection de la λ - carragénine au niveau de la patte gauche des rats se traduit par une augmentation significative de l'activité enzymatique tissulaire de la MPO ($8,10 \pm 0,3$ U/mg tissu) ce qui confirme l'accumulation des cellules inflammatoires dans le tissu de la patte oedémateuse. Le traitement des rats par la dose de (150mg/kg PC) d'extrait *n-BuOH* a permis de diminuer l'activité de la MPO jusqu'à (51.85%), alors que le diclofénac sodique (10 mg/kg) réduit l'activité de la MPO à (74.32) (fig.19).

3.2. Taux du malondialdéhyde (MDA) dans les tissus des pattes

Les rats injectés par la λ - carragénine ont subi une augmentation significative du taux de MDA ($16,80 \pm 1,30$ nmol/mg tissu). Le traitement des rats par la dose de (150mg/kg PC) d'extrait *n-BuOH* a permis de réduire le taux du MDA à ($7,14 \pm 0,9$ nmol/mg tissu), valeur correspondant à (57.14%) d'inhibition de la peroxydation lipidique, le diclofénac sodique a prouvé une inhibition de l'ordre de (75.71%) (fig.19).

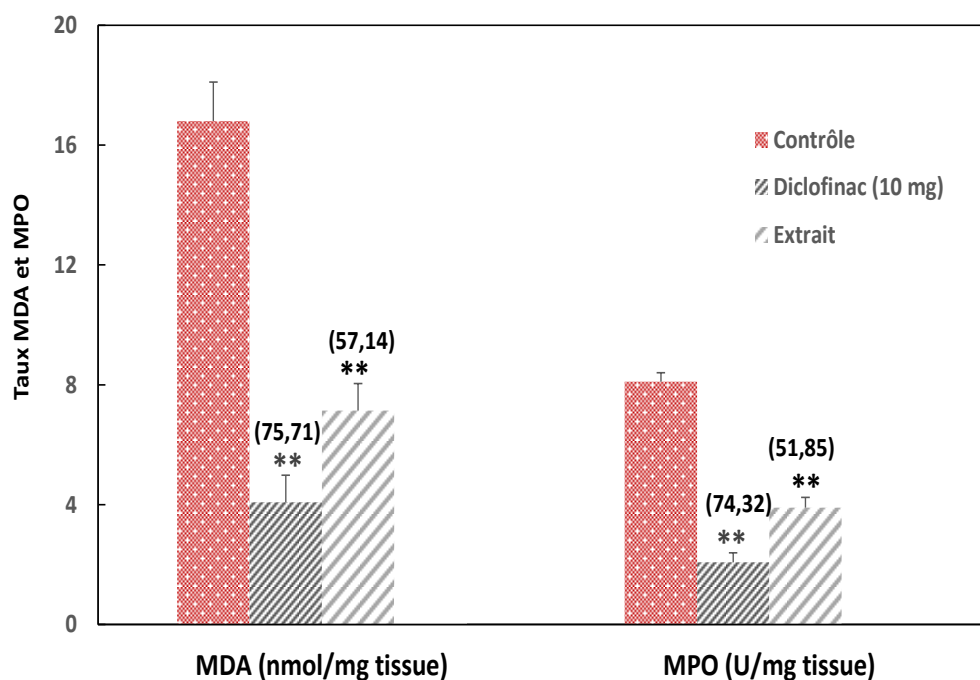


Figure.19 : Effet anti-inflammatoire de l'extrait *n-BuOH* de *C.choulettiana* sur l'activité de la MPO et la production de MDA dans les tissus des pattes des rats.

Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=5).; (**P < 0.01) différence significative. Les valeurs indiquées entre parenthèses représentent le pourcentage d'inhibition.

4- Les marqueurs de la fonction rénale

L'administration de CP aux souris a induit une insuffisance rénale marquée, comme en témoignent les élévations significatives ($P < 0.01$) des taux de créatinine et de l'urée par rapport au groupe témoin.

Le prétraitement des animaux par le BECC à la dose de (150mg/kg PC) et la Vit E à la dose de (100mg/kg PC) pendant 10 jours a préservé la fonction rénale, comme en témoigne la réduction significative ($P < 0.01$) de créatinine (80.15%) et l'urée (57.58%) par rapport au groupe Vit E (84.61%, 74.24%) respectivement (fig.20 ; a, b).

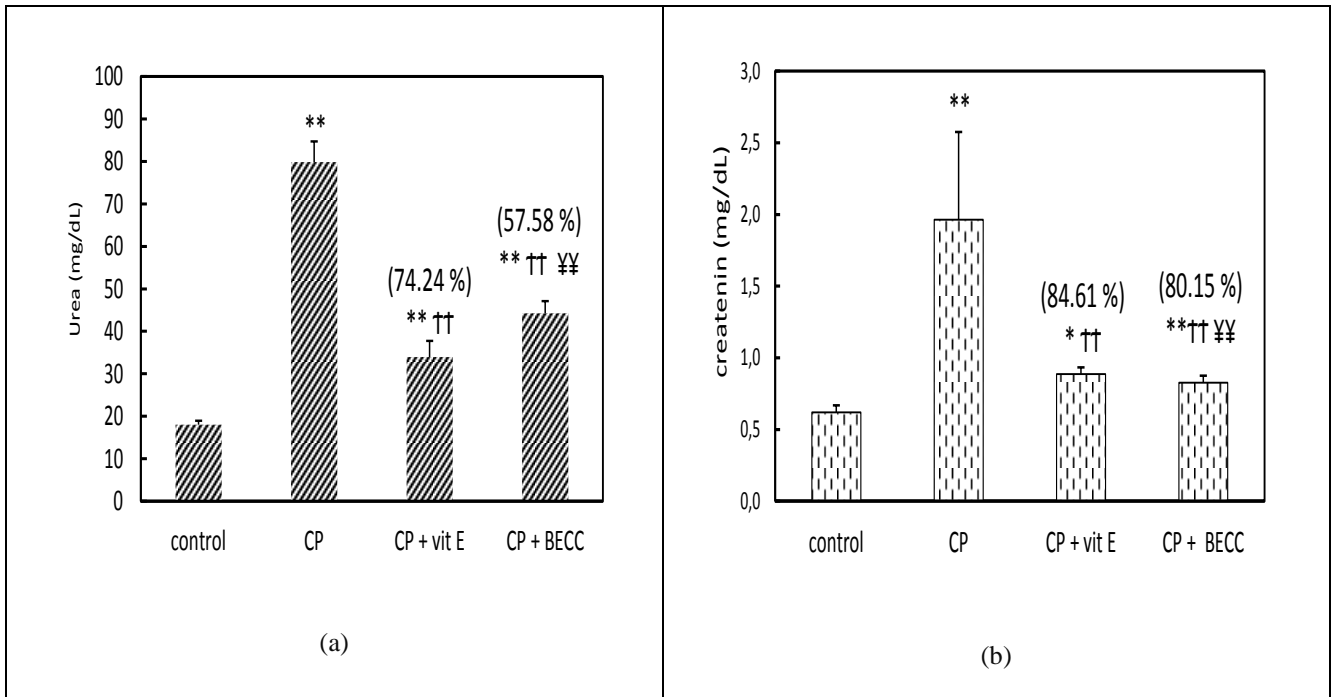


Figure.20: L'effet protecteur de BECC (150mg/kg) sur le dysfonctionnement renal induit par CP

(8mg/kg) chez les souris: (a) l'azote uréique et (b) la créatinine. Les valeurs sont moyennes \pm SD, (n = 6), *: tous les groupes vs contrôle; ††: CP vs CP + vitamine E et CP + BECC; ¥¥: CP + vitamine E vs CP + BECC.; ¥¥ †† ** P <0,01. Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le pourcentage de protection

5. Marqueurs du stress oxydatif rénal

5.1. La peroxydation lipidique

Le niveau de la peroxydation lipidique (MDA) était significativement ($P < 0.05$) augmenté chez les souris traité par le CP. Le prétraitement des animaux par BECC à la dose de (150mg/kg PC) et la Vit E à la dose de (100mg/kg PC) a diminué le niveau d'MDA par un taux de (54.90%, 74.10%) respectivement (fig.21).

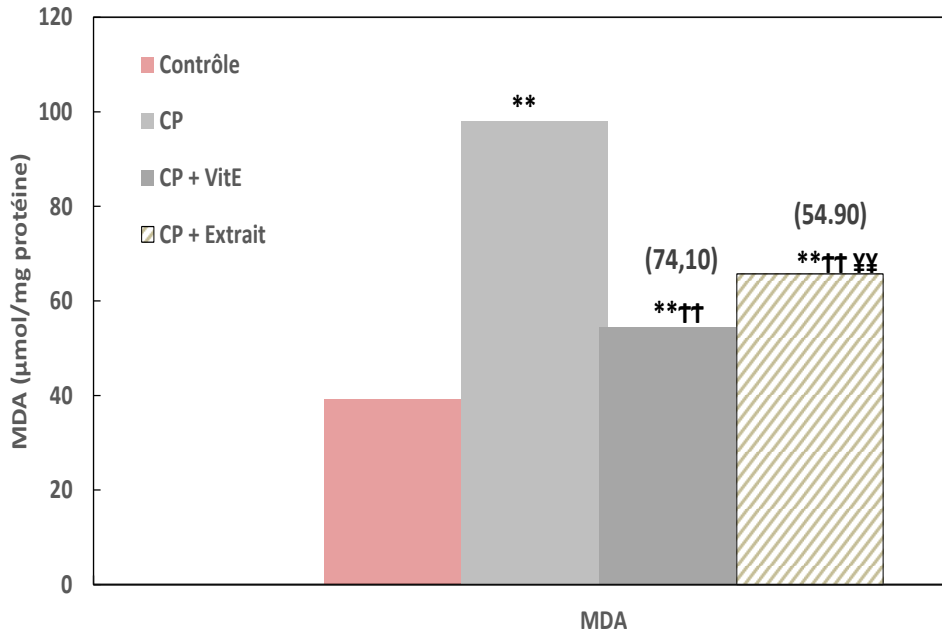


Figure.21 : L'effet protecteur de BECC (150mg/kg) sur le taux du MDA induit par le CP (8mg/kg).

Les valeurs sont moyennes \pm SD, (n = 6), *: tous les groupes vs contrôle; ††: CP vs CP + vitamine E et CP + BECC; ¥: CP + vitamine E vs CP + BECC.; ¥¥ †† ** P <0,01. Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection

5.2. L'activité enzymatique de la CAT et de la SOD

L'activité enzymatique de la CAT et de la SOD dans le rein des souris recevant le CP (8mg/kg PC) a significativement diminuée ($P < 0,01$) par rapport aux témoins. L'extrait *n-BuOH* (150mg/kg PC) a préservé l'activité de la CAT jusqu'à (67.61%) et celle de la SOD jusqu'à (68.16%). La vitamine E a permis de préserver l'activité de la CAT et de la SOD chez les souris traitées par le CP par un pourcentage de (84.35%) et (85.68%) respectivement (fig.22).

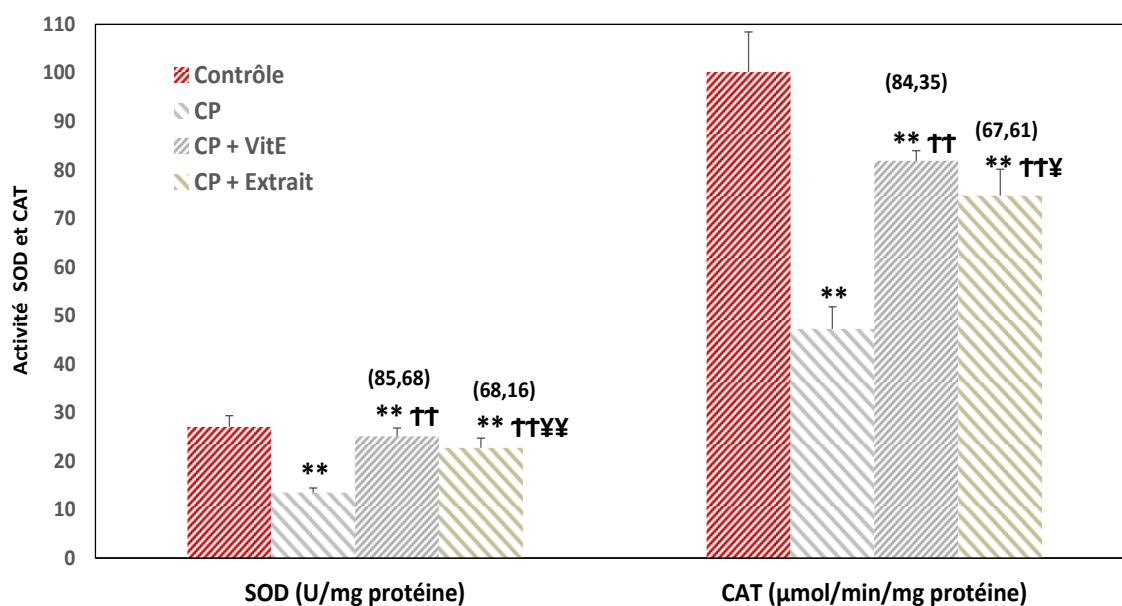


Figure.22 : L'effet protecteur de BECC (150mg/kg) sur l'activité des enzymes antioxydants : CAT et SOD dans le rein chez des souris traitées par le CP (8mg/kg).

Les valeurs sont en moyennes \pm SD, (n = 6), *: tous les groupes vs contrôle; †: CP vs CP + vitamine E et CP + BECC; ‡: CP + vitamine E vs CP + BECC. †‡ * P < 0,05; ††‡‡ ** P < 0,01. Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection.

5.3. Activité enzymatique de système glutathion

Le traitement des souris par le CP a provoqué une nette déplétion significative ($P < 0,01$) du taux de GSH rénal celui-ci a réduit les activités des enzymes liées au système-GSH à savoir le GST et GP_x. Le prétraitement des animaux par le BECC (150mg/kg PC) a rétabli le taux du GSH à (63.29%) et a restauré les activités des enzymes du système-GSH, le GP_x à (66.38%), le GST à (70.18%). La vitamine E a permis de préserver le taux de GSH et des activités du système-GSH, le GP_x et GST chez les souris traitées par le CP à raison de (80.59%), (77.90 %), (86.63%) respectivement (fig.23).

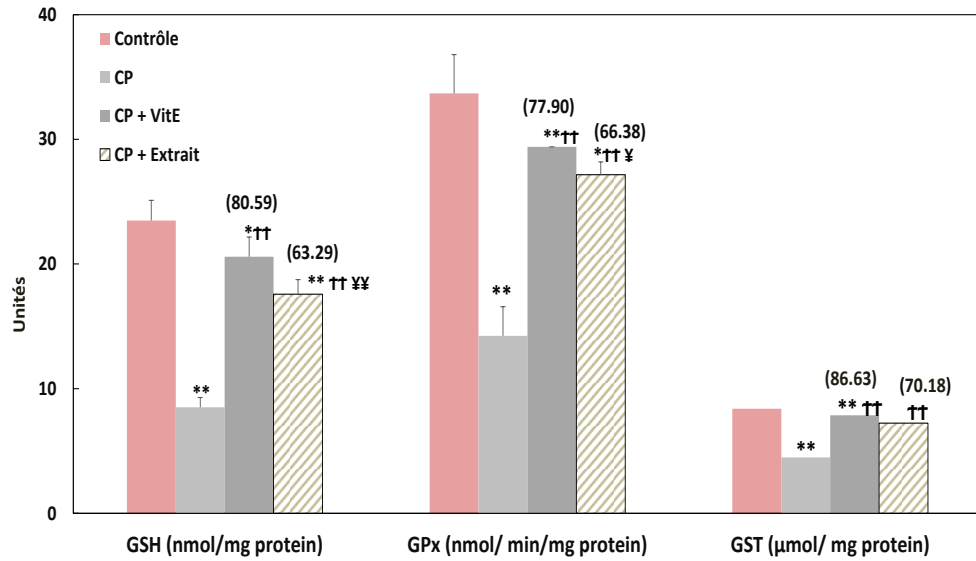


Figure.23 : l'effet protecteur de BECC (150mg/kg) sur le système glutathion dans le rein des souris traité par CP (8mg/kg).

Les valeurs sont en moyennes \pm SD, (n = 6), *: tous les groupes vs contrôle; †: CP vs CP + vitamine E et CP + BECC; ‡: CP + vitamine E vs CP + BECC. †† * P <0,05; ††† †† ** P <0,01. Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection.

6. Niveau de MPO rénal

L'activité MPO, qui est un indicateur de l'infiltration des neutrophiles, était significativement ($P < 0,01$) plus élevée dans le tissu rénal du groupe CP ($7,282 \pm 0,848$ U / mg de protéines) que celle du groupe témoin ($3,173 \pm 0,2178$ U / mg protéine). Dans le groupe BECC (5.137 ± 0.128 U / mg de protéine) et le groupe vitamine E (4.175 ± 0.154 U / mg de protéines), l'activité MPO était significativement ($P < 0.01$) normalisée par un pourcentage de (52.21%) par rapport à la vitamine E (75.61%) (fig.24).

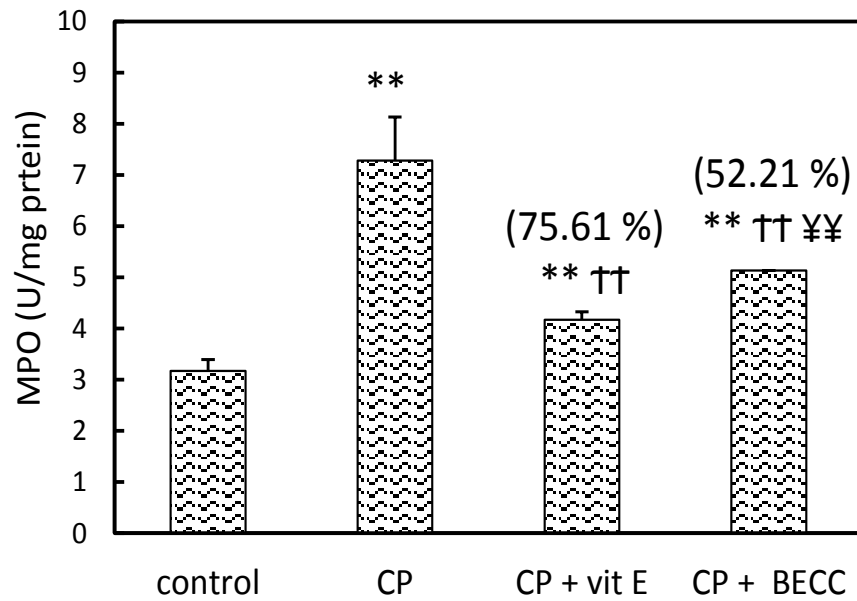
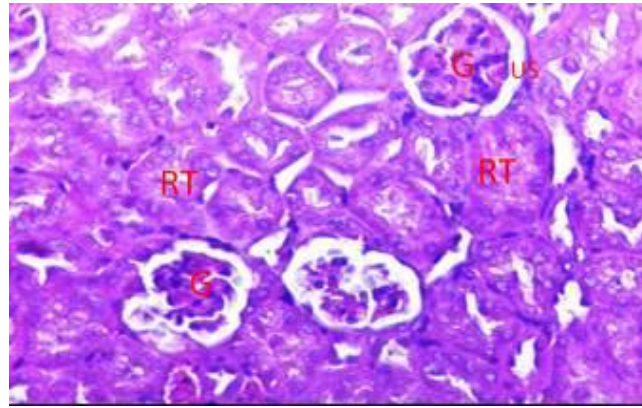


Figure.24 : L'effet de BECC (150 mg / kg) sur MPO rénale chez les souris CP (8mg/kg).

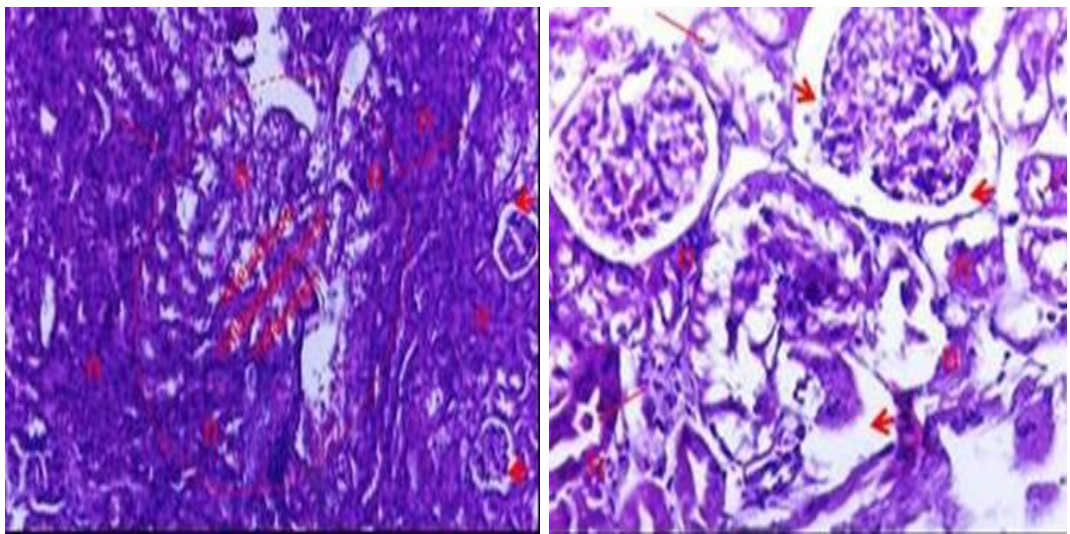
Les valeurs sont en moyennes \pm SD, (n = 6), *: tous les groupes vs contrôle; †: CP vs CP + vitamine E et CP + BECC; ¥: CP + vitamine E vs CP + BECC; ¥¥ †† ** P <0,01. Les valeurs entre parenthèses indiquent le pourcentage de protection. Le pourcentage de protection est calculé comme suit: $100 \times (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs d'échantillons} / (\text{valeurs de CP}) - \text{valeurs de contrôle}$.

7. Examen histopathologique

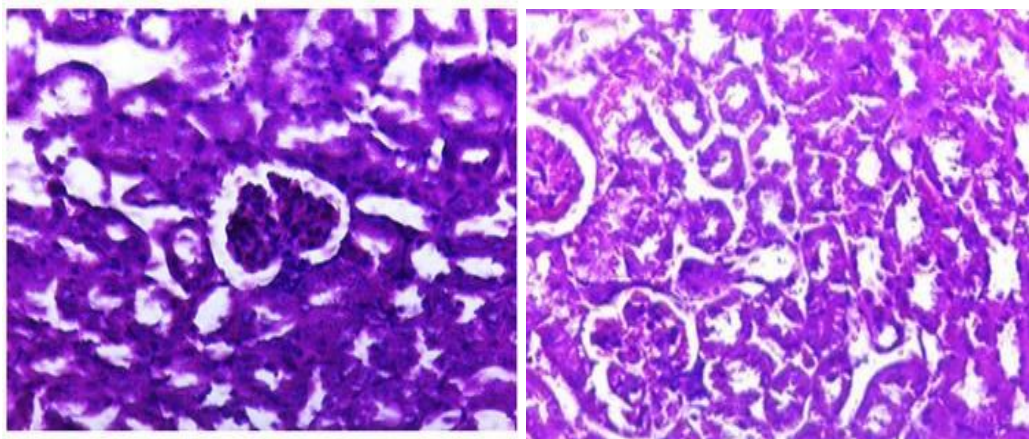
L'analyse histopathologique de la région corticale des souris témoins a montré une histo-architecture glomérulaire et tubulaire normale (Fig. 24, A), les souris traitées par le CP ont provoqué dans les tubules rénaux un œdème et des vaisseaux sanguins congestionnés et une lésion interstitielle mise en évidence par une dilatation de la lumière tubulaire avec des degrés variables de nécrose tubulaire et d'infiltration cellulaire inflammatoire confirmant la découverte de MPO (fig.25, B). L'administration du BECC et de la vitamine E, ont atténué et minimisé les lésions et les dégénérescences histopathologiques. Par contre le parenchyme rénal a repris son aspect habituel (fig.25, C, D)



A(témoin)



B (CP)



C (Vit E)

D (BECC)

Figure.25 : Photomicrographie de l'analyse histopathologique du cortex rénal des souris (H&E X400).

III. Discussion

Etude *in vitro*

Le stress oxydatif s'implique généralement dans l'apparition de certaines pathologies cardiovasculaires, la cirrhose, les cancers, le vieillissement et la néphrotoxicité etc. Les produits naturels d'origine végétale offrent une résistance contre le stress oxydant en piégeant les radicaux libres en inhibant la peroxydation lipidique. (Sen *et al.*, 2013). Les systèmes de défense antioxydants naturels protègent les biomolécules contre les dommages induits par les ROS/RNS .cet effet protecteur peut être renforcé par l'utilisation de micronutriments antioxydants (vitamines C et E, β -carotène) et par des composés non nutritifs comme les phénols et flavonoïdes provenant des plantes (Shirwaikar *et al.*, 2011 ; Sen *et al.*, 2011 ; Bhagat *et al.*, 2011).

La présente étude a été réalisée pour évaluer les effets rénoprotecteurs de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel contre la néphrotoxicité induite par le cisplatine chez les souris. Différentes méthodes d'essai *in vitro* ont été réalisées pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel (DPPH°, pouvoir réducteur, polyphénols totaux, flavonoïdes, inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique).

Le test DPPH a été largement utilisé pour évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres des antioxydants car il est simple et très sensible (Canadanovié- Brunet *et al.*, 2014).

Dans le test DPPH, les antioxydants réagissent avec le DPPH \cdot (couleur violette foncée) et le convertissent en *a,a*-diphénylpicrylhydrazine de couleur jaune. Le degré de décoloration indique le potentiel anti-radicalaire de l'antioxydant (Blois, 1958 ; Huang *et al.*, 2005 ; Mosquera *et al.*, 2007). L'extrait *n-butanolique* de *Centaurea choulettiana* Pomel s'est avéré capable de réduire le radical stable DPPH \cdot à la diphénylpicryl hydrazine de couleur jaune, cette capacité est due probablement à l'activité antiradicalaire des composés phénoliques présents dans l'extrait. Nos résultats sont en accord avec celles rapportés par (Sharma et Pal Vig, 2014). Ils ont montré que l'extrait butanolique du *Parkinsonia aculeata* présente de meilleures propriétés antioxydantes.

Dans le test du pouvoir réducteur, l'activité antioxydante de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel a été estimée par spectrophotométrie en suivant l'augmentation d'absorbance. Le pouvoir réducteur est généralement associé à la présence de réductones, qui exercent une action antioxydante en brisant la réaction en chaîne des radicaux libres en octroyant un atome d'hydrogène. (Duan *et al.*, 2007).

Deuxième partie : Etude expérimentale

Les antioxydants sont capables de captant les radicaux libres *in vitro* en réduisant le complexe ferrique (Fe^{3+}) à la forme ferreux (Fe^{2+}) grâce à la capacité de transfert d'électron (**Giacco et Brownlee, 2010**). Le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (**Jing et al., 2015**).

Dans notre étude l'extrait butanolique de la plante n'a démontré qu'un pouvoir réducteur faible par rapport à celles rapportés par (**Jing et al., 2015**). Ils ont montré que la fraction n-butanol du *Rhododendron anthopogonoides* présente une activité réductrice plus élevée.

Les résultats de dosage des polyphénols et flavonoïdes révèlent que les feuilles de *Centaurea choullettiana* Pomel contiennent des quantités importantes.

Des études récentes ont montré que plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en composés phénoliques comme les facteurs géographiques, climatiques, génétiques, le degré de maturation de la plante et la durée de stockage (**Aktumsek et al., 2013**).

Les résultats obtenus *in vitro* pour l'étude de l'activité antioxydante des flavonoïdes ont indiqué que cette activité est essentiellement attachée à leur tendance à piéger les espèces réactives de l'oxygène comme le radical superoxyde, hydroxyles, et alkoxyles (**Krishnamachari et al., 2002 ; Rajendran et al., 2004**).

L'acide linoléique, faisant partie des acides gras incorporés dans la membrane cellulaire; était plus sensible aux attaques des radicaux libres qui provoquent la peroxydation des lipides (**Cai et al., 2004**)

Les résultats obtenues dans cette étude ont montré que l'extrait *n-BuOH* possède un effet inhibiteur de l'acide linoléique cela pourrait être du aux teneurs en polyphénols et flavonoïdes (**Cook et Samman, 1996 ; Devasagayam et al., 2004**).

Etude *in vivo*

L'inflammation joue un rôle important dans diverses pathologies, telles que la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose et l'asthme, (**Moueller et al., 2010**).

Le mécanisme de la lésion inflammatoire est attribué, en partie à la libération d'espèces réactives de l'oxygène à partir des neutrophiles activés et des macrophages cette surproduction entraîne des lésions tissulaires qui endommagent les macromolécules et la peroxydation lipidique des membranes (**Soni et al., 2014**).

Deuxième partie : Etude expérimentale

Plusieurs mécanismes ont été proposés aux activités anti-inflammatoires qui peuvent agir sur de nombreuses étapes des processus physiopathologiques (**Campos et al. 2016**).

On a évalué dans notre étude l'effet anti-inflammatoire de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel, en utilisant des modèles classiques de l'inflammation chez les rats. L'effet anti-inflammatoire a été comparé à celui du diclofénac sodique utilisé comme référence (**Mahgoub, 2002**).

L'inflammation est un processus complexe qui représente la réponse d'un tissu à une lésion locale et peut résulter d'une agression physique et chimique ou d'une invasion de microorganismes et se caractérise par des signes classiques (œdème, rougeur, chaleur, douleur et perte de fonction de l'organe) (**Essel et al., 2017**).

L'œdème induit par la carragénine (un mucopolysaccharide), représente un modèle empirique très utilisé dans les investigations concernant les inflammations aiguës. Les niveaux d'inflammation ont été retenus entre la 1^{ère} et les 24^{ème} heures après l'injection de la carragénine. Cette dernière induit un maximum d'œdème à partir de la 3^{ème} heure suivant son injection (**Elion Itou et al., 2014**).

L'œdème induit par la carragénine est un test couramment utilisé pour déterminer la phase aiguë de l'inflammation. Les premiers médiateurs de la phase précoce de ce type d'inflammation sont l'histamine, la 5- hydroxytryptamine et bradykinine (**Tanas et al., 2009**). Tandis que la phase tardive est attribuée à l'infiltration des leucocytes polymorphonucléaires et à la poursuite de la génération de prostaglandine (**Sadeghi et al., 2011**).

Le traitement des rats à la dose de (150mg/kg PC) conduit à une réduction significative de la taille de l'œdème en la comparant avec celle obtenue chez les témoins et identique au diclofénac sodique. Cela est expliqué probablement par l'inhibition de la libération des premiers médiateurs tels que l'histamine, la sérotonine, et les kinines. L'action à la deuxième phase peut être expliquée par une inhibition de la cyclooxygénase (**Ait El Cadi et al., 2012**).

Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec celles rapportés par (**Amezouar et al., 2013**). Ils ont montré que les feuilles d'*E.arborea* contiennent des composés bioactifs doués d'une forte activité antioxydante ainsi que des propriétés anti-inflammatoires intéressantes.

Deuxième partie : Etude expérimentale

Au cours de l'inflammation, les cellules inflammatoires y compris les neutrophiles et les macrophages sont activés. Les macrophages activés stimulent l'expression d'une série de gènes, impliqués dans la défense de l'hôte qui aboutit à la libération de différents médiateurs inflammatoires, les cytokines pro-inflammatoires, l'oxyde nitrique et la cyclooxygénase-2 etc (**Yoon *et al.*, 2009**).

La myéloperoxydase est une enzyme qui se trouve principalement dans les granules azurophiles des neutrophiles et qui a été largement utilisée comme marqueur biochimique de l'infiltration des granulocytes dans les tissus, y compris les tissus des pattes (**Chaves *et al.*, 2013**). Par ailleurs, l'activité de la MPO est considérée comme un marqueur sensible et spécifique de l'inflammation aiguë, car elle reflète l'infiltration des cellules polymorphonucléaires vers le parenchyme (**Loria *et al.*, 2008**).

Le prétraitement des rats par l'extrait BECC confirme qu'il a un effet anti-inflammatoire en conservant les taux du MDA et la MPO d'une façon significative et comparable à celle du diclofénac sodique. Les résultats obtenus dans cette étude sont similaires à celles rapportés par (**Hanfar *et al.*, 2017**). Ils ont montré que la plante *L.tingitana*, a une importante activité anti-inflammatoire.

Le CP est un composé inorganique contenant un atome du platine, doué d'un effet antinéoplasique à large spectre (**Daugaard et Abildgaard, 1989 ; Siddik, 2003**). Cependant de nombreux effets secondaires principalement la néphrotoxicité chez 25 à 30% des patients ont été cliniquement observés (**Saad *et al.*, 2009**).

Dans la présente étude, la néphrotoxicité par le CP était claire à cause des niveaux élevés de créatinine et de l'urée plasmatiques qui pourraient résulter d'un dysfonctionnement rénal, ce qui pourrait s'expliquer par la réduction de la filtration glomérulaire (**Yao *et al.*, 2007**).

La fonction rénale peut également être observée par l'interprétation au niveau de l'urée dans le plasma. Au cours du métabolisme des protéines dans le corps, le foie génère de l'ammoniac, qui est transformé en un sous- produit appelé urée. Les reins filtrent un excès d'urée au niveau du glomérule qui est ensuite éliminé dans l'urine, mais en raison d'un dysfonctionnement rénal, l'urée est libérée dans la circulation sanguine. Par conséquent, la concentration la plus élevée de l'urée dans le sang est proportionnelle à la gravité de l'atteinte rénale. La créatinine est principalement filtrée par les reins (Filtration glomérulaire et la sécrétion tubulaire proximale (**Silici *et al.*, 2010**).

Deuxième partie : Etude expérimentale

Il a été rapporté que le CP accumulé dans les cellules épithéliales tubulaire et atteint son niveau le plus élevé dans les cellules tubulaires proximales du cortex interne notamment dans le segment S3 (**Townsend *et al.*, 2003**) et pouvait former un métabolite réactif intracellulaire par hydratation des complexes de platine qui pourrait causer la néphrotoxicité chez l'homme (**Matsushima *et al.*,1998 ; Baek *et al.*,2003**).

L'administration du BECC a atténué d'une manière remarquable les augmentations de créatinine et l'urée plasmatique qui peut refléter la restauration de la fonction rénale, cet effet est comparable à celui de la vitamine E, considérée comme un contrôle positif.

La néphrotoxicité induite par le cisplatine est un processus complexe et de multiples mécanismes qui comprennent le stress oxydatif et l'inflammation (**Arany *et al.*, 2004 ; Jordan et Carmo-Fonseca,2000**).

L'altération des fonctions rénales pourrait être attribuée à l'effet toxique direct du CP sur les structures glomérulaires et tubulaires par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Cetin *et al.*,2006 ; Yao *et al.*,2007**).

Dans notre étude l'administration du CP produit du MDA dans le cortex rénal, affectant la structure cellulaire et la fonction cellulaire. La production du MDA a été associée à une série de changements tels que la déplétion du GSH, la réduction de l'activité des enzymes SOD, CAT, GP_x, et GST dans le cortex rénal. La diminution de l'activité de la SOD pourrait provoquer l'initiation et la propagation de la peroxydation lipidique chez le rat traité par le CP (**Davis *et al.*, 2001**). Il est bien connu qu'une peroxydation excessive des lipides augmente la consommation du GSH (**Karthikeyan *et al.*, 2007 ; Gonzales *et al.*,2005**). L'administration du CP cause des lésions rénales (**Townsend *et al.*, 2003 ; Wainford *et al.*, 2008**). Il a été indiqué que la néphrotoxicité du CP est initiée par l'inhibition de la synthèse protéique et l'appauvrissement en protéine porteuses des groupements SH (**Sadowitz *et al.*, 2003 ; Pabla et Dong,2008**). D'autre part la déplétion en GSH intracellulaire peut s'expliquer par la conjugaison du CP avec le GSH, qui conduit à des composés électrophiles détoxifiants. Ces composés passent ensuite dans le rein ou ils sont clivés par la γ -glutamyl-transpeptidase en composés conjugués cystéinyl-glycine sur la surface des cellules du tubule proximal (**Townsend *et al.*, 2003**). La dissociation d'un chlore de CP conduit à une charge positive sur le platine qui attirerait le soufre chargé négativement sur le fragment cystéine du GSH. Il a été rapporté que certains métaux lourds, y compris le CP, induisent des lésions rénales par génération de ROS (**Kawai *et al.*, 2006**), l'administration du CP dans différents

Deuxième partie : Etude expérimentale

modèles expérimentaux a entraîné la génération de $O_2^{\cdot-}$ dans le système cellulaire libre et chez les rats *wistar* males (**Masuda et al., 1994 ; Chirino et Chaverri, 2009**) et OH^{\cdot} Dans un système cellulaire libre et chez des rats *wistar* femelles et males (**Kadikoylu et al., 2004 ; Jiang et al., 2007**). La contribution du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans la néphrotoxicité induite par le cisplatine dans les cellules des tubules corticaux à été démontrée dans une étude précédente, principalement dans les cellules du segment S3 des tubules rénaux proximaux (**Tsutsumishita et al., 1998**). Ainsi, les enzymes CAT et GP_X qui détoxifient le peroxyde d'hydrogène pourraient être réduites (**Kadikoylu et al., 2004**). La réduction de l'activité des enzymes antiperoxydantes (CAT, GP_X) peut être attribuée à la génération accrue des ROS, qui à leur tour conduisent à l'inhibition de ces enzymes (**Gaetani et al., 1996**).

Le système glutathion (GSH- dépendantes GP_X GST) a significativement été diminuées dans le groupe cisplatine. La réduction des activités de GP_X et de GST pourrait être due à la diminution de la disponibilité de leur substrat GSH (**Karthikeyan et al., 2007 ; Ran et al., 2007**).

De même, l'étude histologique a appuyé les résultats biochimiques, la baisse des activités enzymatiques antioxydantes a été accompagnée d'une réduction remarquable de la taille des touffes capillaires glomérulaires et associée à la nécrose tubulaire proximale qui pourrait être liée au processus inflammatoire comme un autre mécanisme de néphrotoxicité induite par le CP (**Pratibha et al., 2010**).

L'administration de CP a augmenté l'activité MPO dans cortex rénal, montrant la migration polynucléaire améliorée (PN) dans le tissu du cortex rénal (**Tsuji et al., 1999 ; Ahmed El berry et al., 2012**).

L'effet rénoprotecteur de la BECC a été associé à la préservation de la concentration du GSH, la régulation, la hausse de l'activité du GP_X , la SOD et à la prévention du cortex rénal à partir d'une concentration accrue du MDA et du MPO.

Notre étude a également révélé que l'effet rénoprotecteur de la BECC était comparable à celui de la vitamine E, connu pour être l'antioxydant lipophile majeur présent dans les membranes cellulaires (**Packer et Landvik, 1989**). Ces résultats sont comparables avec des études antérieures qui ont rapporté que l'utilisation de la vitamine E en combinaison avec le traitement au sélénium améliore les effets secondaires du cisplatine en préservant le GSH

Deuxième partie : Etude expérimentale

rénal et l'activité de la GP_X chez les rats (Naziroglu *et al.* , 2004 ; Nematbakhsh et Nasri , 2013).

Notre étude phytochimique réalisée sur cette plante confirment la présence de nombreux composés bioactifs parmi lesquels l'acide caféique (10,07 mg/kg), l'acide chlorogénique (5,04 mg/kg), l'acide férulique (4,81 mg/kg) (Azzouzi *et al.*, 2016a) étant la concentration la plus élevée avec un effet antioxydant (Dos Santos *et al.*, 2006)

l'acide caféique s'avère abondant dans l'extrait de feuilles de *Centaurea choulettiana* Pomel *n-BuOH* comme est le cas avec l'acide phénolique (Azzouzi *et al.*, 2016a).

Ainsi, l'augmentation de cet effet néphroprotecteur du BECC semble due à l'activité antioxydant exercée par l'acide phénolique acide caféique, acide chlorogénique, acide férulique qui sont tous contenu dans le BECC. Ces composés sont considérés comme étant briseurs de chaîne antioxydants, agissant par l'intermédiaire d'une activité de piégeage des radicaux qui pourrait être attribuée à leur aptitude à donner de l'hydrogène ou des électrons (Azzouzi *et al.*, 2016a ; Farah *et al.*, 2008).

Ces résultats sont en accord avec ceux de (Ozen *et al.*, 2004) qui ont montré que l'ester phénéthylique de l'acide caféique est un réducteur puissant du stress oxydatif dans l'endommagement tubulaire induit par le CP et qui confère une bonne néphroprotection.

Conclusion et perspective

Conclusion et perspectives

Dans la présente étude l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana Pomel* possède une quantité remarquable en produit naturel représenté par polyphénols et flavonoïdes.

La toxicité induite par l'injection intra péritonéal d'une dose de 8mg/kg PC de cisplatine a été évidente. Cet anticancéreux est susceptible de causer une altération au niveau du rein suite à une production excessive des radicaux libres ce qui se répercute sur le statut redox intracellulaire au profit des prooxydants. En effet, une diminution significative du système de défense antioxydant (CAT, GST, SOD, GP_X,) et GSH a été enregistrée, alors que le taux du MDA a connu une augmentation significative. Tans dis que la néphrotoxicité s'est installée a cause de l'augmentation des ses indicateurs créatinine et urée.

D'autre part Le prétraitement des souris par l'extrait *n-BuOH* de la plante (150 mg / kgPC) et la vitamine E (100mg/kg PC) pendant 10 jours rétablissent les niveaux des paramètres biochimique et MDA, suivi d'un retour a l'activité normal des enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GPX, et GST) et du GSH. La protection histopathologique a été clairement confirmée par la réduction du taux de MPO rénale.

En conclusion ces résultats ont prouvé l'existence du potentiel rénoprotecteur de l'extrait de la plante, qui a amélioré la fonction rénale suite au traitement par le cisplatine.

Nous estimons que nos résultats sont semblables à des études précédentes, néanmoins ces résultats doivent être appuyés par des études moléculaires pour pouvoir déterminer à quel niveau ces molécules peuvent agir.

Références bibliographiques

Références bibliographique

- **Abdelrahman, AM., Al-Salam S., AlMahruqi ,AS., Al-husseni, IS., Mansour ,MA., Ali, BH. (2010).**N-acetylcysteine improves renal hemodynamics in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. *J Appl Toxicol*, 30: 15-21.
- **Aebi ,H. (1984).** Catalase in vitro. *Method Enzymol*. 105:121-126.
- **Ahmed Elberry, MD. , Mohamed Wagih ,MD., Amr Zahra, MD. (2012).** Oxytocin Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Wistar Rats. *Med. J. Cairo Univ*, 80 (2): 61-67.
- **Ait El Cadi M., Makram S., Ansar, M., et al. (2012).** Anti-inflammatory activity of aqueous and ethanolic extracts of *Zygophyllum gaetulum*. *Ann Pharm Fr*, 70:113-116.
- **Ajith ,TA., Usha ,S., Nivitha, V. (2007).** Ascorbic acid and alpha tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice : a comparative study. *Clin Chim Acta*, 375:82–86.
- **Aktumsek, A., Zengin, G., Guler, GO., Cakmak, Y. S., Duran, A . (2013).** Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 290–296.
- **Alderden ,R., Hall ,M., Hambley, T., et al. (2006).** The discovery and development of cisplatin. *Journal of chemical education*, vol. 83, n°5, p. 728-734.
- **Amezouar, F., Badri,W., Hsaine,M., et al. (2013).**Évaluation des activités antioxydante et anti in- flammatoire d'*Erica arborea L.* Du Maroc.*Pathol Biol*, 61:254-258.
- **Andrews, PA., Albright ,KD. (1992).** Mitochondrial defects in is diammine dichloroplatinum (II)-resistant human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res* 52:1895-901; PMID: 1551118.
- **Antunes, LMG., Darin, JDC., Bianchi ,Nde L. (2001).** Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res*, 43 (2): 145-150.
- **Arany, I., Megyesi ,JK., Kaneto, H., Price, PM., Safirstein, RL. (2004).** Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signalling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287 (3): F543-F549.
- **Arany, I., Safirstein, RL. (2003).**Cisplatine nephrotoxicity. *Semin Nephrol*; 23:460-664.

Références bibliographiques

- **Arhoghro, EM., Kpomah, DE., Uwakwe, AA. (2012).** *Ocimum gratissimum* aqueous extract enhances recovery in cisplatin - induced nephrotoxicity in albino Wistar rats. *Indian J Drugs Dis*, 1 (5): 129-142.
- **Azzouzi, D, Bioud ,K, Demirtas ,I, Gul ,F., Sarri ,D., Benayache, S, Benayache, F, Mekkiou ,R.(2016).** Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Extracts. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19: 1-6. (a).
- **Azzouzi ,D, Mekkiou, R, Chalard, P, Chalchat, JC, Boumaza, O, Seghiri, R, Benayache F, Benayache S. (2016).** Essential oil composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria. In *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8 (9): 1545-1548. (b).
- **Azzouzi ,D. (2017).** Investigation phytochimique et recherche d'activité biologique de deux espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae). Thèse de doctorat université Mentouri Constantine 1.
- **Badary ,OA., Abdel Maksoud ,S., Ahmed, WA., Owieda ,GH.(2005).** Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci*, 76:35-2125.
- **Baek ,SM., Kwon, CH., Kim, JH., Woo, JS., Jung, JS., Kim, YK. (2003).** Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med*, 142: 178-186.
- **Baliga ,R., Ueda, N., Walker, PD., Shah, SV. (1999).** Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev*;31:971-97.
- **Barbas,k ., Milner,R ., Turie,D ., Adin,C .(2008).** Cisplatin : a review of toxicities and therapeutic application. *Veterinary and Comparative Oncology*,6 : 1-18.
- **Barber ,DA., Harris, SR. (1994).** Oxygen free radicals and antioxidants :A review.*J.Am.Pharmacol.*534,26-35.
- **Bare ,B., Smeltzer, S., Sholtis ,B L., Suddarth, D S. (2011).** Soins infirmiers en médecine et chirurgie 4: Fonctions rénale et reproductrice.5^{ème} édition. *Édition De boek. Bruxelles*.P 1647.
- **Barouki, R. (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences*, 22 :266-72
- **Bartos, G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems.*Comments on Toxicology*. 9: 5-21.
- **Baudin ,B. (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires.*Mt cardio* ,2 (1) : 43-52.

Références bibliographiques

- **Bennett, WM. (1997).** Drug nephrotoxicity: an overview. *Renal failure*, 19 (2):221- 4.
- **Bentefrit ,F. (1996).** Analogues du cisplatine: quelques composés formés par le platine (II) et (IV) ou palladium (II) avec deux médicaments de la famille des biguanides (metformine et proguanil), thèse de l'Université PARIS XI.
- **Bhagat, J., Lobo ,R., Parmar, V., et al. (2011).** *In vitro* free radical scavenging potential of Indian habitant *Anisochilus carnosus* (L. F.) Wall [J]. *Chin J Nat Med*,
- **Blanchard, A., Rosa, P., Pascal, H. (2008).**Exploration des fonctions tubulaires rénales. *Néphrologie &Thérapeutique* 5 :68-83.
- **Blois, M S (1958).** Antioxidants determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 : 1199–1200.
- **Borg ,JM., Reeber, A. (2008).**Biochimie métabolique, Ellipses, France, pp: 257-269.
- **Bradley, PP., Priebat, DA., Christensen, RD., Rothstein, G.(1982).**Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 78, 206-209.
- **Brahmi, D., Ayed ,Y., Hfaiedh, M., Bouaziz ,C., Ben Mansour, H., Zourgui, L and Bacha, H. (2012).** Protective effect of cactus cladode extract against cisplatin induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in balb/c mice: combination with phytochemical composition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12:111.
- **Burton, GW.,Traber ,MG., Acuff, RV.,et al. (1998).** Human plasma and tissue lphatocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural andsynthetic vitamin E. *Am J Clin nutr.*67: 669-684.
- **Cadet, J., Bellon, S., Berger ,M., Bourdat, AG., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat ,JL., Sauvaigo, S.(2002).**Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases, *Biol. Chem*, 383(6):93.
- **Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., (2004).** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 74, 2157–2184.
- **Campos, JKL., Araújo, CSF., Araújo, TFS., Santos, AFS., Teixeira, JA., Lima, VLM., Coelho, LCBB. (2016).** Antiinflammatory and antinociceptive activities of Bauhinia monandra leaf lectin. *Biochim Open*. 2:62–68.

- Čanadanović-Brunet, J., Ćetković, G., Šaponjac, V.T., Stajčić, S., Vulić, J., Djilas, S., *et al.* (2014). Evaluation of phenolic content, antioxidant activity and sensory characteristics of Serbian honey-based product. *Ind Crop Prod*, 62:1–7.
- Cetin, Devrim, E., Kılıçoğlu, B., Avcı, A., Çandır, Ö., and Durak, I. (2006). Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol*, 26:42-46.
- Chaves, L D S., Nicolau, L A D., Silva, R O., Barros, F C N., Freitas, A L P., Aragao, K S., Ribeiro, R D A., Souza, M H L P., Barbosa, A L D R., and Medeiros, J V R. (2013). Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35(1): 93–100.
- Chirino, YI., Chaverri, JP. (2009). Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp and Toxicol Pathol*, 61: 223-242.
- Cillard, J., Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *OCL VOL. 13 N° 1*.
- Combs, GF. (2001). Selenium in global food systems. *Br J Nutr*; 85:517-47.
- Cook, NC., Samman, S., (1996). Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Nutr. Biochem.*, 7, 66-76.
- Dasari, S., Tchounwou, PB. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 5; (0) :364–378.
- Daugaard, G., Abildgaard, U. (1989). Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother. Pharmacol*, 25:1-9.
- Davis, CA., Nick, HS., Agarwal, A. (2001). Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol*, 12: 2683-2690.
- Defraigne, JO., Pincemail, j. (2008). Stress oxydant et antioxydants: mythes et réalités. *Rev Med Liège*, 63 : 10-19
- Del Corso, L., Pastine, F., Protti, MA. Romanelli, AM., Moruzzo, D., Ruocco, L., Pentimone, F. (2000). Blood zinc, copper and magnesium in aging. A study in healthy homeliving elderly. *Panminerva Med*. 42:273-7.
- Delacourte, A., Champion, D., Davous, P. (2007). Maladie d'Alzheimer. *EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Neurologie*, 17-056-A-15.

Références bibliographiques

- **Derbel, S., Ghedira, K. (2005).** Les phytonutriments et leur impact sur la santé. Springer, 1 : 28-34.
- **Desoize, B. (1994).** Anticancer drug resistance and inhibition of apoptosis. *Anticancer Res* 14:2291-4; PMID: 7825961.
- **Desport, J C., Couratier, P. (2002).** Stress oxydant et maladies neurodégénératives. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16 : 253–259.
- **Devasagayam ,TPA., Tilak, JC., Bolor, KK., Sane, KS., Ghaskadbi, S., Lele, RD., (2004).** Free radicals and antioxidants in human health:current status and future prospects. *J Assoc Physic India*, 52, 794-804.
- **Dickey, DT., Muldoon, LL., Doolittle, ND., Peterson, DR., Kraemer ,DF., Neuwelt, EA. (2008).** Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62: 235-241.
- **Dobyan, DC. Levi, J., Jacobs, C., Kosek, J., Weiner, MW. (1980).** Mechanism of cisplatin nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J Pharmacol Exp Ther*, 213: 6-551.
- **Dos Santos, MD., Almeida, MC., Lopes, NP., De Souza, GE. (2006).** Evaluation of the antiinflammatory, analgesic and antypiretic activity of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull*, 2006; 29: 2236-2240.
- **Duan, X., Wu G., Jiang, Y. (2007).** Evaluation of antioxidant properties of phenolics from litchi fruit in relation to pericarp browning prevention. *Molecules*, 12 :759–771.
- **Durand, D. (2003).** Néphropathies vasculaires. *Collège Universitaire des Enseignants de Néphrologie*. Res 14:2291-4; PMID: 7825961.
- **Eastman, A. (1986).** Reevaluation of interaction of cisdichloro (ethylenediamine) Platinum (II) with DNA. *Biochemistry* 25:3912-5; PMID: 3741840.
- **El-Abdellati, E., Eyselbergs, M., Sirimsi, H., et al. (2013).** An observational study on rhabdomyolysis in the intensive care unit. Exploring its risk factors and main complication: acute kidney injury. *Ann Intensive Care*; 3:8.
- **ElionItou, RDG., Sanogo, R., EtouOssibi, AW., et al. (2014).** Anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous extract of stem bark of *Ceiba pentandra* Gaertn. *Pharmacol Pharm*. 2014; 5:1113-1118.
- **Essel, L B ., Obiri, D D ., Osafo ,N ., Antwi, A O ., and Duduyemi, B M. (2017).** The Ethanolic Stem-Bark Extract of *Antrocaryon micraster* Inhibits Carrageenan-Induced

Références bibliographiques

Pleurisy and Pedal Oedema in Murine Models of Inflammation. *International Scholarly Research Notices*, 2017 :1-11.

- **Faller, A., Sprumont, P., Schünke, M. (2004).** Le corps humain. 5^{ème} édition. Édition De boek. Bruxelles. P 345.
- **Fang, Y., Yang, Z., Wu, SG. (2002).** Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, Vol 18:872–879.
- **Farah, A., Monteiro, M., Donangelo, CM., Lafa, Sophie. (2008).** Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J. Nutr*, 138: 2309-2315.
- **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant, intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. pp: 108-115.
- **Favier, A. (2006).** Oxydative stress in human diseases. *Ann.Pharm.Fr.* 64: 390-396.
- **Floege, J., Johnsson, RJ., Feehally.(2010).** Comprehensive clinical nephrology J. Mosby Elsevier. 4^e édition.
- **Font Quer ,P. (1995).** Plantas Medicinales. El Dioscorides Renovado. *Fifteenth ed. Editorial Labor S.A., Madrid.*
- **Francescato, HDC., Coimbra ,TM., Costa, RS., Bianchi, MP.(2004).** Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. *Kidney Blood Press Res*, 27: 148-158.
- **Gal Morgane, Le., Jeanguiot, Nicole (2010).** Comprendre une situation clinique par l'anatomie-physiologie. *Edition ESTEM. Paris.* P 116.
- **Gaetani, G., Ferraris, A., Rolfo ,M., Mangerini, R., Arena, S., Kirkman, H.(1996).** Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 87:1595-1599.
- **Ganong, W (2003).** Physiologie médicale. 2^{ème} édition. *Edition De boek.* P 427.
- **Gardès-Albert ,M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., Jore ,D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique *L'actualité chimique, - novembre-décembre* pp: 91-96.
- **Gauthier, TH., Wauters, JP. (2000).** Les néphrites interstitielles aiguës. *Rev Med Suisse*, vol , 4 : 20361
- **Georgé, S., Brat ,P., Alter, P., Amiot, JM. (2005).** Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem.* 53:1370-1373

Références bibliographiques

- **Gerard-Monnier ,D., Chaudiere, J. (1996).**Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol Biol*.Vol 44: 77-85
- **Ghedira, K. (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* ,4: 162-169.
- **Giacco ,F., Brownlee, M. (2010).** Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* ,**107**: 1058-70.
- **Godin ,RD. (2010).** La filtration glomérulaire et sa régulation, physiologie rénale. Université Joseph fourier.Grenoble France. www.meditice-grenoble.fr. Février 2011.
- **Gonzalez, AG., Bermejo, J., Caberar,I., Galido, A., Masenet ,GM. (1977).** Sesquiterpene lactones from *Centaureaalba* and *C. conifer*. *Annquim*, 73-86.
- **Gonzales, R., Romay, C., Borrego, A., Hernandez, F., Zamora, Z., Rojas, E.(2005).** Lipid peroxides and antioxidant enzymes in cisplatin chronic nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm*, 3: 139-43.
- **Gueguen, Y^a., Rouas ,C^a., Leblond, F A^b. (2012).**Les biomarqueurs d'atteinte rénale. *Néphrologie & Thérapeutique*, 8 :146–155.
- **Gueutin, V., Deray ,G., Isnard-Bagnis, C., Janus ,N. (2011).**La hysiologie rénale.*J Pharm Clin*,30 (4) ;pp :209-14.
- **Gueutin ,V., Deray, G., Isnard-Bagnis, C.(2012).**Physiologie rénale.*Bull Cancer* ,99 ; pp.237-49.
- **Habig, WH., Pabst, MJ., Jakoby ,WB. (1974).**Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J BiolChem*, 249: 7130-7139.
- **Haleng, J ., Pincemail, J., Defraigne, J O ., Charlier ,C ., Chapelle ,J P.(2007).** Le stress oxydant. *Rev Med Liege*, 62 (10) : 628-638.
- **Halliwell ,B. (2006).** Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide. *Trends in biochemical sciences*.31 (9):509-515.
- **Halliwell, B. (1997).** Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* ,Vol 55:44–49.
- **Hanfer, M ., Cheriet ,T ., Ammedah, S ., Mancini ,I ., Seghiri ,R ., Menad, A ., Benayache ,S .& Benayache, F . (2017).**Iridoids and anti-inflammatory properties of nbutanol extract of *Linaria tingitana* Boiss. *Reut.Natural Product Research*.
- **Harman ,D. (2000).** Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci...*Vol 928:1–21.
- **Hélardot ,D., Berl, M., Rébillon ,M., Roussely, B. (2006).**Guide concours infirmier(e) Anesthésiste Spécialisation santé 3^{ème} édition. *Masson*, p64.

Références bibliographiques

- **Hennebelle, T., Sahpaz,S.,Bailleul,F. (2004).**Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Springer-Verlag*, 1 :.3-6.
- **Hervé ,G., Bioulac, B.,Boisseau, M R., Carré, F., Mainard, J D., Devillier ,P., Hanoune ,J ., Harf, A., Lacour, JR., Lamour ,Y., Nour ,R L., Lévy ,B., Marthan ,R., Mion ,F., Paillard, M., Swynghedauw, B., Varéne, P., Vincent ,JD. (2001).** *Physiologie humaine. 3^{ème} édition. Édition Pradel.* P : 267.
- **Huang ,D., Ou ,B., & Prior, R L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 : 1841–1856.
- **Jacobs ,C., Kalman ,SM., Tretton ,M., Weiner, MW. (1980).** Renal handling of cisdiamine- dichloroplatinum (II).*Cancer Treatment Reports*; 64: 1223-1226.
- **Jamieson, ER., Lippard ,SJ (1999).**Structure, recognition and processing of cisplatine-DNA Adducts; *Chem Rev*, 99: 2467-2498.
- **Jiang, M., Wei ,Q., Pabla ,N., Donga ,G., Wang, CY., Yang, T., Smitha, SB., Dong, Z. (2007).** Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*, 73: 1499-1510.
- **Jing ,L ., Ma, H ., Fan, P ., Gao, R ., and Jia ,Z. (2015).** Antioxidant potential, total phenoliand total flavonoid contents of Rhododendron anthopogonoides and its protective effect on hypoxia-induced injury in PC12 cells. *Complementary and Alternative Medicine* : 15:287.
- **Jordan, P., Carmo-Fonseca, M. (2000).** Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*, 57:1229-1235.
- **Kadikoylu, G., Bolaman ,Z., Demir, S., Balkaya ,M., Akalin, N., Enli, Y. (2004).** The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol* ,23: 29-34.
- **Kaij-A-Kamb, M, Amoros, M, Girrel, L. (1992).** Chemistry and biological activity of the genus Centaurea. *Pharma ActaHelv*, 67: 178-188.
- **Karthikeyan ,K., Sarala ,Bai BR., Niranj ali Devaraj, S. (2007).**Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Int J Cardiol*, 115: 326-333.
- **Kawai ,Y., Nakao ,T., Kunimura, N., Kohda, Y., Gemba, M. (2006).** Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100, 65-72.

Références bibliographiques

- **Khammar ,A., Djeddi, S. (2012).**Pharmacological and Biological Properties of some *Centaurea* Species. *European Journal of Scientific Research*, 84(3): 398-416.
- **Krishnamachari, V., Levine, L.H., Pare, P.W. (2002).** Flavonoid oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging. *J. Agric. Food Chem.* 50, 4357-4363.
- **Kuhad ,A., Tirkey ,N., Pilkhwai, S., Chopra, K. (2006).** Renoprotective effect of *Spirulina fusiformis* on cisplatin-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Renal. Failure*, 28:54-247.
- **Kuhlmann, MK., Burkhardt, G., Kohler, H. (1997).** Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant*; 12: 2478-80.
- **Lacour, B. (2013).** Physiologie des reins et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Revue francophone des laboratoires*. P 25-36.
- **Lagou, DA¹., Ackoundou-N'Gyessan ,C¹., Koulia ,F¹., Coulibaly, N²., Tia ,MW¹., Guei, CM¹., Coulibaly, PA¹., Gnionsahe ,DA¹. (2018).**Pronostic des néphropathies obstructives chez les patients admis au service de néphrologie au CHU de Yopougon de 2008-2013. *Uro 'Andro*,vol ;1(9).
- **Leriverend, H. (2016).**Insuffisance rénale et néphrotoxicité médicamenteuse. *Actualités pharmaceutiques* n° 557.
- **Li ,HB., Cheng, KW., Wong, CC., et al. (2007).**Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chem.*, 102:771-776.
- **Li, J., Feng, Q., Kim, JM., et al. (2001).** Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins. *Endocrinology* 142:370-80
- **Lieberthal, W., Triaca ,V., Levine ,J. (1996).** Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol*, 270: F 700-708.
- **Livio ,F. (2002).**Prévention et traitement de l'insuffisance rénale aiguë : rôle des traitements diurétiques. *Rev Med Suisse* vol ; 2. 22122.
- **Lord ,A ., Ménard, C. (2002).**La néphrotoxicité médicamenteuse.*Le Médecin du Québec*, vol 37, (6).

Références bibliographiques

- **Loria ,V., Dato ,I., Graziani, F., Biasucci ,LM. (2008).** Myeloperoxidase: A new biomarker of in- flammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediat Inflamm*, ID135625:1-4.
- **Luo ,J., Tsuji, T., Yasuda ,H., Sun, Y., Fujigaki, Y., Hishida, A.(2008).** The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 23:2198-2205.
- **Maataoui, BS., Hmyene, A., Hilali ,S. (2006).** Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (opuntia ficus indica). *Lebanese Sci J*, 7:3-8.
- **Mabberley, DJ. (1987).** The Plant Book.Cambridge University Press,
- **Mahgoub, AA. (2002).** Grapefruit juice potentiates the anti-inflammatory effects of diclofenac on the carrageenan-induced rat's paw oedema. *Pharmacol Res*, 45:1-4.
- **Maliakel, DM., Kagiya, TV., Nair ,CK. (2008).** Prevention of cisplatin- induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Exp Toxicol Pathol*, 60 (6): 7-521.
- **Mandic ,A., Hansson, J., Linder, S., et al. (2003).** Cisplatine induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* 278:9100-6; PMID: 12509415.
- **Mansour ,HH., Hafez, FH., Nadia, MF. (2006).** Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Biol*, 39:61- 656.
- **Manuelle, Christelle (2008).** Les 5 fonctions vitales du corps humain. *Édition Lamare*. France. P 186, 187, 189, 191.
- **Marchal, A ., coll. (1994)** Maladie rénale de l'adulte compréhension, diagnostic, traitement. *EDITION Ellipses*. Paris. p30.
- **Marfak, A., (2003).** Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec les Radicaux issus des Alcools: Formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de LIMOGES. p 187.
- **Marieb ,EN. (2008)** Biologie humaine. Principes d'anatomie et physiologie. *Pearson éducation*. 8^{ème} édition. France. P547
- **Marklund, S., Marklund, G. (1974)**Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*; 47:469.

- **Masso, J.L., Bertran, M.N., Adzet, T. (1979).** Contribution to the chemical and pharmacologic study of some species of *Centaurea* (Compositae). *Plant Med. Phytother*, 13: 41-45.
- **Masuda, H., Tanaka, T., Takahama, U. (1994).** Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun*, 203: 80-1175.
- **Matsushima, H., Yonemura, K., Ohishi, K., Hishida, A. (1998).** The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med*, 131: 518-526.
- **Matzke, G.R., Frye, R.F. (1997)** Drug administration in patients with renal insufficiency: minimizing renal and extra renal toxicity. *Drug Safety*; 16 (3): 205-31.
- **Medjroubi, K., Benayache, F., Bermejo, J. (2005).** Sesquiterpene lactones from *Centaurea musimomum*. Antiplasmodial and cytotoxic activities. *Fitoterapia*, 76 :744–746.
- **Mellal, Ahmed (2010).** Application pratique de l'anatomie humaine: Viscères du tronc. *Edition EPU*. P 211, 219.
- **Mezzetti, A., Pierdomenico, S.D., Costantini, F., et al. (1998).** Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases *Free. Rad Biol Med*, 25,676-681.
- **Mona, F., Mahmoud, Shima, M, El Shazly (2013).** Pioglitazone protects against cisplatin induced nephrotoxicity in rats and potentiates its anticancer activity against human renal adenocarcinoma cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 51 ; 114–122.
- **Montagnier, L., Olivier, R., Pasquier, C. (1998).** Oxidative stress in cancer, AIDS and neurodegenerative diseases, Marcel Dekker, New York.
- **Mora, L.O., Antunes, L.M., Francescato, H.D., Bianchi, M.L.P. (2003).** The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*, 47: 517-522.
- **Mosquera, O M., Correa, Y M., Buitrago, D.C., & Niö, J. (2007).** Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 : 631–634.
- **Moussaoui, B. (2010).** Thèse de Magister, Constantine1.
- **Moueller, M., Hobiger, S., Jungbauer, A. (2010).** Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry*, 122 :987–996.
- **Nasr, A Y., Saleh, H AM. (2014).** Aged garlic extract protects against oxidative stress and renal changes in cisplatin-treated adult male rats *Cancer Cell International*, 14:92.

Références bibliographiques

- **Naziroglu ,M., Karaogl ,A., Aksoy, AO. (2004).**Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*, 195:30-221.
- **Nematbakhsh ,M., Nasri ,H. (2013).**The effects of vitamin E and selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: A randomized, placebo-controlled study. *J Res Med Sci*, 18: 626-627.
- **Nguyen, Sy Hung., Bourouina ,Redha., Claude, Anne., Pfister, Allin (2008).** Manuel d'anatomie et de physiologie. 4^{ème} édition. Édition Lamare. France. P 51.
- **Niaudet, P.(2005).**Signes cliniques et biologiques des néphropathies glomérulaires. *EMC-Pédiatrie*, 2 :12–30.
- **Ohinishi, M., Morishita, H., Iwahashi ,H., et al. (1994).** Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry*. 36:579-583.
- **Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi ,K. (1979).**Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.*, 95:351-358.
- **Ordonez , AAL., Gomez, JD., Vattuone, MA.,Isla, MI.(2006).**Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq) swart extracts. *Food Chem.*; 97: 452-458.
- **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr*, 44:307-15.
- **Ozen, S., Akyol ,O., Iraz, M., Sogut, S., Ozugurlu, F., Ozyurt ,H., Odaci, E., Yildirim ,Z. (2004).**Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol*, 2004; 24: 27-35.
- **Pabla ,N., Dong, Z. (2008).** Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*, 73 (9): 994-1007.
- **Packer ,L., Landvik ,S. (1989).** Vitamin E: introduction to biochemistry and health benefits. *Ann N Y AcadSci*, 570: 1-6.
- **Pal Yu, B. (1994).** Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiopathological Reviews*. 74: 139-155.
- **Petropoulos ,I. (2003).** Stress oxydant et vieillissement modifications oxydatives des protéines au cours du vieillissement.Diderat.Paris.p5.
- **Peyrone ,M. (1844).**Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür », *Ann Chemie Pharm*, vol. 51(1) : 1- 29.

Références bibliographiques

- **Peyrot ,V., Briand, C., Momburg ,R., et al. (1986).** In vitro mechanism study of microtubule assembly inhibition by cis-dichlorodiammine-platinum (II). *Biochem. Pharmacol* 35:371-5;PMID: 3947376.
- **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux ,K., Defraigne, JO. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et Métabolisme*, 16 : 233-239.
- **Posadas ,I., Bucci ,M., Roviezzo, F., et al. (2004).** Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol.*; 142:331-338.
- **Pratibha ,R., Bhiwgade, DA., Kulkarni ,S., Rataboli ,PV., Dhume, CY. (2010).** Cisplatin induced histological changes in renal tissue of rat. *J Cell Animal Biol*, 4 (7):108-111.
- **Priyadarsini ,KI., (2005).** Molecular Mechanisms Involving Free Radical Reactions of Antioxidants and Radio protector. Founder's Day Special Issue.15:1-6.
- **Quezel, P., Santa, S. (1963).** Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 2. Ed. CNRS, Paris France.
- **Rahman ,K. (2007).**Studies on free radicals, antioxidants , and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*. 2(2) :219–236.
- **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, 7389-7394.
- **Ran ,Q., Liang, H., Ikeno ,Y., Qi, W., Prolla, TA., Roberts, LJ., Wolf, N., Van Remmen, H., Richardson A. (2007).**Reduction in glutathione peroxidase increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J Gerontol BiolSci Med Sci*, 2007; 62: 932-942.
- **Ramé ,A., Thérond, S (2007).**Anatomie et physiologie.l'appareil urinaire. *Paris : masson, 4eme edition*. p251.
- **Raymond, G., Michel, A., Fernan ,B., Guy, CH., André, P., Philip, S. (2004).***Physiologie animale*. ISBN-2-8041-4893-9.
- **Rosenberg ,B (1978).** Platinum complex-DNA interactions and anticancer activity; *Biochimie*, 60: 859-867.
- **Rosenberg, b., vancamp, l., krigas, t. (1965).** Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205:698–699.
- **Rotruck, JT., Pope ,AL., Ganther, HE., et al. (1973).** Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.*; 179:588-590.

Références bibliographiques

- **Roussel ,AM., Ferry, M. (2002).**Stress oxydant et vieillissement. *Nutrition clinique et métabolisme* ,16 : 285–291.
- **Rybak, LP., Husain, K., Morris, C., Whitworth, C., Somani ,S.(2000).**Effect of protective agents against cisplatin ototoxicity. *Am J Otol*, 21 :513-520.
- **Rybak, LP. Ramkumar, V.(2007).** Ototoxicity. *Kidney Int*, 72: 931-935.
- **Rybak,LP., Whitworth, CA. (2005).** Ototoxicity: therapeutic opportunities. *Drug Discov.Today*, 10 :1313-1321
- **Sadeghi ,H., Hajhashemi, V., Minaiyan ,M ., Movahedian ,A ., Taleb ,A . (2011).** A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. *European Journal of Pharmacology*, 667 :396–401.
- **Sadowitz ,PD., Hubbard, BA., Dabrowiak ,JC., Goodisman ,J., Tacka, KA., Aktas ,MK., Mora, LO., Antunes ,LMG., Francescato, HDC., Bianchi, MLP. (2003).** The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*, 47: 517-522.
- **Salganik ,RI. (2001).**The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J. Am. Coll. Nutr*, 20: 464S-472S.
- **Santos, NA., Catão ,CS., Martins, NM., Curti ,C., Bianchi, ML., AC. (2007).** Cisplatin induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol*, 81: 495-504.
- **Scott, J., Bradbury ,R. (1994).** Pharmacokinetic dosing of carboplatine; *Fla J Hosp Pharm*, 14: 17-18.
- **Sedlak, J., Hanus, L. (1982).**Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. *Endocrinol Exp*; 16 (2): 103-109.
- **Sen ,S., Chakraborty, R. (2011).**The role of antioxidants in human health. In: Silvana A, Hepel M, ed. *Oxidative Stress: Diagnostics Prevention, and Therapy*, ACS Symposium Series [M]. Washington, DC: American Chemical Society: 1-37.
- **Sen, S., De, B ., Devanna, N ., Chakraborty, R .(2013).**Total phenolic, total flavonoid content, and antioxidant capacity of the leaves of *Meyna spinosa* Roxb., an Indian medicinal plant.*Chinese Journal of Natural Medicines*,11(2): 0149–0157.

- **Sener, M T., Sener, E., Tok ,A., Polat, B., Cinar, I., Polat ,H., Akcay, F., Suleyman, H.(2012).** Biochemical and histologic study of lethal cisplatin nephrotoxicity prevention by mirtazapine. *Pharmacol Rep*, 64 (3):594-602.
- **Sharma, S., PalVig, A. (2014).** Preliminary Phytochemical Screening and In Vitro Antioxidant Activities of Parkinsonia aculeata Linn. *BioMed Research International*
- **Sherwood ,(2006).** *Physiologie humaine. 2eme édition. Edition de boeck.* Bruxelles. P 406.
- **Shirwaikar ,A., Patel ,B., Kamariya ,Y., et al. (2011).**In vitro free radical scavenging potential of defatted ethanolic extract of the seeds of *Lepidium sativum* Linn. [J]. *Chin J Nat Med*, 9(6): 435-440.
- **Siddik, ZH. (2003).** Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22: 7265-7279.
- **Sies ,H. (1997).** Antioxidant in disease mechanisms and therapy, *Advances in Pharmacology, Academic Press, New York*, 38.
- **Silici ,S., Ekmekcioglu ,O., Kanbur ,M., Deniz ,K. (2010).** The protective effect of royal jelly against cisplatin -induced renal oxidative stress in rats. *World J Urol* ,29: 127–132.
- **Silverthorn ,Dee Unglaub. Physiologie humaine. (2007).** Une approche intégrée *Pearson Ed. 4e édition*,
- **Simonian ,PL., Grillot, DA., Nunez, G. (1997).** Bcl-2 and Bcl-XL can differentiallyPharmacology, *Academic Press, New York*, 38.
- **Sohal, RS., Mockett, RJ., Orr ,WC.(2002).** Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, *Free Rad. Biol. Med*, 33(5):575.
- **Soni ,R K .,Irchhiya ,R ., Dixit, V ., Bhat ,Z A ., Wani ,H A ., Najar, A H.(2014).** Anti-inflammatory activity of Kirganella reticulata (POIR). Baill. Root by carrageenan – induced rat paw oedema model. (2014). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 : 1-4.
- **Sorg, O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. 327: 649-662.
- **Srivastava, S., Singh ,P., JhaK ,K.,et al. (2013).**Antiinflammatory,Analgesic and Antipyretic Activities of Aerial Parts of *Costus speciosus* Koen. *Indian J Pharm Sci.*;75:83-88.
- **Stahl ,W., Sies ,H. (1997).**Antioxidant Defense: Utamins E and C and Carotenoids *.Diabetes*, 46:14-18.
- **Stief ,TW. (2003).** The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth.*

Vol 60:567–572.

- **Sueishi ,K ., Mishima ,K ., Makino, K ., Itoh ,Y ., Tsuruya, K ., Hirakata, H ., Oishi ,R. (2002).** Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *European Journal of Pharmacology* 451 :203– 208.
- **Sweetman, SC. (2002).** Antineoplastic and immunosuppressant. The Complete Drug Reference, 33rd ed. *Pharmaceutical Press, London, UK.* pp. 516–517
- **Tanas ,S ., Odabasoglu ,F., Halici, Z., Cakir ,A ., Aygun ,H ., Aslan, A ., Suleyman H. (2009).** Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species in acute and chronic inflammation models. *J Nat Med*, (2010) 64:42–49.
- **Townsend, DM., Deng ,M., Zhang, L., Lapus ,MG., Hanigan , MH. (2003).** Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*, 14:1-10.
- **Tsutsumishita ,Y., Onda, T., Okada ,K., Takeda, M., Endou ,H., Futaki, S Niwa M. (1998).**Involvement of H₂O₂ production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 242 (2): 310-312.
- **Wainford, RD., Weaver, RJ., Stewart, KN., Brown ,P., Hawks-worth, GM. (2008).** Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology*, 249: 93-184.
- **Waness ,A., Bahlas, S., Al Shohaib ,S. (2008).** Simvastatin-induced rhabdomyolysis and acute renal injury. *Blood Purif*; 26:394-8.
- **Wei, HX., Gao ,W Y., Tian ,YK., Guan,YK., Huang ,MH., Cheng,DL. (1997).** New Eudesmane Sesquiterpene and Thiophene Derivatives from the Roots of *Rhaponticum uniflorum*. *Pharmazie*, 52 : 245–247.
- **Weinberg, JM. (1993).** The Cellular Basis of Nephrotoxicity. Dans: Schrier RW, Gottschalk CW, editors. *Diseases of the Kidney. 5e Ed. Boston: Little, Brown and Company* p. 1031-97.
- **Widmaier, Eric P., Hershel ,Raff., Kevin T. Strang (2013).**Vander Physiologie humaine.Les mécanismes du fonctionnement de l’organisme. *Edition Maloine.6ème édition. France.* P47.
- **Yao X., Panichpisal K., Kurtzman N., Nugent K. (2007).** Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Am J Med Sci*, 334: 115-124.
- **Yen, G., Hsieh, C.L. (1998).** Antioxidant activity of extracts from *Du-zhong* (*Eucommia ulmoides*) toward various peroxidation models in vitro, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 3952-3957.

Références bibliographiques

- **Yilmaz ,I., Demiryilmaz, I., Turan, MI., Suleyman ,B., Turan, IS., Altuner, D., Alp ,HH., Suleyman, H. (2013).** The Protective Effect of Melatonin and agomelatin against cisplatin-Induced nephrotoxicity and oxidative Stress in the rat Kidney. *Latin American Journal of Pharmacy. Lat Am J Pharm*, 32 (8): 1231-1235.
- **Yoon ,WJ., Ham ,YM., Kim, SS., et al. (2009)** .Suppression of proinflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression by brown algae *Sargassum micracanthum* in RAW 264.7 macrophages. *Eur Asia J BioSci*, 3:130–43.

Résumé

Résumé

La présente étude s'intéresse aux effets néprotecteurs de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel contre la néphrotoxicité induite par le cisplatine chez les souris de souche (*Albinos wistar*). L'étude *in vitro* a porté sur les testes suivants (DPPH°, pouvoir réducteur, polyphénols totaux, flavonoïdes et inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique) a montré que la plante sujet de l'étude est douée d'un pouvoir antioxydant. D'autre part l'extrait de cette plante a manifesté un effet anti-inflammatoire remarquable. L'administration d'une dose unique de cisplatine (8mg/kg PC), par voie intrapéritonéale a entraîné une altération rénale aigue, marqué par l'élévation de la créatinine et de l'urée, ainsi que du stress oxydatif rénal associé à une vacuolisation extensive des cellules épithéliales, gonflement, desquamation et nécrose. Le prétraitement des souris par l'extrait *n-BuOH* à la dose (150 mg / kg PC) et par la vitamine E à la dose de (100mg/kg PC) pendant 10 jours a diminué nettement les niveaux des paramètres biochimiques sus cités et du MDA, et le retour à la normale de l'activité des enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GPX, et GST) et du GSH. La protection histologique a été clairement observée par la réduction du taux de MPO rénale.

Les résultats biochimiques et l'étude histopathologique ont prouvé le potentiel néprotecteur de l'extrait de la plante qui a été capable d'améliorer la dysfonction rénale induite par le cisplatine grâce à sa capacité antioxydante.

Mots clés : Cisplatine, *Centaurea choulettiana* Pomel, néphrotoxicité, Stress oxydatif, Inflammation, Souris *Albinos Wistar*

Abstract

The present study is interested to demonstrate the renoprotective effect of *n-BuOH* extract of *Centaurea choulettiana* Pomel against cisplatin induced nephrotoxicity in mice (*Albinos wistar*) species. The *in vitro* study has been conducted on the following tests (DPPH °, reducing power, total polyphenols, flavonoids and inhibition of the peroxidation of linoleic acid) had showed that the plant subject of study is endowed with antioxidant property.

On the other hand the plant extract has shown a marked anti-inflammatory effect. Administration of a single dose of cisplatin (8mg/kg bw) intraperitoneally resulted in acute renal deterioration as evidence by the elevation of, creatinine, urea, and renal oxidative stress markers associated with extensive vacuolization of epithelial cell, swelling, desquamation and necrosis. Pretreatment of mice with *n-BuOH* extract at a dose of (150 mg / kg bw) and vitamin E at a dose of (100 mg / kg bw) for 10 days has diminished the levels of biochemical parameters cited above and MDA, and the restoration of the activity of antioxidant enzymes (CAT, SOD, GP_x, and GST) and GSH. Histological protection was clearly observed by reducing the rate of renal MPO.

Both biochemical and histopathological results have proved the renoprotective potential of *Centaurea choulettiana*, which has been able to ameliorate CP- induced and renal dysfunction through its antioxidant power.

Key words: Cisplatin, *Centaurea choulettiana* Pomel, nephrotoxicity, oxidative stress, inflammation, mice *Albinos wistar*

المخلص

تناولت دراستنا التأثير الوقائي للمستخلص البيتانولي لنبته *Centaurea choulettiana* Pomel ضد السمية الكلوية الناتجة عن أحد أهم الأدوية المضادة للسرطان و هو *cisplatin* إذ تم حقن مجموعة من الفئران سلالة (*Albinos wistar*)

أظهرت الدراسة المخبرية خارج العضوية التي تمت باستخدام (DPPH، القدرة الاختزالية، البوليفينول الكلي، الفلافونويدات وتنشيط بيروكسيد حامض اللينوليك) أن النبتة موضوع الدراسة تمتلك نشاط مضاد للأكسدة، كما تم التأكيد أن استخدام هذا المستخلص أسفر عن تأثيره المضاد للالتهاب.

أدى حقن جرعة واحدة من السيسبلاتين (8 ملغ / كلغ وج) تحت الصفاق إلى إحداث تدهور حاد على مستوى الكلية و ذلك بدليل ارتفاع مستوى المؤشرات البيوكيميائية المتمثلة في الكرياتينين واليوريا وأيضا الإجهاد التأكسدي المرتبط بالاختزال المكثف للخلايا الظهارية لهذا العضو، التورم و كذلك النخر.

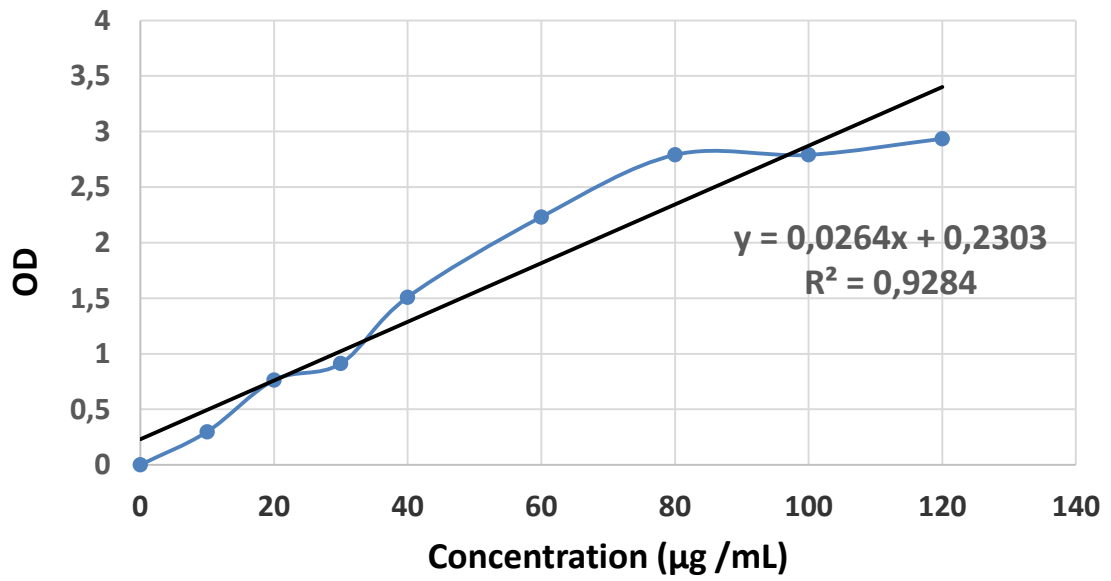
في حين أن العلاج المسبق للفئران بكل من مستخلص البيتا نولي و فيتامين E (هـ) بجرعتي (150ملغ/ كلغ وج) و(100ملغ/ كلغ وج) على التوالي و ذلك لمدة 10 أيام حيث احدثت انخفاض ملحوظ في كل من مستويات المؤشرات البيوكيميائية و مستوى MDA و تعديل ملحوظ للإنزيمات المضادة للأكسدة في السيتوزول (GPX, CAT, SOD و GST) مع تأكيد الحماية النسيجية بوضوح من خلال الحد من مستوى MPO الكلوي.

من خلال النتائج البيوكيميائية والدراسة النسيجية تبين ان هناك أثروقائي ومضاد للأكسدة للمستخلص البيتانولي لنبات *Centaurea choulettiana* Pomel و ذلك بالتقليل الفشل الكلوي و الإجهاد التأكسدي الناجمين عن السيسبلاتين.

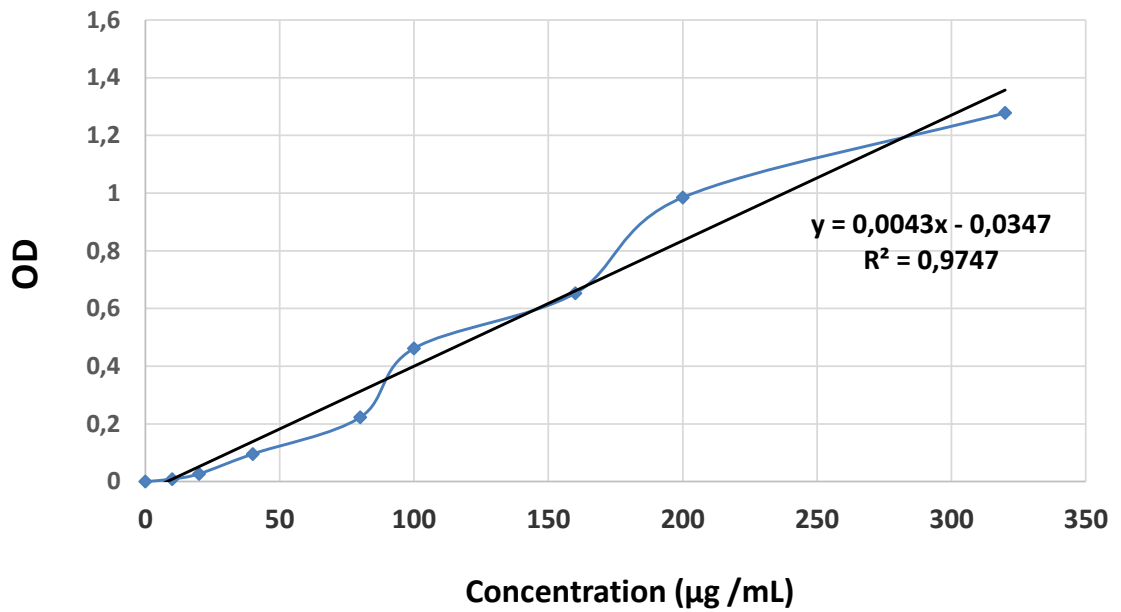
الكلمات المفتاحية: سيسبلاتين ، نبات *Centaurea choulettiana* Pomel ، السمية الكلوية ، الالتهاب ، الإجهاد التأكسدي ، الفئران جنس *Albinos wistar* .

Annexes

Courbe d'étalonnage quercetin



Courbe d'étalonnage acide gallique



Publication

Renoprotective Effect of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Leaves on Cisplatin -induced Oxidative Stress and Renal dysfunction in Mice

Bioud Kenza¹, Azzouzi Djihane¹, Benrebai Mouad¹, Mekkiou Ratiba¹, Benayache Samir², Benayache Fadila², Ameddah Souad^{1*}

¹Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté de Sciences de la Nature et de la vie, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie.

²Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: 23/03/2017

Accepted on: 17/07/2017

Available online: 30/11/2017

Key words:

Cisplatin, *Centaurea choulettiana* Pomel, Nephrotoxicity, Oxidative Stress.

ABSTRACT

Several species of *Centaurea* genus are continuously used in traditional medicine. Cisplatin (CP) is still regarded as one of the principal chemotherapeutic agents used in the therapy of many human malignancies. However, the clinical use of CP is limited due to its serious nephrotoxicity. In this study we have investigated the possible renoprotective effects of *n*-BuOH extract of *Centaurea choulettiana* Pomel leaves (BECC) in a cisplatin-induced nephropathy model. The single dose administration of cisplatin (8 mg/kg body weight; ip) resulted in acute renal deterioration as evidenced by the elevation of blood urea nitrogen (BUN) level, creatinine level, renal oxidative stress associated with extensive vacuolization of epithelial cell, swelling, desquamation and necrosis as histopathological alterations. The mice pretreatment with BECC (150 mg/kg; 10 days) attenuated the increase renal dysfunction markers, creatinine (80.15 %), BUN (57.58%) and suppressed malondialdehyde (MDA) (54.90 %). The BECC pretreatment restored GSH level (63.29%) and reversed the antioxidant enzymes, CAT (67.61%), SOD (68.16%), GPX (66.38 %) and the GST activities (70.18 %). The vitamin E pretreatment suppressed MDA level (74.10%) preserved GSH level (80.59 %) and CAT, SOD, GPX, GST activities (84.35%, 85.68 %, 77.90 %, 86.63 %) respectively. These finding indicated the comparable preventive effect of both BECC and vitamin E. The histopathological protection was clearly confirmed by the reduction of renal MPO Level (52.21%). Both biochemical results and histopathological evidence showed the renoprotective potential of *Centaurea choulettiana*, which was able to ameliorate CP-induced and renal dysfunction through its antioxidant capacity.

INTRODUCTION

In Algeria, the genus *Centaurea* (family *Asteraceae*) is represented by 45 species, of which 7 species are distributed in the Sahara (Mabberley, 1987). Several species belonging to this genus are exploited in traditional medicine such as antidiabetics

(Kaj-A-Kamb *et al.*, 1992), anti-rheumatic (Gonzalez, 1977) and antioxidant (Azzouzi *et al.*, 2016 a), as well as for the treatment of cancer (Arhoghro, 2012). Flavonoids and sesquiterpene lactones as secondary metabolites have been isolated and purified from different species of this genus (Mezache *et al.*, 2010). The medical uses of cisplatin (CP) as a chemotherapeutic agents against diverse tumours are often limited due to its adverse effects, mainly the severe nephrotoxicity (Chirino and Chaverri, 2009). Approximately 25-35% of the patients received cisplatin treatment expressed an irreversible renal damage associated with acute tubular necrosis (Arany *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2007).

* Corresponding Author

Ameddah Souad, Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté de Sciences de la Nature et de la vie, Université Constantine 1, 25000 Constantine, Algérie. E-mail: amedsouad@yahoo.fr
Tel: 213 0774304101

Cellular injury induced by cisplatin is a complex mechanism (Lieberthal, 1996; Dobyhan *et al.*, 1980; Pabla and Dong, 2008). Oxidative stress and inflammation are the utmost important processes involved in the nephrotoxicity induced by CP (Santos *et al.*, 2007; Kuhad *et al.*, 2006). A number of chemoprotective agents have been investigated for their potential anti-inflammatory and antioxidant effect in different models of nephrotoxicity induced by cisplatin. A marked renoprotection has been proved with the synthetic agent such as glutamine (Mora *et al.*, 2003), the multiple-vitamin supplementation (Ajith *et al.*, 2007; Maliakel *et al.*, 2008), mirtazapine drug (Sener *et al.*, 2012), N-acetylcysteine (Dickey *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2008; Abdelrahman *et al.*, 2010), vitamin E and selenium, (Antunes *et al.*, 2001; Naziroglu *et al.*, 2004; Nematbakhshand Nasri, 2013). An intensive search for potential natural therapeutic agents for oxidative damage has been carried out in medicinal plants (Yilmaz *et al.*, 2013). Medicinal plants and natural herbal products have potential antioxidant such as silymarin (Mansour, 2006), curcumin (Antunes *et al.*, 2001; Abdelmaguid *et al.*, 2010), quercetin (Francescato *et al.*, 2004; Behling *et al.*, 2006), Naringenin (Badary *et al.*, 2005), grape seed and proanthocyanidin (Saad *et al.*, 2009; Yousef *et al.*, 2009), lycopene (Atessahin *et al.*, 2005; Arhoghro *et al.*, 2012), fish oil, (El-Gerbed *et al.*, 2013), Royal jelly (Karadeniz *et al.*, 2011), ginger extract (Ali *et al.*, 2013), green tea (Khan *et al.*, 2009), ellagic acid (Yuce *et al.*, 2007).

Taking into consideration the popular uses of the *Centaurea* genus as an anti-inflammatory agent and in addition to our recent study that mentioned *Centaurea choulettiana* as antioxidant agent and has been proved rich in caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid and in sesquiterpenes, the present investigation was performed for the first time to evaluate the renoprotective effects of the *n*-BuOH extract of *Centaurea choulettiana* (BECC) against nephrotoxicity induced by cisplatin in mice.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Chemicals

Cisplatin (*cis*-dichlorodiammine-platinum II, CP) was obtained from Center of Cancer Chemotherapy, Constantine-3.1,1,1-3,3-tetramethoxypropane.5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), GSH, *O*-dianisidine hydrochloride, thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), malondialdehyde (MDA), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). All other chemicals used were either of analytical grade and of the highest purity.

Plant Material and Extract Preparation

The collected flowers (May 2013) of *Centaurea choulettiana* from the M'Sila region, Algeria, were authenticated by Dr. Sarri Djamel, Department of Biology, M'Sila University, Algeria according to Quezel and Santa (Quezel and Santa, 1963). A voucher specimen has been deposited in the Herbarium of the

VARENBIOMOL research unit University of Frères Mentouri Constantine 1 (CCA/05/2013).

A quantity of 1370 g of leaves of *Centaurea choulettiana* Pomel were dried at ambient temperature and cut into small pieces then macerated three times (24hours for each time) with methanol / H₂O (70 %). The extract obtained after filtration and evaporation was partitioned with solvents in increasing polarity: chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol. Each phase was evaporated under reduced pressure. 14g of *n*-BuOH extract of leaves of *Centaurea choulettiana* Pome (BECC) as dried extract was obtained and subjected for the nephroprotective study. The choice of *n*-BuOH leaves of *Centaurea choulettiana* extract for the present investigation was based on its richness in bioactive compounds (Azzouzi *et al.*, 2016 a).

Animals and Experimental Design

Male *Wistar albino* mice were maintained in the controlled conditions of temperature and humidity with 12 hours light/dark cycle and fed with standard feed and water. The Ethics Committee of Animal Experimentation of Brother Mentouri university Constantine approved all animal experiments which were in strict compliance with the United States National Institutes of Health. Guidelines for care and use of laboratory animals in biomedical research (Anusuya *et al.*, 2013).

Twenty-four male adult mice (weight 30 ± 2 g) were divided into four equal groups (6 mice in each group).

group I (control), received by gavage 1 mL of 0.9 % NaCl saline solution for ten days.

group II (CP-mice group), received orally 1 mL of 0.9 % NaCl saline solution for ten days. At the last day, one hour afterwards the gavage, a single dose (8 mg/kg) of CP was injected intraperitoneally (ip).

group III (Vitamin E-mice group), received orally 100 mg/kg of vitamin E for ten days. One hour after later dose, a single dose (8 mg/kg) of CP was ip injected.

group IV (BECC- mice group), received orally 150 mg/kg of BECC for ten days. One hour after later dose, a single dose (8 mg/kg) of CP was ip injected.

All groups were sacrificed in the day 11 by decapitation. After 18 hours of CP challenge, the blood samples were collected and centrifuged at 3000 rpm during 15 minutes at 4 °C. The obtained serum was stored at 4 °C for the assessment of renal function markers, namely blood urea nitrogen (BUN) and plasmatic creatinine level. These assessments were performed according to the standard procedures given along with the analysis kits purchased. The decapsulated renal tissues were quickly removed, rinsed in ice-cold saline and used immediately or stored frozen at -80 °C until further antioxidant parameter analysis.

Tissue Preparation and Assessment of Renal Oxidative Stress Markers

The renal cortex tissue was carefully separated from medulla. A 10% (w/v) homogenate was prepared using 0.25 M

sucrose, 1 mM EDTA and 0.05 M Tris-HCl solution, pH 7.4. A part of the homogenate was used for assessment of MDA (indicator of lipid peroxidation) measured by using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as standard. The results were expressed as nmol MDA/g liver tissue (Ohkawa *et al.*, 1979).

Another part of homogenate was centrifuged at 9600 rpm/min for 15 min at 4 °C to separate cytosolic fraction. The obtained fraction was subsequently used for determination of renal antioxidant markers. Reduced glutathione (GSH) was measured by the method of Sedlak and Hanus (1982), GSH levels were expressed as nmole of GSH/mg protein. The activity of glutathione S-transferase (GST) was determined on the basis of conjugation of GSH with CDNB, the GST activity was monitored at 340nm for 3min (Habig *et al.*, 1974), and expressed as $\mu\text{mol/mg protein}$. Glutathione peroxidase (GPx) activity was assessed by the method of (Rotruck *et al.*, 1975) based on the degradation of H_2O_2 in the presence of GSH, the GPx activity was expressed as nmol/min/mg protein. Catalase (CAT) activity was determined from the rate of decomposition of H_2O_2 , monitored by a decrease of absorbance at 240nm (Aebi, 1984), the CAT activity was expressed as nmol/min/mg protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was measured as the inhibition of autooxidation of pyrogallol, according to the method of Marklund and Marklund (1974) and expressed as (U/mg protein, one unit of SOD activity was defined as the enzyme amount causing 50% inhibition in pyrogallol auto-oxidation per minute. Renal MPO activity was measured according to Bradley *et al.* (1982). In brief, the renal cortex tissue was suspended in 6 mL of 50 mmol/L phosphate buffer (pH 6.0) containing 1% HTAB. The homogenized samples were frozen and thawed, and centrifuged at $4.500 \times g$ for 15 minutes at 4 °C. The evaluation of MPO activity was estimated after adding of 0.6 mL of phosphate buffer (pH 6.0) which contains 0.167 mg/mL *O*-dianisidinedihydrochloride and 0.0005 % H_2O_2 . The change in absorbance at 460 nm was recorded spectrophotometrically over 10 minutes. (One unit of MPO activity was defined as the amount of enzyme able to reduce 1 μmol of H_2O_2 per minute). Protein concentration was estimated by the method of Lowry *et al.* (1951).

Histopathological Analysis

Renal fragment tissues were fixed in 10% formalin and were performed by standard method. The sections were stained with haematoxylin-eosin (H&E),

Statistical Analysis

All data were expressed as means \pm SD (n=6) and compared by means of ANOVA test, values of $P < 0.05$ was regarded as significant.

RESULTS

Renal Function Markers

Administration of CP to mice induced a marked renal impairment, as evidenced by a significant ($p < 0.01$) elevations in serum BUN and creatinine levels when compared to control group. BECC (150 mg/kg) and vitamin E (100mg/kg) pretreatment daily for 10 days, significantly ($p < 0.01$) reserved the renal function as indicated by the reduction in serum creatinine (80.15 %) and BUN (57.58%) as compared with vitamin E-group (84.61, 74.24%) respectively (Figure 1; a,b).

Renal Oxidative Stress Markers

Exposure mice to CP caused a significant ($p < 0.01$) depletion of cortex renal GSH accompanied with a significant ($p < 0.05$) increase in MDA level (Table 1). In both BECC-group and vitamin E-group there was a significant ($p < 0.01$) reserve in GSH level (63.29 %, 80.59%; $p < 0.01$) respectively, and in MDA level (54.90 %, 74.10 %; $p < 0.01$) respectively, indicating the comparable preventive effect of both BECC and vitamin E (Table 1). A significant ($p < 0.01$) decline was observed in both CAT, SOD activities and in both GPX, GST activities in CP-exposure mice (Table 1). The pretreatment with BECC and vitamin E significantly reversed the CAT activity (67.61 %, 84.35 %; $p < 0.01$) respectively, and the SOD activity (68.16%, 85.68 %; $p < 0.01$) respectively and the GPX activity (66.38 %, 77.90 %; $p < 0.01$) respectively and the GST activity (70.18%, 86.63; $p < 0.01$) respectively (Table 1).

Table 1: The effect of BECC (150 mg/Kg) on renal oxidative stress markers in CP-mice.

| Groups | MDA (nmol/g tissue) | CAT (nmol/min/mg protein) | GSH (nmol/mg protein) | GPx (nmol/ min/mg protein) | GST ($\mu\text{mol}/ \text{mg}$ protein) | SOD (U/mg protein) |
|--------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|---------------------------------------|
| control | 39,17 \pm 3,05 | 100,18 \pm 8,25 | 23,49 \pm 1,62 | 33,69 \pm 3,11 | 8,39 \pm 1,24 | 27,06 \pm 2,28 |
| CP | 97,99 \pm 7,38** | 47,278 \pm 4,54** | 8,5 \pm 0,79** | 14,24 \pm 2,34** †† ¥¥ | 4,49 \pm 0,64** | 13,495 \pm 0,95** |
| CP + vit E | 54,4 \pm 5,72** †† (74.10 %) | 81,91 \pm 2,08** †† (84.35 %) | 20,58 \pm 1,59* †† (80.59 %) | 29,4 \pm 1,38** †† (77.90 %) | 7,87 \pm 0,7** †† (86.63 %) | 25,11 \pm 1,71** †† (85.68 %) |
| CP + BECC | 65,7 \pm 3,31** †† ¥¥ (54.90 %) | 74,71 \pm 5,43** †† ¥¥ (67.61 %) | 17,98 \pm 1,16** †† ¥¥ (63.29 %) | 27,16 \pm 1,99* †† ¥ (66.38 %) | 7,235 \pm 0,77†† (70.18 %) | 22,74 \pm 1,98** †† ¥¥ (68.16 %) |

Values are mean \pm SD, (n = 6), * : all groups vs Control; † : CP vs CP + vitamin E and CP + BECC; ¥ : CP + vitamin E vs CP + BECC . ¥†* $P < 0.05$; ¥†† ** $P < 0.01$. Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as: $100 \times (\text{values of CP}) - \text{values of samples} / (\text{values of CP}) - \text{values of control}$.

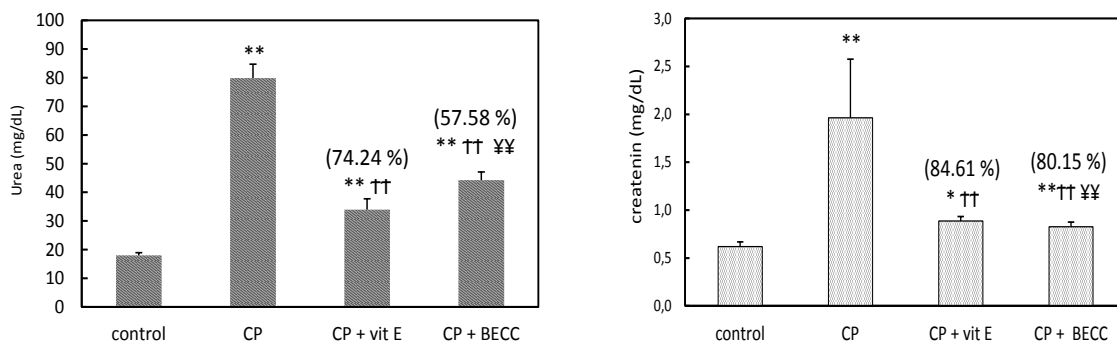


Fig. 1: The effect of BECC (150 mg/Kg) on renal function markers in CP-mice : (a) BUN and (b) creatinine. Values are mean \pm SD, (n = 6) , *all groups vs Control; † : CP vs CP + vitamin E and CP + BECC; ‡ : CP + vitamin E vs CP + BECC . †‡*P<0.05; †‡‡**P<0.01. Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as : 100 x (values of CP) -values of samples/ (values of CP) -values of control.

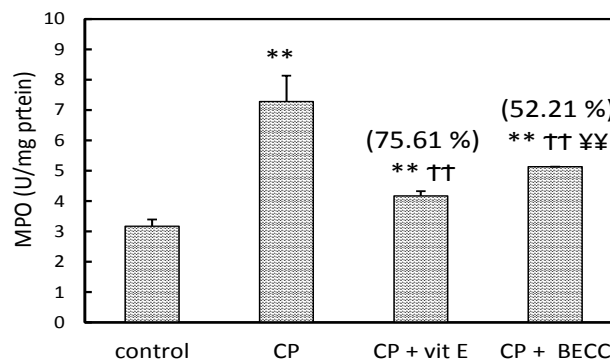
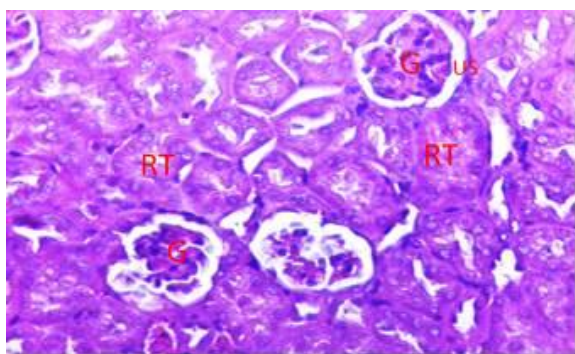


Fig. 2: The effect of BECC (150 mg/Kg) on renal MPO in CP-mice. Values are mean \pm SD, (n = 6) , *: all groups vs Control; †: CP vs CP + vitamin E and CP + BECC; ‡ : CP + vitamin E vs CP + BECC . †‡*P<0.05; †‡‡**P<0.01. Values in parentheses indicate percent protection. The % of protection is calculated as : 100 x (values of CP) -values of samples/ (values of CP) -values of control.

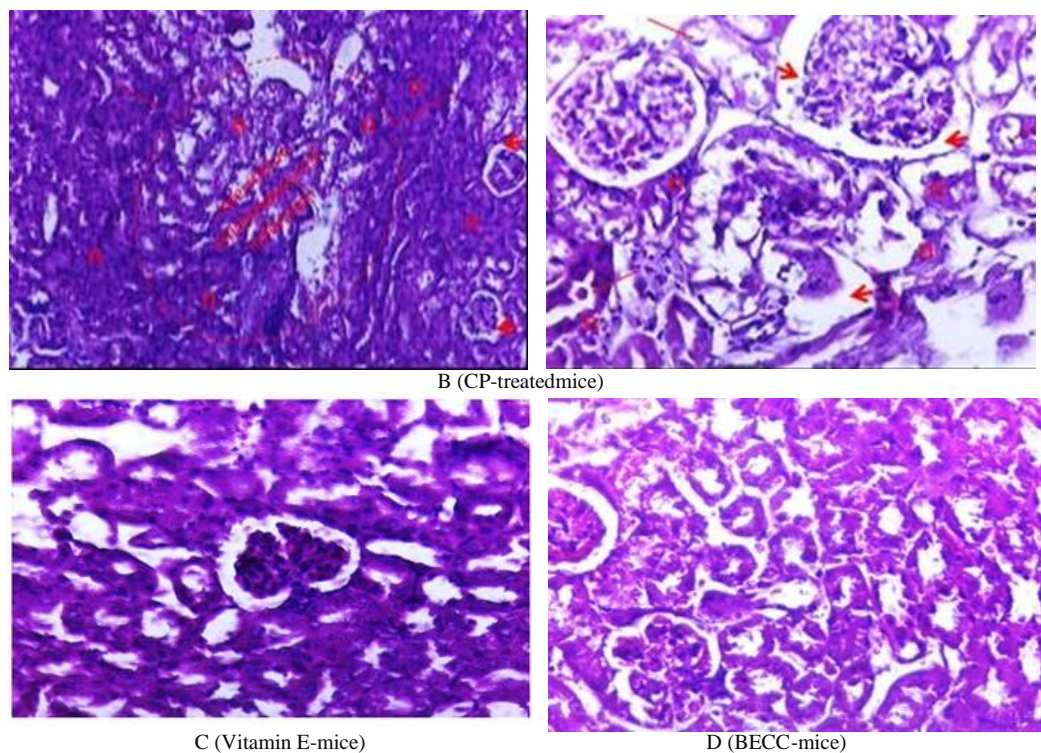


Fig 3: Photomicrograph of Histopathological analysis renal cortex of mice (H&E X400): A: (control): normal glomerular (G) and tubular: renal tubule RT (the proximal tubule and distal tubule) and urinary space (US). B (CP-treated mice): disrupted renal parenchyma showing loss of structural arrangement of renal tubules (arrows). Severe degeneration in atrophied glomerulus, dilation of Bowman's space (head arrow), wide spread proximal tubular necrosis (n). C (Vitamin E-mice): Vit E pre-treatment preserved glomerular architecture and showed a regular epithelial cell of some tubules, moderate tubular necrosis. D (BECC-mice): showed slight degeneration in proximal tubule with a moderate degree of histopathological alteration with some healthy tubules.

Cortex Renal MPO Level and Histological Analysis

MPO activity, which is an indicator of neutrophil infiltration, was significantly ($P < 0.01$) higher in the cortex renal tissue of CP-mice (7.282 ± 0.848 U/mg protein) than that of the control group (3.173 ± 0.2178 U/mg protein). In BECC-group (5.137 ± 0.128 U/mg protein) and vitamin E-group the (4.175 ± 0.154 U/mg protein) MPO activity significantly ($P < 0.01$) was normalised (52.21 %) in comparison to vitamin E (75.61 %) (figure 2).

The histopathological analysis of the cortical region of control kidney mice showed the normal glomerular and tubular histo-architecture (figure 3A) the CP-treated mice showed an in the renal tubules oedema and congested blood vessels and interstitial damage evidenced by tubular lumen dilatation with variable degrees of tubular necrosis and inflammatory cell infiltration that confirmed the MPO finding (figure 3B). Administration of BECC and vitamin E, greatly ameliorated the histopathological lesions, minimized the degenerative changes and the renal parenchyma attained nearly normal structure and organization (figure 3C,D).

DISCUSSION

CP is an inorganic platinum compound characterized by a broad spectrum anti-neoplastic effect against a wide variety of tumours (Daugaard and Abildgaard, 1989; Siddik, 2003). However many side effects mainly the nephrotoxicity in 25-30% of patients were clinically occurred (Saad *et al.*, 2009). In the present investigation, nephrotoxicity of CP was clear from the elevated levels of serum creatinine and BUN levels that might be resulted from renal dysfunction, which could be explained by the reduction of the glomerular filtration (Yao *et al.*, 2007). It has been reported that the accumulated CP in the tubular epithelial cells reached its highest level in the proximal tubular cells of the inner cortex especially in the S3 segment (Townsend *et al.*, 2003) and may form a reactive metabolite intracellular hydration by platinum complexes which could cause the humans nephrotoxicity (Matsushima *et al.*, 1998; Baek *et al.*, 2003). BECC administration clearly attenuated increases in serum BUN and creatinine that may reflect its renal function restoration, this effect is comparable to that of vitamin E, which considered as positive control. Cisplatin-induced nephrotoxicity is a complex process and multiple mechanisms which include oxidative stress and inflammation (Arany *et al.*, 2004, 1993; Jordan and Carmo-Fonseca, 2000). The impaired renal functions could be attributed to the direct toxic effect of CP on the glomerular and tubular structures through the generation of reactive oxygen species (ROS) (Cetin *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2007). In our study, CP administration produces MDA in the renal cortex, affecting cellular structure and function. The MDA production was associated with a sequence of events such as the cortex renal GSH depletion, SOD, CAT, GPx and GST activity reduction in renal cortex tissues. The diminution of SOD activity could provoke the initiation and propagation of lipid peroxidation in the CP-treated rat (Davis *et al.*, 2001). It is well recognised that excessive lipid peroxidation augments GSH consumption

(Karthikeyan *et al.*, 2007; Gonzales *et al.*, 2005). The biotransformation of CP has been mentioned as a part of the cisplatin-induced renal damage (Townsend *et al.*, 2003; Wainford *et al.*, 2008). It has been indicated that the CP nephrotoxicity is initiated by the inhibition of protein synthesis and protein-SH depletion (Sadowitz *et al.*, 2003; Pabla and Dong, 2008). The depletion of the intracellular GSH may be explained by conjugation of CP with GSH, which lead to detoxifying electrophilic compounds. These compounds pass afterwards to the kidney where they would be cleaved by the γ -glutamyl-transpeptidase to cysteinyl-glycine-conjugates on the surface of the proximal tubule cells (Townsend *et al.*, 2003). The dissociation of one chlorine from CP results in a positive charge on the platinum which would attract the negatively charged sulfur on the cysteine moiety of the GSH. Some heavy metals including CP have been reported to induces renal damage by ROS generation (Kawai *et al.*, 2006), the CP administration in different experimental model resulted in the generation of O^{\cdot}_2 in both cell-free system (Masuda *et al.*, 1994) and male Wistar rats (Chirino and Chaverri, 2009) and $^{\circ}OH$ in cell-free system in both female and male Wistar rats (Kadikoylu *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2007). The contribution of hydrogen peroxide (H_2O_2) in cisplatin-induced nephrotoxicity in cortical tubule cells was demonstrated in a previous study, principally in S3 cells of the proximal kidney tubules (Tsutsumishita *et al.*, 1998). Thus, both CAT and GPx enzymes that detoxify hydrogen peroxide could be reduced (Kadikoylu *et al.*, 2004). The reduction in the of the antiperoxidative enzymes activities (CAT and GPx) may be attributed to the increased generation of ROS, which in turn lead to the inhibition of these enzymes (Gaetani, *et al.*, 1996). In our study, the activities of GSH-dependent antioxidant enzymes GPx and GST also were significantly diminished in cisplatin group. The activities reduction of GPx and GST could be due to the decreased availability of their GSH substrate (Karthikeyan *et al.*, 2007; Ran *et al.*, 2007). In our study, the histopathological finding confirmed the biochemical results, the decline in antioxidant enzymes activities was accompanied by a remarkable reduction in the glomerular capillary tufts size and associated with the proximal tubular necrosis that could be related to inflammation process as an another mechanism of CP-induced nephrotoxicity (Pratibha *et al.*, 2010), CP administration elevated the MPO activity in the cortex tissue, indicating the enhanced polynuclear (PN) migration to in the renal cortex tissue (Tsuji *et al.*, 1999; Ahmed Elberry *et al.*, 2012).

The renoprotective effect of BECC was associated with preservation of GSH concentration, upregulation of GPx, SOD and prevention renal cortex from increased MDA and MPO concentration. In the present study, our investigation also revealed that the renoprotective effect of BECC was comparable to that of vitamin E which is known to be the major lipophilic chain-breaking antioxidant present within cell membranes (Packer and Landvik, 1989). These findings are in line with earlier studies that reported that the use of vitamin E in combination with selenium treatment ameliorate cisplatin side effects by preserving renal GSH

and up-regulated the GPx activity in cisplatin-rats (Naziroglu *et al.*, 2004; Nematbakhsh and Nasri, 2013). In the current investigation the vitamin E as standard references, clearly prevented CP induced proteinuria and oxidative stress. A comparable data were reported by Maliakel *et al.* (2008), that indicated α -tocopherol monoglucoside as nephroprotective agent against cisplatin-induced nephrotoxicity. Our previous phytochemical studies carried out on this plants characterize the presence of many bioactive compound among them caffeic acid (10.07 mg/kg), chlorogenic acid (5.04mg/kg), ferulic acid (4.81 mg/kg) (Azzouzi *et al.*, 2016 a) that being the highest in concentration and have been proved antioxidant effect (Dos Santos *et al.*, 2006). From this study, the caffeic acid has been proved earlier as the most abundant phenolic acid in the *n*-BuOH extract of leaves from *Centaurea choulettiana* (Azzouzi *et al.*, 2016 a). Thus, the enhancement of this renoprotective effect of BBCC seems to be dependent on the antioxidant activities exerted by phenolic acid (caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid) contained in BBCC. These compounds are mentioned to be a chain-breaking antioxidants acting through radical scavenging activity which could be attributed to their hydrogen or electron donating aptitude (Azzouzi *et al.*, 2016a, Farah *et al.*, 2008).

Our finding are in agreement with those declared by Ozen *et al.* (2004) that mentioned the caffeic acid phenethyl ester as a potent reducer of oxidative stress in rat tubular damage induced with CP and confers good renoprotection.

CONCLUSION

From our findings, we can conclude that both biochemical results and histopathological evidence showed the renoprotective potential of BECC, which was able to ameliorate CP-induced and renal dysfunction through its antioxidant capacity.

ACKNOWLEDGEMENT

Financial support and sponsorship: The authors are grateful to the Algerian Minister of Higher education and Scientific Research (MESRS) which has supported the financial assistance.

Conflict of Interests: There are no conflicts of interest.

REFERENCES

Abdelmaguid EN, Hania NC, Noura SA. Protective effect of silymarin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pak J Nutr*, 2010; 9: 624-636.

Abdelrahman AM, Al-Salam S, AIMahruqi AS, Al-husseni IS, Mansour MA, Ali BH. N-acetylcysteine improves renal hemodynamics in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. *J Appl Toxicol*, 2010; 30: 15-21.

Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol*, 1984; 105:121-26.

Ahmed Elberry MD; Mohamed Wagih, MD, Amr Zahra MD. Oxytocin Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Wistar Rats *Med. J. Cairo Univ*, 2012; 80 (2): 61-67.

Ajith TA, Usha S, Nivitha V. Ascorbic acid and alpha tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice : a comparative study. *ClinChimActa*, 2007; 375:82-86.

Antunes LMG, Darin JDC, Bianchi Nde L. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res*, 2001; 43 (2): 145-150.

Anusuya N, Durgadevi P, Dhinek A, Mythily S. Nephroprotective effect of ethanolic extract of garlic (*Allium sativum*) on cisplatin induced nephrotoxicity in male Wistar Rats. *Asian J Pharm Clin Res*, 2013; 6 (Suppl 4): 97-100.

Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Price PM, Safirstein RL. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signalling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004; 287 (3): F543-F549.

Arhoghro EM, Kpomah DE, Uwakwe AA. *Ocimum gratissimum* aqueous extract enhances recovery in cisplatin - induced nephrotoxicity in albino Wistar rats. *Indian J Drugs Dis*, 2012; 1 (5): 129-142.

Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, 2005; 212 (2-3):116-23.

Azzouzi D, Bioud K, Demirtas I, Gul F., Sarri D., Benayache S, Benayache F, Mekkiou R. Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Extracts. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2016; 19: 1-6. (a).

Azzouzi D, Mekkiou R, Chalard P, Chalchat JC, Boumaza O, Seghiri R, Benayache F, Benayache S. Essential oil composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria. In *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*; 2016; 8 (9): 1545-1548. (b).

Badary OA, Abdel Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci*, 2005; 76:35-2125.

Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med*, 2003; 142: 178-186.

Behling EB, Sendao MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Costa RS, Bianchi MLP. Comparative study of multiple dosage of quercetin against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rat kidneys. *Pharmacol Rep*, 2006; 58:526-532.

Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G: Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*, 1982; 78, 206-209.

Cetin, Devrim E, Kılıçoğlu B, Avcı A, Çandır Ö, and Durak I. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol*, 2006; 26:42-46.

Chirino YI, Chaverri JP. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity *Exp and Toxicol Pathol*, 2009; 61: 223-242.

Daugaard G, Abildgaard U. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother. Pharmacol*, 1989; 25:1-9.

Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol*, 2001; 12: 2683-2690.

Dickey DT, Muldoon LL, Doolittle ND, Peterson DR, Kraemer DF, Neuwelt EA. Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer ChemotherPharmacol*, 2008; 62: 235-241.

Dobyan DC, Levi J, Jacobs C, Kosek J, Weiner MW. Mechanism of cisplatinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J PharmacolExpTher*, 1980; 213: 6-551.

Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, De Souza GE. Evaluation of the antiinflammatory, analgesic and antipyretic activity of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull*, 2006; 29: 2236-2240.

El-Gerbed MSA. Ameliorative effect of fish oil on the cisplatin induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Res. J Pharm Biol Chem. Sci*, 2013; 4: 479-491.

- Farah A, Monteiro M, Donangelo CM, Lafa Sophie. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. *J Nutr*, 2008; 138: 2309-2315.
- Francescato HDC, Coimbra TM, Costa RS, Bianchi, MP Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. *Kidney Blood Press Res*, 2004; 27: 148-158.
- Gaetani G, Ferraris A, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman H. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 1996; 87:1595-1599.
- Gonzales R, Romay C, Borrego A, Hernandez F, Zamora Z, Rojas E. Lipid peroxides and antioxidant enzymes in cisplatin chronic nephrotoxicity in rats. *Mediators Inflamm* 2005; 3: 139-43.
- Gonzalez AG, Bermejo J, Caberari, Galido A, Masenet GM. Sesquiterpene lactones from *Centaurea alba* and *C. conifer*. *Ann Chim*, 1977; 73-86.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 1974; 249: 7130-7139.
- Jiang M, Wei Q, Pabla N, Donga G, Wang CY, Yang T, Smitha SB, Dong Z. Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol*, 2007; 73: 1499-1510.
- Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*, 2000; 57:1229-1235.
- Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol*, 2004; 23: 29-34.
- Kaij-A-Kamb M, Amoros M, Girrel L. Chemistry and biological activity of the genus *Centaurea*. *Pharma Acta Helv*, 1992; 67: 178-188.
- Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxid. Med. Cell. Longev*, 2011; 2011; 1-10.
- Karthikeyan K, Sarala Bai BR, Niranjali Devaraj S. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *Int J Cardiol*, 2007; 115: 326-333.
- Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci*, 2006, 100, 65-72.
- Khan SA, Shubha Priyamvada, Khan W, Khan S, Farooq N, Yusufi ANK. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity *Pharmacological Research*, 2009; 60:382-391.
- Kuhad A, Tirkey N, Pilkhwal, S, Chopra K. Renoprotective effect of *Spirulina fusiformis* on cisplatin-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Renal. Failure*, 2006; 28:54-247.
- Leibbrandt MEI, Grushenka HIW, Metz AL, Ozobia AA, Haskins JR. Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int*, 1995; 48: 761-770.
- Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol*, 1996; 270:F 700-708.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 1951; 193: 265-275.
- Luo J, Tsuji T, Yasuda H, Sun Y, Fujigaki Y, Hishida A. The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 2008; 23:2198-2205.
- Mabberley, DJ. *The Plant Book*. Cambridge University Press, 1987
- Maliakel DM, Kagiya TV, Nair CK. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by glucosides of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Exp Toxicol Pathol*, 2008; 60 (6): 7-521.
- Mansour HH, Hafez FH, Nadia MF. Silymarin modulates cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *J Biochem Mol Biol*, 2006; 39:61- 656.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*, 1974; 47: 469-474.
- Masuda H, Tanaka T, Takahama U. Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 203: 80-1175.
- Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med*, 1998; 131: 518-526.
- Mezache N, Bendjedou D, Satta D, Mekkiou R, Benayache S, Benayache, F. Secondary metabolites from *Centaurea lippii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2010; 46 (5): 801-802.
- Mora LO, Antunes LM, Francescato HD, Bianchi MLP. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*, 2003; 47: 517-522.
- Naziroglu M, Karaogl A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*, 2004; 195:30-221.
- Nematbakhsh M, Nasri H. The effects of vitamin E and selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: A randomized, placebo-controlled study. *J Res Med Sci*, 2013; 18: 626-627.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979; 95 : 58-
- Ozen S, Akyol O, Iraz M, Sogut S, Ozugurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol*, 2004; 24: 27-35.
- Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*, 2008; 73 (9): 994-1007
- Packer L, Landvik S. Vitamin E: introduction to biochemistry and health benefits. *Ann N Y Acad Sci*, 1989; 570: 1-6.
- Pratibha R, Bhiwgade DA, Kulkarni S, Rataboli PV, Dhume CY. Cisplatin induced histological changes in renal tissue of rat. *J Cell Animal Biol*, 2010; 4 (7):108-111.
- Quezel P, and Santa S. *Nouvelle Flore de l'Algerie et des régions désertiques et méridionales*, Tome II, édition CNRS, Paris, 1963:1016.
- Ran Q, Liang H, Ikeno Y, Qi W, Prolla TA, Roberts LJ, Wolf N, Van Remmen H, Richardson A. Reduction in glutathione peroxidase increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J Gerontol Biol Sci Med Sci*, 2007; 62: 932-942.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, 1973, 179, 588-90.
- Saad AA, Youssef MI, El-Shennawy LK. Cisplatin induced damage in kidney genomic DNA and nephrotoxicity in male rats: The protective effect of grape seed proanthocyanidin extract. *Food and Chemical Toxicology*, 2009; 47 (7): 1499-1506.
- Sadowitz PD, Hubbard BA, Dabrowiak JC, Goodisman J, Tacka KA, Aktas MK, Mora LO, Antunes LMG, Francescato HDC, Bianchi MLP. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*, 2003; 47: 517-522.
- Santos NA, Catão CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, AC. Cisplatin induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state imbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol*, 2007; 81: 495-504.
- Sedlak J, Hanus L. Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. *Endocrinol Exp* 1982; 16 (2): 103-109.
- Sener M T, Sener E, Tok A, Polat B, Cinar I, Polat H, Akcay F, Suleyman H. Biochemical and histologic study of lethal cisplatin nephrotoxicity prevention by mirtazapine. *Pharmacol Rep*. 2012; 64 (3):594-602.
- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 2003; 22: 7265-7279.

Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus MG, Hanigan MH. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14:1-10.

Tsuji K, Kubota Y, Yamamoto S, Yanagitani K, Amoh Y, Takaoka M, Ogura M *et al.* Increased neutrophil chemotaxis in obstructive jaundice: an in vitro experiment in rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999; 14 (5): 457-463.

Tsutomishita Y, Onda T, Okada K, Takeda M, Endou H, Futaki S Niwa M. Involvement of H₂O₂ production in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 242 (2): 310-312.

Wainford RD., Weaver RJ, Stewart KN, Brown P, Hawks-worth GM. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway. *Toxicology*, 2008; 249: 93-184.

Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Am J Med Sci*, 2007; 334: 115-124

Yilmaz I, Demiryilmaz I, Turan MI, Suleyman B, Turan IS, Altuner D, Alp HH, Suleyman H. The Protective Effect of Melatonin and agomelatin against cisplatin-Induced nephrotoxicity and oxidative Stress in the rat Kidney. *Latin American Journal of Pharmacy. Lat Am J Pharm*, 2013; 32 (8): 1231-1235.

Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy L.K. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2009; 47:1176-1183.

Yuce A, Atessahin A, Ceribasi AO, Aksakal M. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2007; 101: 345-349.

How to cite this article:

Kenza B, Djihane A, Mouad B, Samir MRB, Fadila B, Souad A. Renoprotective Effect of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) Leaves on Cisplatin -induced Oxidative Stress and Renal dysfunction in Mice. *J App Pharm Sci*, 2017; 7 (11): 147-154.

Communications scientifiques

La présente étude a été réalisée au niveau de Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Science de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine1, sous la direction de M.CA. Benrebai Mouad. Les résultats de ce présent travail ont été partiellement publiés ou présentés sous forme de posters lors de congrès internationaux:

Publications

Bioud Kenza, Azzouzi Djihane, Benrebai Mouad, Mekkiou Ratiba, Benayache Samir, Benayache Fadila, Ammedah Souad.(2017).Renoprotective effect of *Centaurea Choulettiana Pomel (Asteraceae)* leaves on cisplatin-induced oxidatives stress and renal dysfunction in mice. *Journal of Applied Pharmaceutical science*, 7(11):147-154.

Azzouzi, D., Bioud, K., Demirtas, I., Gül, F., Sarri, D., Benayache, S., Benayache, F., Mekkiou, R. (2016). Phenolic profile and antioxidant activity of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) extracts, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19: 1-6.

Posters

K. Bioud, D. Azzouzi, M.Benrebai, I.Aissous, S.Ammedah, R.Mekkiou, F.Benayache, S.Benayache. **Cisplatin- nephrotoxicity attenuation by *Centaurea acoulis* in mice.** Séminaire International des Biotechnologies Constantine (SIBC) du 19-21 Octobre 2015.

K. Bioud, D. Azzouzi, M.Benrebai, I.Aissous,R Mekkiou, A. Menad , S Benayache, F Benayache , S.Ameddah. **Renoprotective effect of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) leaves on cisplatin- induced renal dysfunction in mice.** Congrès international de Biotechnologies et Valorisation des Bio-Ressources, organisé par l'AT-BVBR du 20 au 23 Mars 2018 à Tabarka – Tunisie.

K. Bioud, D. Azzouzi, M.Benrebai, R Mekkiou, F Benayache , S.Ameddah. **Preventive effect of *Centaurea* against cisplatin- nephrotoxicity in mice.** Journée Portes Ouvertes sur L'Animalerie Le 14/11/2018.

Année universitaire :07/02/2019

Présentée par : Bioud Kenza

Intitulé

Etude de l'effet protecteur de l'extrait butanolique de la plante *Centaurea choulettiana* Pomel contre la néphrotoxicité induite par le cisplatine chez les souris.

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat 3^{ème} cycle

Résumé

La présente étude s'intéresse aux effets rénoprotecteurs de l'extrait *n-BuOH* de *Centaurea choulettiana* Pomel contre la néphrotoxicité induite par le cisplatine chez les souris de souche (*Albinos wistar*). L'étude *in vitro* a porté sur les testes suivants (DPPH°, pouvoir réducteur, polyphénols totaux, flavonoïdes et inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique) a montré que la plante sujet de l'étude est douée d'un pouvoir antioxydant. D'autre part l'extrait de cette plante a manifesté un effet anti-inflammatoire remarquable. L'administration d'une dose unique de cisplatine (8mg/kg PC), par voie intrapéritonéale a entraîné une altération rénale aigue, marqué par l'élévation de la créatinine et de l'urée, ainsi que du stress oxydatif rénal associé à une vacuolisation extensive des cellules épithéliales, gonflement, desquamation et nécrose. Le prétraitement des souris par l'extrait *n-BuOH* à la dose (150 mg / kg PC) et par la vitamine E à la dose de (100mg/kg PC) pendant 10 jours a diminué nettement les niveaux des paramètres biochimiques sus cités et du MDA, et le retour à la normale de l'activité des enzymes antioxydantes (CAT, SOD, GP_x, et GST) et du GSH. La protection histologique a été clairement observée par la réduction du taux de MPO rénale.

Les résultats biochimiques et l'étude histopathologique ont prouvé le potentiel rénoprotecteur de l'extrait de la plante qui a été capable d'améliorer la dysfonction rénale induite par le cisplatine grâce à sa capacité antioxydante.

Mots clés : Cisplatine, *Centaurea choulettiana* Pomel, néphrotoxicité, stress oxydant, inflammation, souris *Albinos wistar*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Science de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1.