

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار-عنابة

UNIVERSITÉ BADJI-MOKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Option : Biologie animale

THEME

**Effet protecteur des flavonoïdes au cours
d'un épisode d'ischémie cardiaque**

Présentée par : Asma BRAIK SERIDI

Membres du jury

Pr. Houria BERREBBAH	Présidente	Université Badji Mokhtar, Annaba
Pr. Mesbah LAHOUEL	Directeur de thèse	Université Seddik Ben Yahia, Jijel
Pr. Mohamed Réda DJEBAR	Co-Directeur de thèse	Université Badji Mokhtar, Annaba
Pr. Dalila BENDJEDDOU	Examinatrice	Université 8 mai 1945, Guelma
Pr. Amar ZELLAGUI	Examineur	Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi
Pr. Khaireddine OUALI	Examineur	Université Badji Mokhtar, Annaba

2019

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار- عنابة

UNIVERSITÉ BADJI-MOKHTAR ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Option : Biologie animale

THEME

**Effet protecteur des flavonoïdes au cours
d'un épisode d'ischémie cardiaque**

Présentée par : Asma BRAIK SERIDI

Membres du jury

Pr. Houria BERREBBAH	Présidente	Université Badji Mokhtar, Annaba
Pr. Mesbah LAHOUEL	Directeur de thèse	Université Seddik Ben Yahia, Jijel
Pr. Mohamed Réda DJEBAR	Co-Directeur de thèse	Université Badji Mokhtar, Annaba
Pr. Dalila BENDJEDDOU	Examinatrice	Université 8 mai 1945, Guelma
Pr. Amar ZELLAGUI	Examineur	Université Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi
Pr. Khaireddine OUALI	Examineur	Université Badji Mokhtar, Annaba

2019

Remerciements

J'adresse mes remerciements à Madame BERREBBAH Houria, Professeur à l'université Badji-Mokhtar d'Annaba, pour l'honneur qu'elle m'accorde en présidant ce jury.

Mes remerciements les plus distingués vont à mon directeur de thèse Monsieur LAHOUEL Mesbah, Professeur à l'université Seddik Ben Yahia de Jijel. Il m'a fait découvrir un riche domaine scientifique en me proposant ce thème, sa confiance en moi durant toutes ces années m'est très chère et m'a permise de me forger dans la recherche scientifique. J'espère que vous trouverez dans ce travail, un exemple du début d'une bonne recherche scientifique à laquelle j'aspire.

Je remercie mon co-directeur de thèse Monsieur DJEBAR Mohamed Réda, Professeur à l'université Badji-Mokhtar d'Annaba, pour sa disponibilité, sa confiance, son encouragement pendant toutes ces années de travail.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Madame BENDJEDDOU Dalila, Professeur à l'université du 8 mai 1945 de Guelma, en acceptant d'examiner mon modeste travail. Je vous remercie de m'avoir aidée de toutes les façons possibles pour achever cet humble travail.

Je remercie vivement Monsieur ZELAGUI Ammar, Professeur à l'université de Larbi Ben M'hidi de Oum El Bouaghi, de m'avoir honorée en examinant cet humble travail.

Je remercie également Monsieur OUALI Kaïreddine, Professeur à l'université Badji-Mokhtar d'Annaba, d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Je ne saurais jamais trouver les mots justes pour exprimer ma sincère gratitude envers Monsieur SERIDI Achour, Professeur à l'université 8 mai 1945 de Guelma. Son aide inestimable m'a été d'un grand appui. J'ai toujours trouvé auprès de lui les bonnes solutions aux problèmes et les bons conseils, qui m'ont permis d'avancer dans le bon chemin.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Monsieur MORIN Didier, Directeur de Recherche CNRS, Faculté de médecine à l'université Paris-Est, Créteil, France. Je suis chanceuse d'avoir rencontré l'expert de la mitochondrie, auprès de lui j'ai appris les ficelles de ce domaine, la valeur du temps et le dévouement pour la recherche scientifique. Dans toutes les étapes du travail, dans son laboratoire ou à distance, il a été un exceptionnel formateur. Qu'il trouve dans ma modeste thèse ma sincère gratitude.

Mes remerciements vont également à Monsieur KLOUZ Anis et Monsieur SALOUAGE Issam, professeurs au centre de pharmacovigilance de tunis, Tunisie. Ces Messieurs, m'ont accordée l'inestimable occasion d'avancer d'un grand pas dans mon travail de thèse. Ils étaient bienveillants et m'ont très bien accueillie dans leur laboratoire. Qu'ils trouvent dans cet humble travail ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement Monsieur BENOUARETH Djamel Eddine, Professeur et Doyen de la Faculté des SNTSU à l'université du 8 mai 1945 de Guelma, de m'avoir aidé et facilité la réalisation de mon travail expérimental. Je vous serai reconnaissante à tout jamais.

Je remercie également Monsieur MELLOUKI Adel et Docteur. LAOUAR Omar au laboratoire d'Anatomo-Pathologie à l'hôpital Ibn Rochd d'Annaba, pour leur précieuse contribution à l'étude histologique.

Je n'oublierai jamais ce qu'ont fait mes parents, mon mari, mes enfants, mes beaux-parents, mes frères, mes sœurs, mon grand-père et toute ma famille, mes amis et mes collègues pour m'épauler durant mes années d'étude. L'histoire que nous avons passée ensemble toutes ces années me marquera à tout jamais.

Dédicaces

A mon grand père

A mes parents et beaux parents

A mon mari

A mes enfants

A mes frères et sœurs

A toute ma famille

A mes très chers amis

Résumés

Résumé

Le stress oxydant est impliqué dans la pathogenèse de l'ischémie-reperfusion (I-R) qui peut se produire au cours de la transplantation myocardique. Par conséquent, l'utilisation des antioxydants peut minimiser les effets délétères de l'ischémie et encore plus de la reperfusion. La propolis est une substance naturelle riche en polyphénols ayant une activité antioxydante importante.

L'effet protecteur de la propolis au cours d'un épisode d'ischémie cardiaque a été étudié en utilisant deux modèles expérimentaux différents. Le premier est un modèle *ex vivo* d'I-R normothermique (30-60 minutes) sur cœurs de rats isolés et perfusés, la supplémentation de la propolis a été effectuée avant la période d'ischémie et pendant la période de reperfusion. Le deuxième modèle est une ischémie hypothermique sur cœurs de souris isolés et préservés à 4 °C pendant 8 et 24 heures dans la solution de Krebs–Henseleit supplémentée de propolis. Les niveaux de libération des marqueurs cardiaques lactate déshydrogénase (LDH), créatine phosphokinase (CPK) et troponine I (Trop I) suivie d'étude histopathologique ont été évalués. Les biomarqueurs de stress oxydant, le malondialdéhyde (MDA) et les produits avancés de protéines d'oxydation (AOPP) ainsi que le statut antioxydant, superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion (GSH) et glutathion S-transférase (GS-T) ont été évalués dans le tissu cardiaque. Les paramètres mitochondriaux, respiration mitochondriale, capacité de rétention calcique et la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont été également déterminés.

Dans les deux modèles d'ischémie, la supplémentation en propolis a protégé efficacement le cœur en réduisant les niveaux de lipides et de protéines oxydés, en restaurant l'activité des enzymes antioxydantes et en préservant l'intégrité du tissu myocardique altérée par l'ischémie. Dans toutes les conditions de la respiration mitochondriale, la propolis réduit significativement le taux de production des ERO. La propolis à faible concentration améliore la synthèse mitochondriale de l'ATP et protège le système de phosphorylation des dommages ischémiques. Elle diminue également l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale lors d'une surcharge calcique.

La propolis algérienne est un antioxydant non sensible à la température qui protège le cœur des dommages oxydatifs induits par une ischémie cardiaque.

Mots clés : Propolis ; Ischémie-reperfusion ; Ischémie hypothermique ; Stress oxydant ; Mitochondrie ; Cœur ; Souris ; Rat.

Abstract

Oxidative stress is involved in the pathogenesis of ischemia-reperfusion (I-R) that may occur during myocardial transplantation. Therefore, the use of antioxidants can minimize the deleterious effects of ischemia and even more of reperfusion. Propolis is a natural substance rich in polyphenols having an important antioxidant activity.

The protective effect of propolis during cardiac ischemia was studied using two experimental models. First, an *ex vivo* model of normothermic I-R (30-60 minutes) was applied on isolated and perfused rat hearts, propolis was supplemented before the ischemic period and during the reperfusion phase. Secondly, a model of hypothermic ischemia was applied on isolated and preserved mice hearts at 4 °C for 8 and 24 hours in the Krebs-Henseleit solution supplemented with propolis. Release levels cardiac markers lactate dehydrogenase (LDH), creatine phosphokinase (CPK) and troponin I (Trop I) followed by histopathological study were evaluated. Oxidative stress biomarkers, malondialdehyde (MDA) and advanced oxidation protein products (AOPP) as well as antioxidant status, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH) and glutathione S-transferase (GS-T) were evaluated in the heart tissue. Mitochondrial parameters like mitochondrial respiration, calcium retention capacity and production of reactive oxygen species (ROS) were also determined.

In both models of ischemia, propolis supplementation protected effectively the heart by reducing oxidized lipid and protein levels, restoring the activity of antioxidant enzymes and preserving the myocardial tissue integrity altered by ischemia. In all conditions of mitochondrial respiration, propolis significantly reduces the rate of ROS production. Low concentration propolis improves the mitochondrial synthesis of ATP and protects the phosphorylation system from ischemic damage. It also decreases the opening of mitochondrial permeability transition pore mPTP during a calcium overload.

Algerian propolis is a non-temperature-sensitive antioxidant that protects the heart from oxidative damage induced by myocardial ischemia.

Key words: Propolis; Ischemia-reperfusion; Hypothermic ischemia; Oxidative stress; Mitochondria; Heart; Mouse; Rat.

الملخص

يساهم الإجهاد التأكسدي في نقص وإعادة التروية التي قد تحدث أثناء زرع عضلة القلب. ولذلك فإن استخدام مضادات الأكسدة يمكن أن يقلل من الآثار الضارة الناتجة عن نقص تروية القلب بل وحتى أضرار إعادة التروية. ويعتبر الدنج أو العكبر (البروبوليس) مادة طبيعية غنية بالبوليفينول لها نشاط كبير مضاد للأكسدة.

تمت دراسة التأثير الوقائي للعكبر خلال حلقة من نقص تروية القلب باستخدام نموذجين تجريبيين مختلفين. الأول هو نموذج خارج الجسم لنقص وإعادة التروية في الحرارة العادية لمدة (60-30 دقيقة) على قلوب فئران معزولة ومثبته، واستعملت كمكلمات الدنج قبل فترة نقص التروية وخلال إعادة التروية. أما النموذج الثاني فهو نقص التروية في حرارة منخفضة على قلوب فئران معزولة ومحفوظة في 4 م° لمدة 8 إلى 24 ساعة في محلول Krebs-Henseleit مكمل بالعكبر. أجريت عملية تقييم لمستويات تحرير كل من الـ lactate déshydrogénase (LDH) والـ créatine phosphokinase (CPK) والـ troponine I (Trop I) متبوعة بدراسة مرضيات الأنسجة. تم تقييم الواسمات الحيوية للإجهاد التأكسدي، الـ malondialdéhyde (MDA) والمواد المتقدمة لبروتينات الأكسدة (AOPP) وبالإضافة إلى الحالة المضادة للأكسدة الـ superoxyde dismutase (SOD) والـ catalase (CAT) والـ glutathion-S- transférase (GS-T) و الـ glutathion (GSH) في النسيج القلبي. تم تحديد المعلمات الميتوكوندرية، التنفس الميتوكوندري، والقدرة على الاحتفاظ بالكالسيوم وإنتاج أنواع تفاعلية للأكسجين (ERO).

وفرت كمكلمات العكبر حماية فعالة للقلب بتخفيض مستويات الدهون والبروتينات المؤكسدة، واستعادة نشاط الأنزيمات المضادة للأكسدة من خلال المحافظة على سلامة الأنسجة النالفة بسبب نقص وإعادة التروية. في جميع ظروف التنفس الميتوكوندري، فإن العكبر يقلل بدرجة كبيرة من معدل إنتاج الـ ERO. العكبر بتركيز منخفض يحسن تخليق الميتوكوندريا للـ ATP ويحمي نظام الفسفرة. كما أنه يقلل من فتح مسام انتقال النفاذية للميتوكوندريا أثناء الحمل الزائد للكالسيوم.

يعتبر البروبوليس الجزائري مضادا للأكسدة غير حساس للحرارة يحمي القلب من الأضرار التأكسدية الناتجة عن نقص التروية في القلب.

الكلمات المفتاحية: العكبر (البروبوليس)، نقص التروية وإعادة التروية، نقص التروية بانخفاض الحرارة، إجهاد تأكسدي، ميتوكوندريا، قلب، فأر، جرد.

Listes des figures

Figure 1: Structure de la mitochondrie	6
Figure 2: Schéma illustrant la phosphorylation oxydative mitochondriale	8
Figure 3: Illustration de la production de l'anion superoxyde au niveau des complexes de la CRM	10
Figure 4: Transport du calcium à travers la membrane interne mitochondriale.....	10
Figure 5: Modèle structural du pore de transition de perméabilité mitochondriale	11
Figure 6: Formation en cascade des différentes ERO à partir du radical superoxyde	14
Figure 7: Illustration du métabolisme des ERO lors de l'I-R (sources, formes, cibles, inhibition)	15
Figure 8: Installation de l'infarctus du myocarde et facteurs influençant son évolution. ..	18
Figure 9: Illustration des évènements mitochondriaux déclenchés par l'I-R myocardique	22
Figure 10: Ischémie régionale réalisée par ligature de la LAD.....	30
Figure 11: Photographies représentatives de la taille de l'infarctus mesurée par coloration au TTC.....	32
Figure 12: Structures de base des principales sous-classes des polyphénols	41
Figure 13: Réduction d'un radical libre (R •) par un flavonoïde.....	43
Figure 14: Principales caractéristiques structurales des flavonoïdes	44
Figure 15: Aspects et couleurs de la propolis.....	47
Figure 16: Dispositif du système de perfusion du cœur de rat isolé en mode Langendorff à circuit ouvert.....	56
Figure 17: Dispositif du système de perfusion du cœur de rat isolé en mode Langendorff à circuit fermé.....	57
Figure 18: Description des différents groupes expérimentaux du modèle d'I-R.	58
Figure 19: Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols à concentrations croissantes en acide gallique.....	65
Figure 20: Activité de piégeage <i>in vitro</i> des radicaux libres par la propolis et par des antioxydants de référence à différentes concentrations.....	66
Figure 21: Effet de la supplémentation en propolis sur la peroxydation lipidique induite lors de l'I-R <i>ex vivo</i>	67
Figure 22: Effet de l'I-R et de la supplémentation en propolis sur l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase.....	68

Figure 23: Effet de l'I-R et de la supplémentation en propolis sur le taux de glutathion réduit et l'activité de la glutathion-S-transférase.	69
Figure 24: Effet de la propolis sur la lésion cardiaque induite par l'I-R chez le rat.	70
Figure 25: Description des différents groupes expérimentaux du modèle d'ischémie hypothermique.....	84
Figure 26: Représentation schématique des stades de respiration en fonction du temps...	89
Figure 27: Courbe typique de mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries (CRC).	90
Figure 28: Exemple typique d'enregistrement de la production de H ₂ O ₂ par les mitochondries.	92
Figure 29: Effet de la supplémentation en propolis sur l'oxydation des lipides et des protéines lors d'une ischémie hypothermique.	94
Figure 30: Effet de l'ischémie froide et de la supplémentation en propolis sur les niveaux de la superoxyde dismutase et de la catalase du myocarde.	96
Figure 31: Effet de l'ischémie froide et de la supplémentation en propolis sur les niveaux du glutathion réduit et de la glutathion S-transférase du myocarde.	97
Figure 32: Variations des vitesses et des coefficients de respiration des mitochondries isolées de cœurs ischémiques et traités par la propolis.	99
Figure 33: Variation de la production de peroxyde d'hydrogène à partir des mitochondries respirant sur glutamate/malate en absence ou en présence de roténone.....	101
Figure 34: Variation de la production de peroxyde d'hydrogène à partir des mitochondries respirant sur succinate en absence ou en présence de roténone et d'antimycine.	103
Figure 35: Variation de la capacité de la rétention du calcium au niveau des mitochondries isolées de cœurs ischémiques et traités.	104
Figure 36: Effet de la propolis sur une lésion cardiaque induite par l'ischémie hypothermique chez la souris.	106

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition des solutions de préservation hypothermique d'organes.....	37
Tableau 2: Valeurs des IC ₅₀ de la propolis et des antioxydants de références.....	66
Tableau 3: Examen histologiques des cœurs de rats ayant subi une I-R normothermique (30-60 min).....	72
Tableau 4: Examen histologique du tissu cardiaque de souris soumis à une ischémie hypothermique de 8 et 24 h avec ou sans supplémentation en propolis.....	108

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
AAR	Aire à risque
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AIF	Facteur induisant l'apoptose
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ANOVA	Analyse de variance à un facteur
ANT	<i>Adenine nucleotide translocase</i>
AOPP	<i>Advanced oxidation prtein products</i>
ATP	Adénosine triphosphate
Bax	Protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2.
Bcl-2	Une famille de protéines pro-apoptotiques
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAPE	<i>Cafeic acid phenethyl ester</i>
CAT	Catalase
CATR	Carboxyatractyloside
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzène
CI₅₀	Concentration d'extrait nécessaire pour l'inhibition de 50 % du DPPH*
CoQ	Co-enzyme Q
CORM³	<i>CO-releasing molecule</i>
COX	Cyclo-oxygénase
CPK	Créatine phosphokinase
CRC	Capacité mitochondriale de rétention calcique
CRM	Chaîne respiratoire mitochondriale
CsA	Cyclosporine A
CyP-D	Cyclophyline D
DMSO	Diméthylsulfoxyde

DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DTNB	Acide 5,5-dithio2-nitrobenzoïque
E	Ethanol
EC	Solution de Euro-Collins
EDTA	<i>Ethylene diamine tetra-acetic Acid</i>
EEC	<i>European community council directive</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(β-aminoéthyl ether)-N, N, N', N'-tetra-acetic acide</i>
ELFA	<i>Enzyme-Linked Fluorescent Assay</i>
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FADH	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
GC-MS	<i>Gas chromatography–mass spectrometry</i>
GM	Glutamate Malate
GS-T	Glutathion S-transférase
GSSG	Glutathion oxydé
GSH	Glutathion réduit
GPx	Glutathion peroxydase
HE	Hématoxyline éosine
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HES	<i>Hydroxyethyl starch</i>
HK	Héxokinase
HNE	4-hydroxynonéal
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horse Radish peroxydase</i>
HTK	Histidine-Tryptophane-k(c)étoglutarate
ICLAS	Conseil International des Sciences des Animaux de Laboratoire
IDM	Infarctus du myocarde
IFN-γ	Interféron gamma

IL	Interleukine
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
I-R	Ischémie-reperfusion
KH	Solution de Krebs -Hensleit
LAD	<i>Left anterior descending coronary artery</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
LVDP	Pression développée ventriculaire gauche
LVEDP	Pression diastolique d'extrémité ventriculaire gauche
MAC	<i>Mitochondrial apoptosis induced channel</i>
MDA	Malondialdéhyde
Mito-K_{ATP}	Canaux potassique mitochondriaux dépendants de L'ATP
NAC	N-acétylcystéine
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT	Nitrobluetétrazolium
NF_κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
iNOS	NO synthase inductible
nNOS	NO synthase neuronale
P	Propolis
PCI	Présconditionnement ischémique
PEG	Polyéthylène glycol
PostCI	Postconditionnement ischémique
PTPm	Pore de transition de perméabilité mitochondriale
RET	<i>Reverse electron transfert</i>
RISK	<i>Reperfusion injury survival kinase</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RP-HPLC -DAD	<i>Reversed phase chromatography , diode array detector</i>
SOD	Superoxyde dismutase
ST	Solution cardioplégique de l'Hôpital Saint-Thomas

TAA	<i>Total antioxidant activity</i>
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i>
TCA	<i>Tricarboxylic acid</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Trop-I	Troponine I
TTC	Triphényltétrazolium
TUNEL	<i>Terminal transferase-mediated dUTP nick end-labeling</i>
UC	Uniport calcique
UDP	Uridine diphosphate.
UTP	Uridine triphosphate
UV	Ultra violet
UW	Solution de l'University de Wisconsin
VDAC	<i>Voltage-Dependent Anion Channel</i>
VG	Ventricule gauche
XO	Xanthine oxydase
ΔpH	Gradient électrochimique
$\Delta$$\psi$	Potentiel de membrane mitochondrial

Tables des matières

Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabe	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	

Introduction	1
---------------------------	----------

Revue Bibliographique

I. Mitochondrie et Stress oxydant.....	6
---	----------

I.1. Mitochondrie	6
-------------------------	---

I.1.1. Structure et composition de la mitochondrie	6
--	---

I.1.2. Fonctions de la mitochondrie	7
---	---

I.2. Stress oxydant	13
---------------------------	----

I.2.1. Espèces réactives de l'oxygène	13
---	----

I.2.2. Système antioxydant	15
----------------------------------	----

I.2.3. Evaluation du stress oxydant.....	16
--	----

II. Ischémie-reperfusion cardiaque	18
---	-----------

II.1. Définition de l'ischémie-reperfusion cardiaque.....	18
---	----

II.2. Evènements cellulaires médiés par l'ischémie-reperfusion.....	19
---	----

II.2.1. Evènements cellulaires liés à l'ischémie	19
--	----

II.2.2. Evènements cellulaires liés à la reperfusion	23
--	----

II.3. Stratégies de lutte contre l'ischémie-reperfusion myocardique.....	26
--	----

II.3.1. Pré- et Post-conditionnement ischémique.....	26
II.3.2. Stratégies pharmacologiques de cardioprotection	27
II.4. Modèles expérimentaux d'étude de l'ischémie-reperfusion cardiaque	29
II.4.1. Modèles <i>in Vivo</i>	30
II.4.2. Modèle <i>ex vivo</i>	30
II.4.3. Modèles <i>in vitro</i>	31
II.4.4. Modèles <i>in silico</i>	31
II.5. Evaluation des lésions induites par l'ischémie-reperfusion.....	32
II.5.1. Paramètres hémodynamiques	32
II.5.2. Mesure de la taille de l'infarctus.....	32
II.5.3. Marqueurs de souffrance cellulaire cardiaques	33
II.5.4. Paramètres du stress oxydant.....	33
II.5.5. Nécrose, apoptose et libération des facteurs proapoptotiques	33
II.5.6. Evaluation de l'intégrité mitochondriale des cardiomyocytes.....	34
III. Préservation du greffon cardiaque	35
III.1. Préservation statique hypothermique : principe et limites	35
III.2. Solutions de préservation	35
III.2.1. Composition	36
III.2.2 Exemples de solutions de préservation.....	36
III.4. Nouvelles stratégies de préservation du greffon cardiaque	38
III.4.1. Nouvelles formulations de solutions de préservation du cœur.....	38
III.4.2. Supplémentation de la solution de préservation standard avec des agents anti-ischémiques	39
III.4.3. Perfusion du greffon cardiaque	39
III.4.4. Préservation normothermique	39
III.4.5. Pré-conditionnement et post-conditionnement de la greffe cardiaque	40

IV. Propolis et Antioxydants naturels 41

IV.1. Antioxydants naturels..... 41

IV.1.1. Polyphénols..... 41

IV.1.2. Flavonoïdes..... 42

IV.1.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes..... 43

IV.2. Propolis..... 46

IV.2.1. Description de la propolis 46

IV.2.2. Origine et composition de la propolis..... 47

IV.2.3. Extraction de la propolis et problème de standardisation..... 48

IV.2.4. Propriétés biologiques de la propolis..... 49

IV.2.5. Propolis et ischémie-reperfusion 50

Première partie expérimentale: Modèle *ex vivo* d'ischémie-reperfusion cardiaque

I. Matériel biologique 53

I.1. Animaux..... 53

I.2. Substance flavonoïdique : Propolis..... 53

II. Méthodes 54

II.1. Solubilisation de la propolis 54

II.2. Dosage des polyphénols..... 54

II.3. Activité antioxydante 54

II.4. Protocole expérimental de l'ischémie-reperfusion normothermique *ex vivo* 55

II.4.1 Sacrifice des rats 55

II.4.2 Description du dispositif de Langendorff..... 55

II.4.3 Description du protocole d'ischémie-reperfusion normothermique *ex vivo*..... 57

II.5. Préparation de la fraction cytosolique.....	59
II.6. Evaluation de la peroxydation lipidique	59
II.7. Evaluation du statut antioxydant.....	60
II.7.1. Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)	60
II.7.2. Evaluation de l'activité de la catalase (CAT)	60
II.7.3. Dosage du glutathion réduit (GSH)	61
II.7.4. Evaluation de l'activité de la glutathion S-transférase (GS-T).....	62
II.7.5. Dosage des protéines	63
II.8. Evaluation des paramètres biochimiques cardiaques.....	63
II.9. Analyse histopathologique.....	64
II.10. Analyse statistique	64

III. Résultats et interprétation..... 65

III.1. Dosage des polyphénols	65
III.2. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	65
III.3. Effet de la propolis sur la peroxydation lipidique induite par l'ischémie-reperfusion	67
III.4. Evaluation du statut antioxydant	67
III.4.1. Restauration de l'activité de la SOD et de la CAT par la propolis.....	67
III.4.2. Restauration du taux de GSH et de l'activité de la GS-T par la propolis.....	68
III.5. Protection de l'intégrité du tissu cardiaque par la propolis	69
III.6. Etude histopathologique	71

IV. Discussion 74

Deuxième partie expérimentale: Modèle *in vitro* d'ischémie cardiaque

hypothermique

I. Matériel biologique	83
I.1. Animaux et entretien	83

I.2. Substance flavonoïdique : Propolis	83
II. Méthodes	83
II.1. Solubilisation de la propolis	83
II.2. Protocole expérimental de l'ischémie hypothermique <i>in vitro</i>	83
II.2.1 Sacrifice des souris	83
II.2.2 Description du modèle d'ischémie hypothermique <i>in vitro</i>	84
II.3. Préparation de la fraction cytosolique	85
II.4. Détermination des dommages oxydatifs aux lipides et aux protéines	86
II.4.1. Evaluation de la peroxydation lipidique	86
II.4.2. Evaluation de l'oxydation protéique	86
II.5. Évaluation du statut antioxydant	87
II.5.1. Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase	87
II.5.2. Evaluation de l'activité de la catalase (CAT)	87
II.5.3. Dosage du glutathion	87
II.5.4. Evaluation de l'activité de la Glutathion S-Transférase	87
II.6. Evaluation des paramètres mitochondriaux sur le modèle d'ischémie hypothermique	87
II.6.1. Isolement des mitochondries cardiaques	87
II.6.2. Respiration mitochondriale	88
II.6.3. Capacité de rétention du calcium (Pulse calcique)	89
II.6.4. Mesure de la production des ERO	91
II.7. Evaluation des paramètres biochimiques cardiaques	92
II.8. Analyse histopathologique	92
II.9. Analyse statistique	93
III. Résultats	94

III.1. Protection du cœur ischémique des dommages oxydatifs par la propolis.....	94
III.2. Restauration de l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT par la propolis	95
III.4. Effet de la propolis sur la respiration mitochondriale	98
III.5. Réduction de la production mitochondriale des ERO par la propolis	100
III.6. Effet de la propolis sur la capacité de rétention du calcium.....	104
III.7. Effet protecteur de la propolis sur l'intégrité du tissu cardiaque.....	105
III.8. Etude histopathologique	107
IV. Discussion	110
Conclusion générale	125
Références Bibliographiques.....	128
Annexes	157

Introduction

Introduction

L'ischémie est classiquement définie par une réduction ou par l'interruption du débit sanguin dans un territoire vasculaire donné, responsable d'une inadéquation entre les apports en oxygène et en substrats énergétiques, et les besoins de la cellule pour son fonctionnement et sa survie (Cour et Argaud, 2010).

L'ischémie myocardique résulte d'une déficience grave de l'apport sanguin coronaire, généralement provoquée par une thrombose ou une athérosclérose. Cette ischémie est à l'origine de nombreuses situations cliniques. Elle peut être secondaire à une interruption complète du flux sanguin comme dans l'infarctus du myocarde (IDM) qui demeure au début du XXIème siècle la principale cause de décès dans le monde. Elle peut également être liée à une diminution de la perfusion tissulaire en dessous d'un seuil critique comme cela s'observe dans l'angine de poitrine (Argaud et al., 2006).

La principale option thérapeutique offerte aux cliniciens, actuellement, est la reperfusion qui consiste à restaurer le flux sanguin le plus rapidement possible dans les organes ischémiés. Ces interventions cliniques sont l'angioplastie coronaire, la thrombolyse ou le pontage coronarien (Brophy et Bogaty, 2004 ; Buja, 2005 ; Grothusen et al., 2017).

Si la reperfusion reste le seul moyen de sauver les organes ischémiés, il est également admis qu'elle peut aussi engendrer par elle-même et de façon paradoxale d'autres lésions cellulaires pouvant même aboutir à la mort cellulaire par nécrose ou par apoptose. En effet, la récupération fonctionnelle après reperfusion dépend en grande partie de la durée de la période ischémique : plus la période est longue, plus le cœur est susceptible de subir des dommages irréversibles (Suleiman et al., 2001).

A l'échelle cellulaire, l'hypoxie prolongée est à l'origine d'un déséquilibre de l'homéostasie métabolique et ioniques secondaire à une acidose et une surcharge calcique cellulaire. Par conséquent, une perte de la polarité membranaire, un gonflement cellulaire et une désorganisation du cytosquelette peuvent aboutir à une nécrose cellulaire (Cour et Argaud, 2010). Suite à une réoxygénation cellulaire, correspondant à une réintroduction brutale et massive de l'oxygène, la chaîne respiratoire mitochondriale, fonctionnellement endommagée par l'état d'hypoxie, produit excessivement des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ayant des effets délétères pour le fonctionnement cellulaire. Une activation des voies

de signalisation de l'apoptose conduit ainsi des cellules irrémédiablement lésées par l'ischémie vers la mort cellulaire par apoptose (Monassier, 2008).

Des progrès importants dans la compréhension des mécanismes cytoprotecteurs des dommages liés à l'ischémie-reperfusion (I-R) ont eu lieu ces dernières années mettant en exergue le rôle essentiel de la mitochondrie au cœur de ces voies de signalisation (Morin et al., 2001). En effet, au niveau des myocytes, les mitochondries sont la principale source d'énergie ainsi que la génération des ERO via la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Elles occupent plus de 30% du volume cellulaire. En conséquence, tout dommage affectant l'intégrité des mitochondries au cours de l'ischémie, influence le taux de production des ERO en phase de reperfusion (Wiedemann et al., 2013 ; Pei et al., 2016). En outre, il est important de préciser que la production des ERO a toujours été liée à la période de reperfusion, mais des études ont montré que la génération des ERO commence en phase d'ischémie et s'accroît dans les premiers moments de reperfusion sanguine (Becker et al., 1999 ; Paradies et al., 1999 ; Charniot et al., 2010)

Des niveaux élevés d'ERO ont des effets cytotoxiques sur le cœur. Ils initient des réactions d'oxydation ciblant essentiellement les lipides. Par conséquent, les ERO peuvent induire une perte de perméabilité membranaire et particulièrement celle de la membrane mitochondriale. De telles conséquences néfastes peuvent être évitées lorsque la capacité antioxydante de la cellule est maintenue. Dans l'I-R, la génération des ERO dépasse la capacité antioxydante cellulaire. En conséquence, le déséquilibre qui en résulte conduit à un état de stress oxydant se manifestant par une perte d'intégrité cellulaire pouvant conduire à une lésion irréversible des cellules myocardiques (Trachtenberg et Hare, 2009 ; Douglas et Sawyer, 2011).

D'autre part, l'ischémie, séquence incontournable dans la transplantation cardiaque, est à l'origine de processus physiopathologiques contribuant aux lésions du greffon. Ces dernières sont aggravées par la reperfusion du greffon lors de son implantation chez le receveur.

Par ailleurs, le succès de la transplantation cardiaque a toujours impliqué le développement de nouvelles méthodes de conservation du cœur. Depuis la première solution de préservation de greffon rénal formulée par Belzer en 1967, plusieurs stratégies de conservation, telles que l'hypothermie (Belzer et al., 1967 ; Minasian et al., 2015), la

perfusion continue du cœur arrêté avec de l'oxygène gazeux (Suszynski et al., 2012) et le pré- et post-conditionnement (Galagudza et al., 2008) ont vu le jour visant à minimiser le dysfonctionnement du greffon. En raison de la complexité de l'application clinique des techniques avancées, la conservation statique à froid dans des solutions spécifiques de préservation reste le procédé standard pour la préservation du cœur (Yuan et al., 2010). Cependant, ce stockage du cœur est limité dans le temps ; il ne peut pas assurer une récupération efficace de la greffe cardiaque après plus de 4 à 6 heures de conservation statique à froid (Jahania et al., 1999).

L'utilisation de l'hypothermie pour protéger le cœur n'est pas suffisante. Les solutions de préservation comprennent des substrats métaboliques, des agents osmotiques, des tampons organiques pour protéger l'œdème tissulaire et maintenir la viabilité cellulaire aussi longtemps que possible (Cobert et al., 2010). Depuis la mise en évidence de l'implication du stress oxydant dans la pathogenèse de l'I-R, les solutions de conservation du cœur standard sont améliorées par des suppléments en antioxydants et piègeurs de radicaux libres (Kalogeris et al., 2012 ; Minasian et al., 2015; Zhou et al., 2015). Ces solutions sont la solution de l'University Wisconsin (UW) et la solution Celsior qui sont enrichies en glutathion piégeant les ERO lors de la reperfusion (Menasche et al., 1991 ; Kajihara et al., 2006).

Puisque l'intégrité mitochondriale et la génération des ERO sont les facteurs fondamentaux de la lésion ischémique, l'utilisation de piègeurs d'ERO efficaces peut augmenter la résistance myocardique à l'ischémie pour mieux affronter les conséquences de la reperfusion (Aldakkak et al., 2012). Plusieurs études expérimentales ainsi que des essais cliniques ont démontré les effets cardioprotecteurs des antioxydants au cours de l'I-R (Lassnigg et al., 2003 ; Rodrigo et al., 2013). L'hypothèse selon laquelle les ERO jouent un rôle dans les lésions d'I-R a été initialement développée à partir d'études montrant que la superoxyde dismutase, première enzyme piègeuse de l'anion superoxyde, pouvait réduire les lésions de reperfusion dans les intestins de chat ischémiques (Granger et al., 1981).

L'utilisation des extraits de plantes médicinales pourvues de propriétés antioxydantes et riches en polyphénols et particulièrement les flavonoïdes, ont été appliqués dans de nombreux modèles d'I-R myocardique (Zucchi et al., 2007 ; Akhlaghi et Bandy, 2009 ; Dare et al., 2015) et s'avère une voie prometteuse pour la cardioprotection.

La propolis, connue comme étant un produit de la ruche, est un mélange résineux aromatique de substances naturelles collectées par les abeilles sur les bourgeons et l'écorce des plantes et des arbres (Bankova, 2005). La composition de la propolis varie en fonction de son origine botanique, mais les flavonoïdes sont les composants bioactifs dominants de la propolis à laquelle ils confèrent un large spectre d'activités biologiques (Barbari^ć et al., 2011 ; Sforcin et Bankova, 2011) ; la plus reconnue est l'activité antioxydante (Ahn et al., 2007; Kalogeropoulos et al., 2009). En effet, la propolis algérienne riche en flavonoïdes comme la pinostrobin-chalcone, la tectochrysin et la pinocembrine a déjà démontré son efficacité contre le stress oxydant au niveau du cœur, foie et rein induit par les agents anticancéreux (Lahouel et al., 2004 ; Alyane et al., 2008 ; Benguedouar et al., 2008 ; Lahouel et al., 2011). De plus, des études utilisant la propolis provenant d'autres pays ont montré un effet protecteur important dans les modèles *in vivo* d'I-R cérébrale et rénale (Shimazawa et al., 2005; da Costa et al., 2015 ; Bazmandegan et al., 2017).

À notre connaissance, aucune étude de l'effet de la propolis n'a été effectuée sur l'I-R myocardique. En outre, la majorité des recherches se sont concentrées sur les lésions générées lors de la reperfusion après une ischémie myocardique alors que les événements cellulaires survenant pendant la phase ischémique restent mal compris. Dans ce contexte, la présente étude vise à déterminer si la propolis algérienne peut protéger le cœur contre les dommages oxydatifs au cours d'un épisode d'ischémie myocardique.

Notre approche consiste d'abord à induire une ischémie cardiaque selon deux modèles expérimentaux différents. Le premier est un modèle d'ischémie globale normothermique de 30 minutes réalisée selon le dispositif de Langendorff sur des cœurs perfusés de rats. L'ischémie est ensuite suivie de reperfusion normothermique pendant 60 minutes. Le deuxième modèle expérimental testé est celui d'une ischémie hypothermique correspondant à une préservation à froid, statique et prolongée de cœurs de souris.

Dans une deuxième étape de l'approche adoptée, le traitement des cœurs ischémiés par la propolis se fait par la supplémentation, par la propolis, de la solution de perfusion, pour le modèle *ex vivo* d'I-R, ou de la solution de préservation, pour le modèle *in vitro* d'ischémie hypothermique.

L'effet cardioprotecteur de la propolis a été déterminé par :

- L'évaluation du statut oxydant et antioxydant de la cellule cardiaque,
- L'évaluation de l'intégrité cellulaire en quantifiant le taux de libération des marqueurs cardiaques dans la solution de perfusion ou de préservation, ainsi qu'en effectuant une analyse histopathologique.
- La compréhension du mécanisme d'action de la propolis en mesurant certains paramètres mitochondriaux ayant un rôle clé dans les lésions d'I-R.

Le manuscrit est structuré en deux parties expérimentales précédées d'une mise au point bibliographique apportant des détails sur l'I-R, l'implication de la mitochondrie et du stress oxydant dans sa physiopathologie, les principes fondamentaux de la préservation d'organes et enfin sur la propolis considérée comme la substance polyphénolique de notre étude.

La première partie expérimentale, concernant l'I-R normothermique réalisée sur un modèle de cœur perfusé de rat, est divisée en trois sous-parties décrivant respectivement le matériel biologique étudié, les méthodes utilisées, les résultats obtenus, leur interprétation et leur discussion.

La deuxième partie, relative à l'ischémie hypothermique suit le même enchaînement qui commence par le matériel biologique ainsi que les méthodes utilisées puis la représentation des résultats suivie de leur interprétation. Une discussion expliquant l'ensemble des résultats obtenus et leurs comparaisons avec ceux de la littérature vient clôturer cette partie.

Le travail de thèse est achevé par une conclusion générale et des perspectives.

Mitochondrie et Stress oxydant

I. Mitochondrie et Stress oxydant

I.1. Mitochondrie

I.1.1. Structure et composition de la mitochondrie

La mitochondrie est un organe intracellulaire indispensable à la vie des cellules eucaryotes car elle représente le siège principal de la production de l'énergie. Le nombre de mitochondries par cellule est approximativement lié aux besoins énergétiques de la cellule. Les organes très actifs métaboliquement, tels que le cœur contiennent le plus grand nombre de mitochondries (Szewczyk, 2002). Ces dernières occupent 30 % du volume total de chaque cardiomyocyte (Pei et al., 2016) et sont situées entre les myofibrilles et juste en dessous du sarcolemme. Le positionnement stratégique et l'abondance des mitochondries garantissent un système d'administration d'ATP localisé hautement efficace pour soutenir la contraction, le métabolisme et l'homéostasie des ions des cardiomyocytes (Gustafsson et Gottlieb, 2007).

La mitochondrie est un organe cellulaire d'environ 2 à 10 μm de longueur et de 0,5 à 1 μm de largeur. Elle se compose de deux membranes, une externe et une interne, qui délimitent trois milieux qui sont le milieu extramitochondrial (cytoplasme de la cellule), l'espace intermembranaire et la matrice (figure 1).

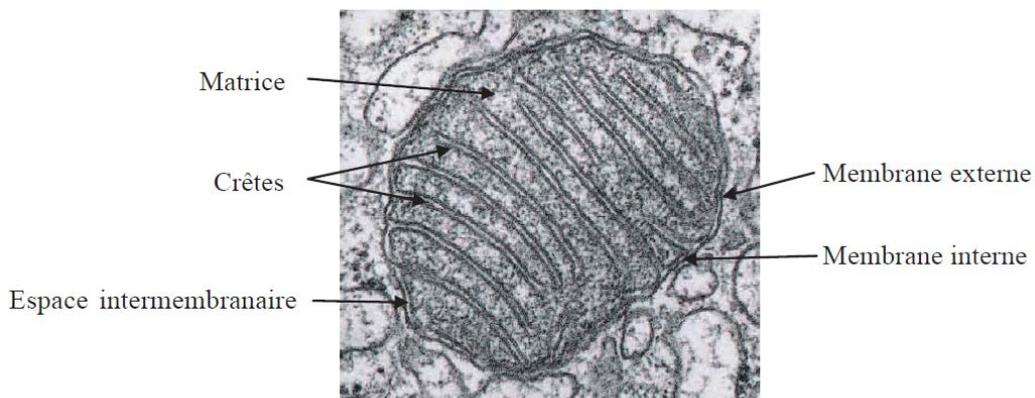


Figure 1: Structure de la mitochondrie (Paulis, 2011).

I.1.2. Fonctions de la mitochondrie

Les mitochondries ont des fonctions multiples qui dépendent du type cellulaire considéré. Elles jouent un rôle dans la synthèse d'énergie, l'homéostasie calcique, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), la synthèse d'hormones stéroïdes et de l'hème (Neviere, 2008). Les mitochondries sont également d'importants régulateurs de la mort cellulaire, répondant à une grande variété de signaux de stress, notamment la perte de facteurs de croissance, l'hypoxie, le stress oxydant et les dommages à l'ADN (Gustafsson et Gottlieb, 2007).

I.1.2.1. Phosphorylation oxydative

La particularité de la mitochondrie est de pouvoir convertir une partie de l'énergie des oxydations en une forme chimique : l'ATP. Schématiquement, les réactions de phosphorylation oxydative, assimilées à une respiration mitochondriale, se déroulent en trois étapes :

- formation d'acétyl-CoA à partir de la dégradation des glucides et des lipides ;
- intégration de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs et constitution d'un pool matriciel de coenzymes réduits (NADH et FADH₂), donneurs d'électrons ;
- transfert des électrons des coenzymes réduits à l'oxygène moléculaire par l'intermédiaire des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et couplage de l'oxydation à la synthèse d'ATP (Argaud et al., 2006; Neviere, 2008).

La CRM est composée de quatre complexes hétéropolymériques localisés dans la membrane interne mitochondriale (figure 2). Ces complexes catalysent une suite de réactions d'oxydoréduction permettant le passage des électrons à partir des complexes I ou II. A ce niveau, les électrons sont véhiculés par l'ubiquinone (le coenzyme Q ou CoQ) qui sera réduits en ubiquinol. Ce dernier est réoxydé par le complexe III, qui transfère à son tour les électrons au cytochrome c, puis à la cytochrome oxydase (complexe IV) et enfin à l'oxygène, générant ainsi de l'H₂O.

Le transfert des électrons induit par les différences de potentiels d'oxydoréduction des complexes est couplé à des modifications allostériques des protéines des complexes I, III et

IV associées à l'expulsion de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce mouvement de protons permet la création d'un gradient de pH (ΔpH) à travers la membrane mitochondriale interne avec une concentration matricielle de protons plus faible que celle de l'espace intermembranaire. Il permet également de générer un potentiel membranaire ($\Delta\psi$ de -180mV) à travers la membrane mitochondriale interne. L'énergie emmagasinée dans le gradient électrochimique de protons (positif à l'extérieur) est utilisée par le complexe V (F_1-F_0 ATP synthase) pour phosphoryler l'ADP en ATP (Figure 2) (McFalls et al., 2003 ; Murphy, 2009).

Il est important de noter que le coenzyme Q porteur d'électrons est commun aux complexes I, II et III. Ce qui permet à ces complexes d'exister dans de multiples configurations, de sorte que les électrons puissent circuler du complexe I au III, du complexe II au III, du complexe I au II et du complexe II au I (figure 2) (Pell et al., 2016).

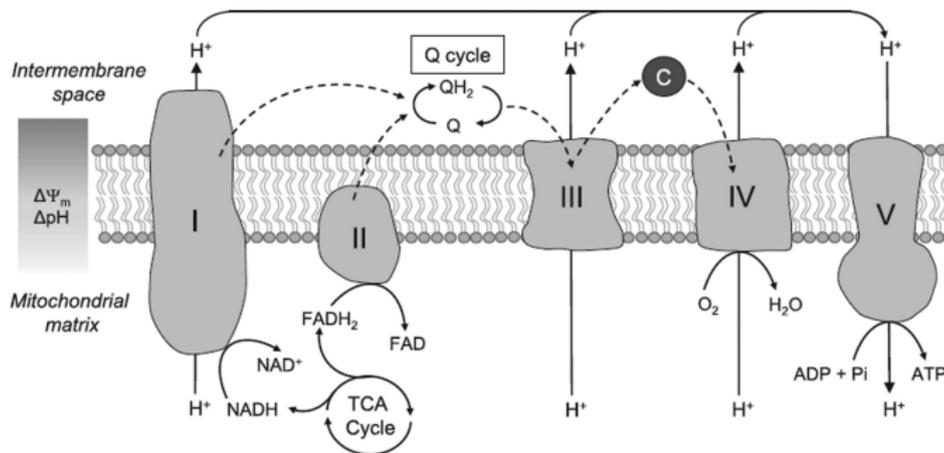


Figure 2: Schéma illustrant la phosphorylation oxydative mitochondriale (Pell et al., 2016).

Complexes I : NADH ubiquinone oxydoréductase. Complexe II : succinate déshydrogénase. Complexe III : ubiquinol cytochrome c oxydoréductase. Complexe IV : cytochrome c oxydase. Complexe V : F1- F0 ATP synthase. Coenzyme Q : ubiquinone. C : cytochrome c. TCA : acide tricarboxylique. Les flèches en pointillés indiquent le chemin des électrons.

I.1.2.2. Production des espèces réactives de l'oxygène

Les mitochondries sont une source majeure d'ERO. Près de 0,2 à 2 % de l'oxygène consommé par les mitochondries pendant la respiration est converti en anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$). En plus, la densité des mitochondries dans les cardiomyocytes et le taux élevé de

phosphorylation oxydative peuvent y entraîner une production de quantités importantes d' $O_2^{\cdot-}$ (Gustafsson et Gottlieb, 2007).

a. Production des ERO au niveau du complexe I

Le complexe I est une source majeure de fuite d'électrons entraînant la production des ERO dans la CRM. Le site de génération des ERO sur le complexe I semble être le domaine de liaison à l'ubiquinone où se produit également le transfert reverse d'électrons (RET *reverse electron transfert*) dirigé par le succinate du complexe II (Lo Iacono et al., 2011). Ce site est également le même site où la roténone bloque le transfert d'électrons vers le CoQ (figure 3) (Pell et al., 2016). La production des ERO à partir du complexe I dépend plus du ΔpH que du $\Delta\psi$ et est donc moins dépendante de l'activation des mitochondries (Lambert et Brand, 2004).

b. Production des ERO au niveau du complexe II

Le complexe II influence la production des ERO au niveau du complexe I (via le RET) et au complexe III (figure 3) (Murphy, 2009). Bien que certaines preuves suggèrent que le complexe II représente une source de production des ERO dans certaines conditions (Quinlan et al., 2012), seuls les complexes I et III sont globalement acceptés comme générateurs principaux. En effet, une application de roténone au complexe I résulte à une diminution des ERO induites par le succinate ce qui correspond à une perte de RET au complexe I (Madungwe et al., 2016).

c. Production des ERO au niveau du complexe III

Le complexe III possède deux sites connus de production des ERO, l'un libérant l' $O_2^{\cdot-}$ dans l'espace intermembranaire et l'autre dans la matrice (figure 3) (Murphy, 2009). Le complexe III fonctionne en transférant des électrons de l'ubiquinol au ferricytochrome c en utilisant les hèmes b_L et b_H et la protéine fer-soufre de Rieske (Chen et Zweier, 2014). La contribution du complexe III à la production des ERO dans des conditions physiologiques reste incertaine, certains chercheurs suggèrent qu'elle est minime, tandis que d'autres la considèrent plus importante que l'implication du complexe I (Addabbo et al., 2009). Cependant, il existe un consensus sur le fait que le complexe III est un site majeur de production d'ERO après une I-R (Madungwe et al., 2016).

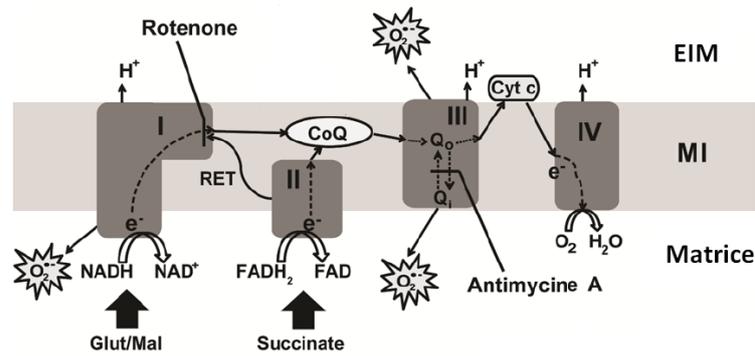


Figure 3: Illustration de la production de l'anion superoxyde au niveau des complexes de la CRM (Madungwe et al., 2016).

Glut/Mal : Glutamate/malate substrat du complexe I ; *Succinate* : Substrat du complexe II ; *Roténone* : inhibiteur du complexe I. *Antimycine A* : inhibiteur du complexe III. *RET* : transfert inverse d'électrons ; *Cyt c* : cytochrome c ; *CoQ* : ubiquinone ; *EIM* : espace intermembranaire ; *MI* : membrane interne.

I.1.2.3. Homéostasie du calcium

Les mitochondries jouent également un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du calcium grâce à sa capacité de capter et de libérer du Ca^{2+} . En plus de son implication dans la contraction des cardiomyocytes, le Ca^{2+} régule de nombreuses réactions métaboliques en activant les déshydrogénases du cycle de Krebs, stimulant ainsi le fonctionnement de la CRM et la synthèse d'ATP par un effet direct sur la ATP synthase (Argaud et al., 2006; Gustafsson et Gottlieb, 2007).

L'homéostasie calcique intramitochondriale est maintenue grâce à un système de transport qui dépend du gradient électrochimique. Le calcium entre dans la mitochondrie par l'uniport de calcium. La sortie du Ca^{2+} de la mitochondrie est assurée grâce aux échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (figure 4) (Bernardi, 1999).

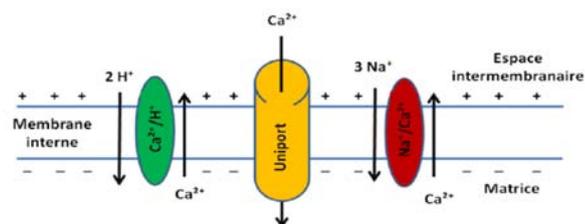


Figure 4: Transport du calcium à travers la membrane interne mitochondriale (Baidi, 2011).

I.1.2.4. Transition de perméabilité mitochondriale

Dans des conditions normales, la membrane mitochondriale interne est imperméable à la quasi-totalité des ions et des métabolites pour lesquels des mécanismes de transport spécifiques sont présents. Cette régulation stricte est nécessaire pour que les mitochondries maintiennent un gradient de pH et un potentiel de membrane nécessaires pour une phosphorylation oxydative efficace. Cependant dans certaines conditions de stress, cette imperméabilité est rompue par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm).

Le PTPm est défini comme un canal voltage-dépendent traversant les deux membranes mitochondriales et permettant le passage de molécules de PM 1,5 kDa (Dilisa et Bernardi, 2006). Structurellement, le PTPm est un assemblage multiprotéique connu sous deux configurations, fermée et ouverte, faisant largement communiquer la matrice avec le cytosol et impliquant des protéines telles que l'ANT (transporteur des nucléotides adényliques), la porine VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*), la créatine kinase (CK), l'héxokinase (HK), le récepteur des benzodiazépines, ainsi que des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 (Bax) (figure 5) (Bernardi et Di Lisa, 2015).

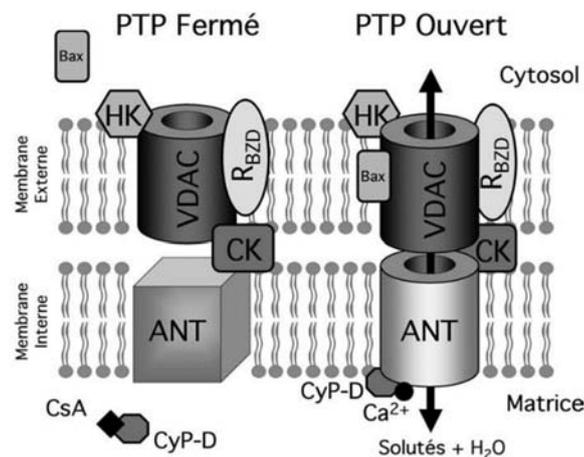


Figure 5: Modèle structural du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Argaud et al., 2006).

PTP : pore de transition de perméabilité ; *CyP-D* : cyclophyline D ; *ANT* : transporteur des nucléotides adényliques ; *VDAC* : canal ionique voltage dépendant ; *CK* : créatine kinase ; *HK* : héxokinase ; *RBZD* : récepteur aux benzodiazépines ; *Bax* : protéines cytosoliques de la famille Bcl-2 capables de se transloquer dans la membrane mitochondriale afin de perméabiliser la membrane interne.

L'ouverture du PTPm est principalement induite par le calcium. En outre, l'alcalose, l'accumulation du phosphate inorganique, les ERO semblent avoir un lien avec son ouverture. En revanche, le pore est inhibé par le magnésium et un pH acide inférieur à 7. L'ouverture du PTPm est à l'origine à la fois du processus d'apoptose mais aussi de nécrose (Weiss et al., 2003).

Il est intéressant de noter que la transition de perméabilité est inhibée pharmacologiquement par la cyclosporine A (CsA), via sa fixation sur la cyclophylène D de la matrice mitochondriale (Clarke et al., 2008).

I.1.2.5. Canaux potassiques

Dans des conditions normales, la membrane interne mitochondriale est presque imperméable aux cation K^+ . Par conséquent, lorsque les canaux potassiques mitochondriaux ATP-dépendants (mito- K_{ATP}) sont fermés, l'entrée des ions K^+ est négligeable et facilement tamponnée par un antiport K^+/H^+ qui pompe le K^+ hors la matrice. L'influence d'une telle fuite de K^+ sur le potentiel de la membrane mitochondriale est négligeable, mais cela régule le volume de la matrice. En revanche, dans des conditions de stress ou d'ischémie, l'ouverture des mito- K_{ATP} provoque un afflux important de K^+ ayant des effets sur le volume de la matrice, le gradient électrochimique, l'efficacité de la phosphorylation oxydative et le potentiel membranaire mitochondrial, la surcharge calcique et l'ouverture subséquente de la PTPm (Testai et al., 2015).

I.1.2.6. Régulation de la l'apoptose

La mitochondrie occupe aussi une place centrale dans le processus de mort cellulaire par apoptose. Une étape critique de ce processus est la libération de protéines proapoptotiques telles le facteur induisant l'apoptose (*AIF*) et le cytochrome c depuis l'espace intermembranaire vers le cytosol (Marchetti, 2005). Cette fuite déclenche la partie effectrice de la cascade apoptotique. Plusieurs mécanismes, parmi lesquels la perméabilisation de la membrane externe par les membres proapoptotiques de la famille Bcl-2 ou l'ouverture du PTPm, sont étroitement liés au déclenchement du processus apoptotique (Szewczyk, 2002 ; McFalls et al., 2003).

I.2. Stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène sont des molécules de signalisation cellulaire (Becker, 2004), elles jouent un rôle vital dans des processus tels que la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire, la modulation des processus inflammatoires (Trachtenberg et Hare, 2009). L'existence d'un système antioxydant endogène permet de contrôler leur taux dans la cellule et d'assurer un équilibre du statu redox de la cellule. Le stress oxydant est une condition dans laquelle l'homéostasie redox est perdue et où la génération des ERO dépasse la capacité des antioxydants cellulaires, provoquant une chaîne de réactions qui finit par induire un dysfonctionnement cellulaire et même la mort de la cellule (Zucchi et al., 2007).

Le stress oxydant est impliqué dans la pathogenèse ou la progression de nombreuses maladies, y compris les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, le diabète, le cancer et le processus de vieillissement en général (Armstrong et Whiteman, 2007). L'I-R est l'une des maladies cardiovasculaires où le stress oxydant est le centre de ses mécanismes physiopathologiques (Trachtenberg et Hare, 2009).

I.2.1. Espèces réactives de l'oxygène

I.2.1.1. Formes des ERO

ERO est l'appellation d'un ensemble de prooxydants dérivés de l'oxygène composés de deux groupes. Le premier contient les radicaux libres dérivés de l'oxygène ayant au moins un électron non apparié dans l'orbital externe et sont capables d'exister de façon indépendante. La présence d'un électron non apparié entraîne une réactivité élevée de ces espèces par leur affinité de donner ou d'obtenir un autre électron pour atteindre leur stabilité. Ce groupe est composé de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyl ($\cdot OH$), les radicaux peroxy (ROO^{\cdot}) et alkoxy (RO^{\cdot}), le radical oxyde nitrique (NO^{\cdot}), le peroxy-nitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Figure 6) (Kohen et Nyska, 2002).

L'appellation ERO concerne également des composés non-radicalaires précurseurs de radicaux libres et qui sont extrêmement instables. Il s'agit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), d'acide hypochloreux ($HClO$), de peroxydes organiques et d'aldéhydes (figure 6) (Trachtenberg et Hare, 2009).

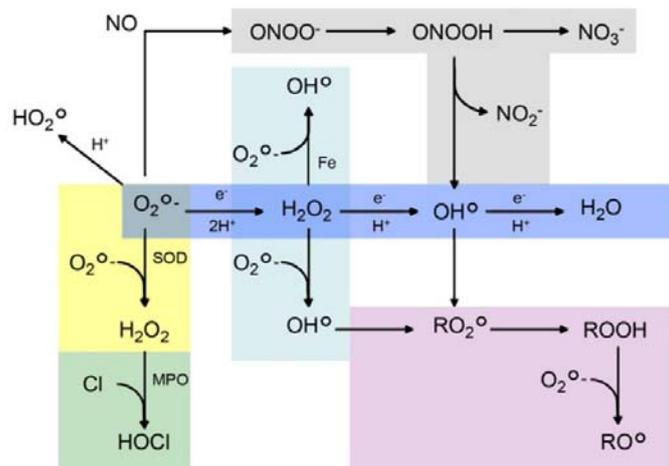


Figure 6: Formation en cascade des différents ERO à partir du radical superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I.2.1.2. Sources des ERO

La principale source de production des ERO est mitochondriale. Dans des conditions physiologiques normales, environ 2 % des électrons transportés par la CRM s'échappent et passent directement à l'oxygène, produisant l' $O_2^{\bullet-}$ (Gustafsson et Gottlieb, 2007). Les mitochondries cardiaques ont été reconnues comme une source importante des ERO dans le myocarde du fait du grand nombre de mitochondries en réponse à la demande énergétique élevée des cardiomyocytes (Zhou et al., 2015).

Par ailleurs, il existe d'autres sources cellulaires importantes des ERO, notamment enzymatiques, telles que le cytochrome P450 dans le réticulum endoplasmique, les lipooxygénases, les cyclooxygénases (COX), la xanthine oxydase (XO), la NO synthase (NOS) et la NADPH oxydase (figure7) (Armstrong et Whiteman, 2007). En plus, certaines réactions cellulaires à médiation métallique (fer et cuivre) peuvent générer des radicaux libres. En effet, la réaction de Haber-Weiss produit le radical hydroxyl hautement toxique en réduisant des ions ferriques par l' $O_2^{\bullet-}$ (figure 6) (Kohen et Nyska, 2002).

I.2.1.3. Cibles des ERO

En raison de leur forte réactivité, les ERO peuvent initier des réactions d'oxydation qui provoquent des modifications chimiques irréversibles dans les lipides, les protéines et les

acides nucléiques (figure 7). Les cibles préférentielles des ERO sont représentées par les phospholipides membranaires, en raison de la haute densité électronique des chaînes d'acides gras insaturés, et par les groupes sulfhydryle des protéines (Zucchi et al., 2007).

Dans le cœur, les substrats énergétiques préférés, en plus du glucose, sont les acides gras contribuant à environ 70% de l'ATP nécessaire au bon fonctionnement cardiaque (Park et al., 2007 ; Goldberg et al., 2012). En plus, la cardiolipine est un phospholipide unique aux mitochondries et riche en acide linoléique polyinsaturé. Ces facteurs font des lipides de la mitochondrie et de l'ensemble de la cellule cardiaque une cible de choix pour l'attaque oxydative par les ERO en condition pathologique comme dans l'I-R (Becker, 2004; Lesnefsky et Hoppel, 2008).

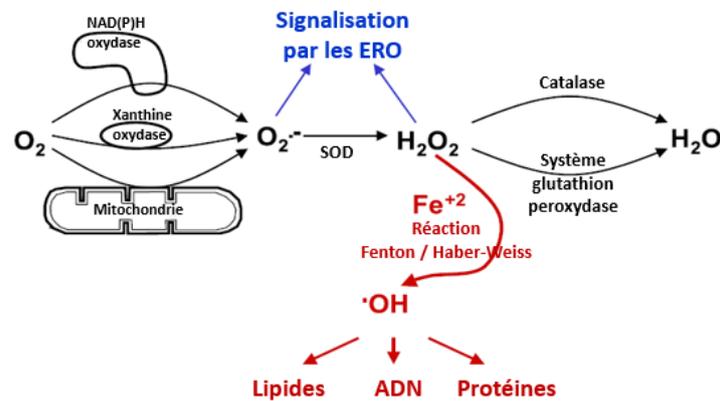


Figure 7: Illustration du métabolisme des ERO lors de l'I-R (sources, formes, cibles et inhibition) (Becker, 2004).

I.2.2. Système antioxydant

La cellule dispose d'un système de défense antioxydant étendu, enzymatique et non enzymatique, pour inhiber directement ou indirectement la production des ERO, de limiter leur propagation et de prévenir leur toxicité (Strobel et al., 2011).

Dans la mitochondrie, l' $O_2^{\cdot-}$ et le H_2O_2 générés au cours du métabolisme aérobie normal sont maintenus à un niveau non toxique grâce à l'action coopérative de la Mn-superoxyde dismutase (Mn-SOD qui réduit l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2) et le système glutathion/glutathion peroxydase (GSH/GPx qui réduit le H_2O_2 en H_2O). Au niveau du cytosol l' $O_2^{\cdot-}$ est réduit par

la Cu/Zn-SOD, le H₂O₂ ainsi produit est désactivé par la catalase (CAT) et la GPx (figure 7) (Becker, 2004).

Ces enzymes antioxydantes, considérée comme première ligne de défense contre les ERO, agissent en parallèle avec des antioxydants non enzymatiques ; hydrosolubles comme le GSH et la vitamine C ; et liposolubles tels la vitamine E (Armstrong et Whiteman, 2007; Douglas et Sawyer, 2011; Rodrigo et al., 2013).

I.2.3. Evaluation du stress oxydant

De nombreuses approches permettent d'évaluer et de démontrer la participation des ERO à des événements biochimiques dans des états physiologique et physiopathologique. Leur classification générale est basée sur les trois axes suivants :

I.2.3.1. Détection des radicaux libres

La seule technique de détection directe des radicaux est la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique, qui permet la détection de radicaux relativement stables (Kohen et Nyska, 2002 ; Douglas et Sawyer, 2011). Le stress oxydant dans l'insuffisance cardiaque expérimentale et humaine peut être démontré en mesurant la formation des radicaux O₂^{•-} ou [•]OH utilisant cette méthode spectroscopique (Sam et al., 2005 ; Tsutsui, 2006).

I.2.3.2. Quantification des marqueurs des dommages oxydatifs

Cette méthode consiste à quantifier les produits finaux issus de l'interaction oxydative des ERO avec des macromolécules biologiques (lipides, protéines et ADN).

Comme marqueur de l'oxydation de l'ADN, la 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine (8-OHdG) peut être quantifiée, par le test ELISA ou par chromatographie (HPLC et GC-MS), dans différents échantillons, notamment le sang, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, la salive, les leucocytes et les tissus (Kroese et Scheffer, 2014). La 8-OHdG est un marqueur important de stress oxydant dans les maladies cardiovasculaires et notamment l'I-R myocardique (Cuevas-Durán et al., 2017).

Pour évaluer le niveau de la peroxydation lipidique, qui est très révélateur du niveau du stress oxydant dans l'I-R, plusieurs approches sont disponibles. La mesure du contenu

lipidique avant et après l'exposition peut être effectuée pour indiquer la perte de chaînes d'acides gras polyinsaturés (de Groot et al., 1993 ; Zhang et al., 2006 ; Simão et al., 2013). Une autre approche d'évaluation est la formation des diènes conjugués, surveillée par spectroscopie, qui indique la progression du processus de la peroxydation lipidique (Zhang et al., 2009). Dans la dernière étape de ce processus, les peroxydes sont décomposés en aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA), qui peut être détecté par l'acide thiobarbiturique donnant une coloration rose facilement mesurable par spectrophotométrie (Zhang et al., 2006 ; Bayraktar et al., 2019).

L'évaluation des dommages oxydatifs causés aux protéines peut être réalisée à l'aide du dosage des carbonyles (Venardos et al., 2004). Ces derniers sont produits par l'attaque des ERO sur les résidus d'acides aminés dans les protéines.

I.2.3.3. Evaluation du statut antioxydant

Il existe de nombreuses méthodes pour évaluer l'activité des deux composants du système antioxydant. L'évaluation directe de l'activité enzymatique utilise généralement des techniques spectroscopiques (Kurian et al., 2010; Sahin et al., 2011). Cependant, les enzymes sont soumises à une régulation par induction ou inhibition et le dosage peut détecter une augmentation, plutôt qu'une diminution de leur activité ou *vis versa* (Kohen et Nyska, 2002). L'évaluation des antioxydants non enzymatiques se fait par la détermination du rapport entre leurs formes oxydées et leurs formes réduites (par exemple, ascorbate/acide déshydroascorbique ou GSH/GSSG) (Jiang et al., 2014).

L'une des approches la plus couramment utilisée même dans l'évaluation des lésions d'ischémie cardiaque, est la mesure de l'activité antioxydante totale (TAA) au niveau cellulaire (Kohen et Nyska, 2002). Le dosage de la TAA présente de nombreux avantages car il assure une image fiable de la situation physiologique et est considéré comme un outil utile pour détecter les phénomènes de stress oxydant dans les tissus et les fluides organiques. Il peut servir d'outil approprié pour l'évaluation d'un traitement antioxydant (Florian et al., 2006).

Ischémie-Reperfusion cardiaque

II. Ischémie-reperfusion cardiaque

II.1. Définition de l'ischémie-reperfusion cardiaque

L'ischémie cardiaque correspond à un déséquilibre entre l'apport d'oxygène et de nutriment, et les besoins myocardiques. Elle apparaît lorsque le débit sanguin coronaire est réduit ou arrêté suite à une occlusion partielle ou totale de l'artère coronaire causée par un thrombus. Au premiers moments de l'ischémie, des lésions ultrastructurales du myocarde se produisent rapidement et sont considérées comme réversibles. Cependant, si l'ischémie persiste, ces lésions deviennent irréversibles et aboutissent à la nécrose du tissu cardiaque, autrement dite, infarctus du myocarde (IDM) (Cour et Argaud, 2010 ; Benhabbouche et al., 2011).

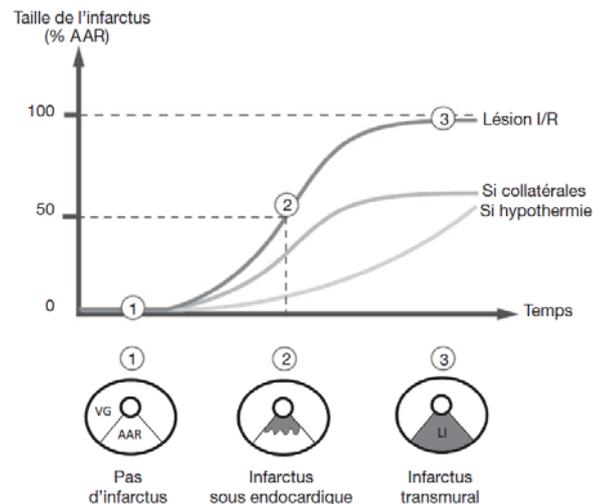


Figure 8: Installation de l'infarctus du myocarde et facteurs influençant son évolution (Benhabbouche et al., 2011).

L'extension de l'infarctus au sein de l'aire à risque (AAR) suit une onde de progression sigmoïde qui débute par une atteinte sous-endocardique du ventricule gauche (VG) et s'étend en lésion ischémique (LI) transmurale (de 1 à 3).

Les facteurs qui influent l'apparition et l'étendue de l'infarctus comprennent : la taille de l'aire à risque (AAR) qui dépend de l'artère coronaire occluse ; de l'étendue du flux sanguin collatéral ou du flux résiduel dans l'artère liée à l'infarctus ; de la durée de l'ischémie dont le prolongement est responsable d'une augmentation de la taille de l'infarctus au sein de l'AAR ; et de la température dont la diminution rapide ou modérée

permet une cardioprotection importante du myocarde (figure 8) (Rodrigo et al., 2013 ; Buja et Vander Heide, 2016).

La reperfusion est la stratégie unique qui a pour objectif la récupération du tissu viable dans l'AAR ischémique, limitant ainsi l'étendue de la nécrose (Rodrigo et al., 2013). Elle assure la restauration du flux sanguin oxygéné ainsi que les nutriments vers le tissu ischémique par des moyens chirurgicaux tels que l'angioplastie qui permet d'élargir physiquement la lumière de l'artère ; la thrombolyse qui dissout le thrombus sanguin à l'origine de l'ischémie (Brophy et Bogaty, 2004); et le pontage aortique coronarien qui consiste à greffer une artère saine sur l'aorte pour contourner l'obstruction de l'artère coronaire (Grothusen et al., 2017). Cette situation clinique est rencontrée également dans le cas de greffe cardiaque (White et al., 2018).

En revanche, la reperfusion, considérée comme la seule issue de survie du myocarde ischémique devient, paradoxalement, une source supplémentaire de dommages cellulaires dits 'lésions de reperfusion ou *reperfusion injury*' et dont la gravité dépend de la durée et des changements métaboliques produits au cours de l'ischémie. Ce paradoxe de reperfusion ou '*reflow paradox*' est caractérisé par une plus faible consommation normale de l'oxygène et une production excessive des ERO qui peuvent au bout de quelques heures aboutir à la mort cellulaire par nécrose et apoptose (Wilhelm et al., 2003 ; Logue et al., 2005 ; Perrelli et al., 2011).

II.2. Evènements cellulaires médiés par l'ischémie-reperfusion

II.2.1. Evènements cellulaires liés à l'ischémie

Vu que la mitochondrie est le siège de la chaîne respiratoire productrice d'énergie, elle représente la première cible des dommages structuraux et fonctionnels associés à l'ischémie. Ces derniers apparaissent précocement et progressent avec la durée de l'ischémie et se retentissent sur l'ensemble de la cellule (Figure 9).

II.2.1.1. Effets sur la CRM

Dès les premières 10 minutes d'ischémie, des perturbations au niveau des complexes de la CRM s'installent. L'activité du complexe I diminue ainsi que la respiration mitochondriale à l'état 3 (Paradies et al., 2004 ; Sadek et al., 2004 ; Q. Chen et al., 2007).

Cette perturbation peut être liée à la diminution de la composante NADH déshydrogénase de ce complexe qui pourrait être due à la perte du coenzyme flavine mononucléotide (FMN) (Lesnefsky et al., 2001a ; Lesnefsky et al., 2017). En plus, le contenu membranaire en cardiolipine, nécessaire au transfert des électrons au sein des complexes I, III et IV, est diminuée au cours de l'ischémie (Paradies et al., 1999 ; Lesnefsky et al., 2001b) à cause de l'attaque oxydative de ses acides gras insaturés par les ERO produits dans cette même phase. Par conséquent la diminution de la cardiolipine peut également affecter négativement l'activité du complexe I (Paradies et al., 2004).

En fonction du temps de la phase ischémique, les dommages progressent pour affecter le complexe III et le complexe IV (Q. Chen et al., 2007). En effet, au niveau du complexe III, l'ischémie altère la conformation de la protéine de Rieske perturbant ainsi l'intégrité du centre Fer-Soufre sans modification de la séquence peptidique de cette sous-unité (Lesnefsky et al., 2001a). L'effet de la diminution de la cardiolipine semble jouer là aussi un rôle important dans l'atteinte du complexe III (Petrosillo et al., 2003).

En plus, le complexe IV requiert un environnement riche en cardiolipine pour que son activité soit optimale. Par conséquent, l'ischémie entraîne une diminution de l'activité du complexe IV (Lesnefsky et al., 1997 ; Lesnefsky et al., 2001a). Quant au complexe V (ATP synthase), son activité passe de la synthèse à l'hydrolyse de l'ATP pendant l'ischémie (Lesnefsky et al., 2017). Par conséquent, le contenu en ATP diminue ainsi que l'activité du muscle cardiaque.

Concernant le complexe II, il est relativement résistant aux dommages ischémiques (Lesnefsky et al., 1997). Son activité peut diminuer dans les mitochondries au cours d'une ischémie globale prolongée ensuite après la reperfusion (Pasdois et al., 2006 ; Lesnefsky et al., 2017).

Il est important de noter que la cardiolipine fournit des sites de liaison du cytochrome c sur la membrane interne (Ott et al., 2002). Par conséquent, une diminution de son contenu lors de l'ischémie favorise la perte du cytochrome c (Lesnefsky et al., 2017).

Ainsi, pendant l'ischémie la chaîne respiratoire est ralentie, et la production d'ATP diminue ce qui perturbe le fonctionnement mitochondrial.

II.2.1.2. Production des ERO au cours de l'ischémie

Bien que, dans des conditions d'ischémie, les cardiomyocytes disposent d'une faible quantité résiduelle d'oxygène, elles peuvent générer des ERO, contrairement à la notion selon laquelle les ERO sont produites principalement après la réintroduction de l'oxygène en période de reperfusion (Paradies et al., 1999 ; Becker, 2004 ; Chen et Lesnefsky, 2006; Q. Chen et al., 2007).

Bien qu'une réduction de 90 % de l'apport en O₂ rendrait le cœur ischémique, une quantité considérable de O₂ moléculaire serait toujours présente. Lors de l'ischémie, le flux d'électrons à travers la CRM est fortement ralenti ce qui accroît l'état de réduction des transporteurs d'électrons, flavines et quinones, favorisant le transfert direct des électrons à l'O₂ résiduel et formant ainsi l'O₂^{•-} (Robin, 2005). L'ubisemiquinone mitochondriale est la principale source de génération des ERO au cours de l'ischémie (Becker, 2004).

Les ERO, générées en ischémie, sont capables de diminuer le rapport GSH/GSSG et d'affaiblir les antioxydants des cardiomyocytes, notamment la Mn-SOD, ce qui est une cause majeure de lésions de reperfusion (Lesnefsky et al., 2001a). Ces ERO semblent jouer un rôle de signalisation important. Elles participent à la régulation de la mort cellulaire pendant la reperfusion (Carmody et Cotter, 2001). De plus, ils sont nécessaires à l'induction de l'ouverture du PTPm qui aura lieu à la reperfusion (Assaly et al., 2012).

II.2.1.3. Effets sur le métabolisme mitochondrial, les échanges d'ions et l'homéostasie calcique

La situation d'hypoxie consécutive au manque d'alimentation de la cellule en oxygène empêche la phosphorylation oxydative induisant, par conséquent, une réduction rapide de la concentration en ATP disponible dans la cellule, une augmentation transitoire de l'ADP et une accumulation massive du phosphate (Figure 9). L'impossibilité de la synthèse de l'ATP mitochondrial est temporairement compensée par la glycolyse anaérobie qui produit du lactate et provoque une diminution du pH cytosolique. Ainsi, l'épuisement du glycogène et l'accumulation du lactate augmentent en fonction de la gravité de l'ischémie (Wilhelm et al., 2003).

Lorsque les conditions hypoxiques persistent, la nette diminution des concentrations en ATP inhibe la Na⁺/K⁺ ATPase, entraînant une augmentation progressive de la concentration

cytosolique en Na^+ et une augmentation concomitante du K^+ extracellulaire. Le Na^+ , à son tour, active les échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et Na^+/H^+ induisant une accumulation cytosolique de calcium et de protons (Figure 9). En plus, l'augmentation de Na^+ intracellulaire entraîne une dépolarisation de la membrane cellulaire avec ouverture transitoire du canal Ca^{2+} Voltage-dépendant, augmentant ainsi le flux de Ca^{2+} (Mochizuki et Jiang, 1998 ; Park et al., 1999).

Afin d'empêcher l'activation des phospholipases, les protéases et les nucléases par la concentration élevée de Ca^{2+} cytosolique, les mitochondries sont capables de tamponner le Ca^{2+} cytosolique en stockant l'excès, mais ce processus est limité car les mitochondries qui deviennent de plus en plus en manque d'énergie, inhibant ainsi l'uniport calcique, la principale voie d'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie (Bagchi et al., 1997). Cependant, lors d'une ischémie prolongée, l'entrée de Ca^{2+} peut se produire par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ fonctionnant en mode inverse dans le cœur (Morin et al., 2001).

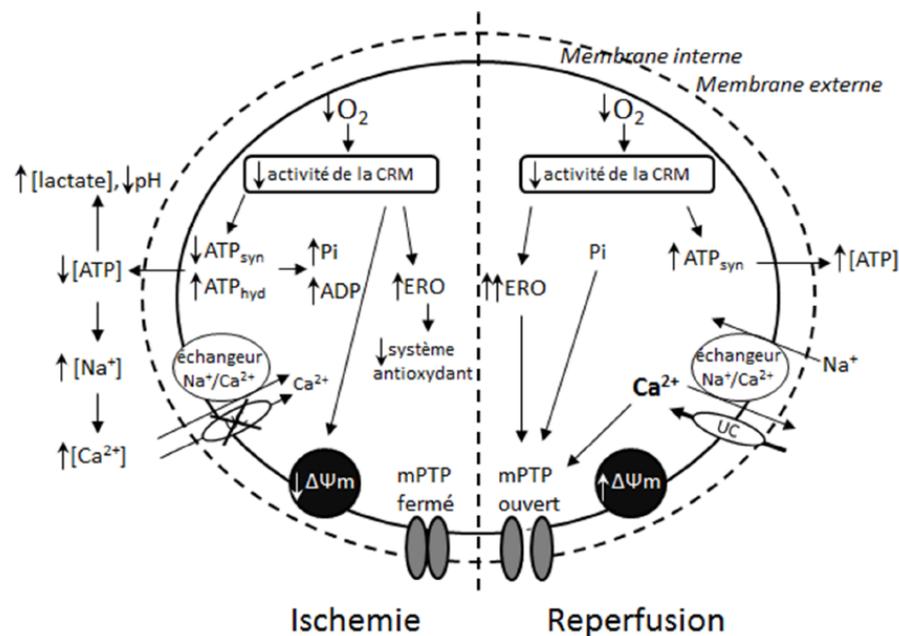


Figure 9: Illustration des événements mitochondriaux déclenchés par l'I-R myocardique (Morin et al., 2009).

CRM : chaîne respiratoire mitochondriale ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; ATP syn : synthèse d'ATP ; ATP hyd : hydrolyse d'ATP ; Pi, phosphate inorganique ; PTPm : pore de transition de perméabilité mitochondriale ; UC : uniport calcique mitochondrial ; $\Delta\Psi_m$: potentiel de membrane mitochondrial.

Temporairement, le maintien d'une faible concentration en Ca^{2+} mitochondriale associée à l'acidose cytosolique (chute du pH cytosolique de 7,2 à 6,5) et à une concentration

élevée en ADP empêche l'ouverture du pore de transition mitochondrial et protège ainsi le potentiel et l'imperméabilité de la membrane mitochondriale (Logue et al., 2005 ; Gustafsson et Gottlieb, 2007).

II.2.2. Evènements cellulaires liés à la reperfusion

II.2.2.1. Effets sur la CRM

La réintroduction brutale de l'oxygène dans les cellules ischémiques entraîne d'autres changements qui influencent le fonctionnement de la CRM. Les complexes I et II sont affectés davantage lors de la reperfusion notamment après une ischémie sévère (Lesnefsky et al., 2001a). Le contenu en cardiolipine ne se détériore pas davantage en phase de reperfusion, par conséquent l'activité du complexe IV reste inchangée. Il est de même pour la synthèse de l'ATP qui ne s'améliore pas. Quant au rapport ADP/O, il diminue (Lesnefsky et al., 2004).

II.2.2.2. Production des ERO au cours de la reperfusion

Face à une CRM endommagée par l'ischémie, la réintroduction de l'oxygène produit excessivement des ERO. Cette explosion d'ERO dans les cardiomyocytes dite aussi '*reperfusion burst*' a été démontrée à l'aide d'une sonde fluorescente sensible aux oxydants (Zweier et al., 1987 ; Vanden Hoek et al., 1997). Elle apparaît dès les 5 premières minutes de reperfusion, ce qui suggère la rapidité avec laquelle les événements de reperfusion peuvent progresser (Becker, 2004).

Au niveau de la CRM, la plus grande majorité de l' $O_2^{\cdot-}$ provient des complexes I et III (Madungwe et al., 2016; Murphy, 2016). La plupart des transporteurs d'électrons sont hautement réduits après l'ischémie ce qui facilite également la génération d' $O_2^{\cdot-}$ au cours de la reperfusion (Lesnefsky et al., 2017). Par ailleurs, le complexe II est également impliqué dans la production des ERO au cours de la reperfusion, ceci est due à l'accumulation du succinate au cours de l'ischémie (Korge et al., 2017). En effet, quand les mitochondries, dépolarisées au cours de l'ischémie, sont réoxygénées, le rétablissement du $\Delta\psi$ membranaire permet de générer des ERO par le RET au niveau du complexe I en utilisant du succinate en tant que donneur d'électrons au niveau du complexe II. Les ERO générées par RET peuvent alors déclencher des ouvertures du PTPm favorisant une lésion cardiaque. Cependant, une fois que les mitochondries sont dépolarisées par l'ouverture du PTPm, la production des

ERO via le RET induit par le succinate cesse, ce qui suggère que la production des ERO est auto-limitée par réaction négative (Chouchani et al., 2014). Les autres systèmes producteurs d'ERO (NADPH oxydase, xanthine oxydase, NOS) participent également à cette production massive d'ERO à la reperfusion (Armstrong et Whiteman, 2007; Zhou et al., 2015).

D'une autre part, le système antioxydant mitochondrial, affaibli par l'ischémie, ne peut pas contrôler la surproduction de l' $O_2^{\cdot-}$. Ce dernier peut alors réagir avec le NO pour produire du $\cdot ONOO$, une molécule très réactive pouvant aboutir à la nitration des protéines (Borutaite et al., 2013). L' $O_2^{\cdot-}$ peut également réagir avec le H_2O_2 pour produire le $\cdot OH$. Les réactions de Fenton et Haber-weiss peuvent également augmenter la production du $\cdot OH$ qui est considérée comme l'espèce prédominante dans les lésions cellulaires précoces de la reperfusion (Becker, 2004 ; Zweier et Talukder, 2006).

Les ERO surproduites agissent directement au niveau des complexes I et III, de l'ATP synthase ou de l'ANT de la CRM, ce qui accentue la réduction de l'activité de la CRM et la diminution de la synthèse d'ATP (Lesnefsky et al., 2001a). Ces ERO attaquent également les lipides membranaires ce qui augmente la perméabilité de la membrane interne aboutissant également à une diminution de la synthèse de l'ATP. Au final, le stress oxydant lié à la reperfusion aggrave l'altération de la fonction mitochondriale et mènent à la mort cardiomyocytaire par nécrose et apoptose.

II.2.2.3. Aggravation de la surcharge calcique

La surcharge calcique initiée lors de l'ischémie se réitère de façon beaucoup plus importante au début de la reperfusion. En effet, en phase de reperfusion, les transporteurs calciques reprennent leur sens de fonctionnement classique. La restauration du potentiel membranaire mitochondrial, suite à la restauration de l'activité de la CRM, permet la réactivation de l'uniport calcique. Ceci aboutit à une aggravation de la surcharge calcique au niveau mitochondrial et à une augmentation de la perméabilité membranaire (Logue et al., 2005; Morin et al., 2009).

II.2.2.4. Perméabilisation des membranes mitochondriales

En plus d'être un facteur clé dans l'ouverture du PTPm, la surcharge mitochondriale calcique induit également une production des ERO (Sadek et al., 2004). Ces derniers,

augmentent à leur tour la susceptibilité du PTPm à s'ouvrir. Il est généralement admis que l'ouverture du PTPm est associée à une reperfusion post-ischémique (Griffiths et Halestrap, 1995), mais certaines études suggèrent que l'ouverture du PTPm pourrait également se produire pendant l'ischémie (Borutaite, 2003).

L'ouverture du PTPm représente pour la cellule un point de non-retour vers la mort, qu'elle soit de nature nécrotique ou apoptotique. Cette ouverture provoque la perte de l'imperméabilité originelle de la membrane mitochondriale interne. Il en résulte un gonflement de la matrice ; un effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale et un relargage de produits matriciels et intermembranaires mitochondriaux et finalement une inhibition totale des fonctions mitochondriales (Benhabbouche et al., 2011; Morin et al., 2009).

Il convient de noter que le PTPm n'est pas le seul mécanisme par lequel les membranes mitochondriales peuvent être perméabilisées. En effet, la perméabilisation sélective de la membrane externe peut avoir lieu en absence de dépolarisation de la membrane et sans perte d'intégrité de la membrane externe. Cette perméabilisation est provoquée par l'ouverture des pores appelés *mitochondrial apoptosis induced channel* (MAC) et la protéine pro-oncogène Bax serait l'un des composants essentiels de ces canaux (Kinnally et Antonsson, 2007). Lors de l'I-R, le Bax initialement cytosolique, est activée puis migre vers la mitochondrie où elle s'insère dans la membrane externe (Capano et Crompton, 2006). La formation de ces canaux augmente la perméabilité membranaire, favorise la libération de cytochrome c et donc participe à la transmission du signal apoptotique.

II.2.2.5. Ischémie-reperfusion et mort cellulaire

La perméabilisation des membranes mitochondriales est à l'origine d'une fuite dans le cytoplasme de molécules dont le cytochrome c et l'AIF. Ces agents pro-apoptotiques activent des caspases chargées d'exécuter la voie finale de l'apoptose.

La sévérité des lésions d'I-R détermine le type de mort cellulaire, apoptose ou nécrose, au niveau du tissu cardiaque (Holleyman et Larson, 2001).

Si ces lésions sont graves, elles entraînent une ouverture généralisée du PTPm dans les mitochondries, associée à une rupture de la membrane externe et libération du cytochrome c. Bien que ce dernier peut initier la cascade apoptotique, la mort sera en réalité nécrotique,

car cette ouverture généralisée ainsi que la dépolarisation mitochondriale provoquent une déplétion de l'ATP, ce qui n'est pas compatible avec les exigences du processus apoptotique en ATP. Néanmoins, quand les dommages ischémiques ne sont pas trop grave, peu de mitochondries subissent l'ouverture du PTPm et les concentrations cellulaires en ATP peuvent être maintenues. Dans ces conditions, la libération du cytochrome c entraînera l'activation de la cascade des caspases et l'induction de l'apoptose (Suleiman et al., 2001 ; Murphy et Steenbergen, 2011).

Ceci peut fournir l'explication de la coexistence de la mort cellulaire apoptotique et nécrotique dans le même tissu. En effet, dans un IDM, le centre de l'infarctus présente une mort cellulaire nécrotique, là où l'atteinte est grave, tandis que la zone périphérique présente une apoptose (Fliss et Gattinger, 1996).

II.3. Stratégies de lutte contre l'ischémie-reperfusion myocardique

II.3.1. Pré- et Post-conditionnement ischémique

Le préconditionnement ischémique (PCI) correspond à des séquences brèves d'I-R réalisées avant une occlusion coronaire prolongée (infarctoïde) suivie d'une reperfusion. Il a été considéré depuis des années comme le phénomène le plus puissant pour limiter la taille de l'IDM (Murry et al., 1986) et dont les effets bénéfiques ont été largement reproduits dans tous les types cellulaires et/ou organes soumis à une I-R. Le PCI résultait, pendant l'ischémie prolongée, en une réduction de la dégradation de l'ATP associée à une limitation de l'accumulation de métabolites glycolytiques comme le lactate (Kida et al., 1991). Toutefois, l'application clinique de ce concept expérimental reste limitée car les patients ayant souffert d'un IDM sont pris en charge après l'installation de l'occlusion coronaire (Cour et Argaud, 2010).

Par ailleurs, un nouveau concept de protection anti-ischémique, cliniquement plus adapté (Staat et al., 2005), a vu le jour par Zhao et ses collaborateurs, il s'agit du post conditionnement ischémique (PostCI). Expérimenté chez le chien ayant subi un IDM, le PostCI, correspondant à de brefs épisodes d'I-R, réalisé juste après une occlusion coronaire prolongée réduit la taille de l'infarctus d'une manière comparable au PCI (Zhao et al., 2003). Les connaissances actuelles suggèrent que le mécanisme d'action du postCI utilise les mêmes voies de signalisation que celles du PCI, à savoir la voie RISK (*reperfusion injury*

survival kinase) après activation de récepteurs membranaires couplés à des protéines Gi ou des récepteurs tyrosine kinase. Un des effecteurs finaux essentiels du postconditionnement semble être l'inhibition de l'ouverture du PTPm (Argaud et al., 2006; Benhabbouche et al., 2011).

II.3.2. Stratégies pharmacologiques de cardioprotection

Les mitochondries sont endommagées au cours de l'ischémie et la reperfusion. Grâce à plusieurs stratégies pharmacologiques, les mitochondries peuvent être protégées contre ces dommages, en détournant l'équilibre des dommages irréversibles vers la récupération des cellules.

II.3.2.1. Modulation du métabolisme mitochondrial

Le but de cette approche est la meilleure utilisation des substrats disponibles au cours du processus ischémique. Cette stratégie pharmacologique a été appliquée avec succès dans l'ischémie modérée ou légère du myocarde dans l'angine de poitrine mais elle est moins efficace face à une ischémie complète (Morin et al., 2001).

Dans des conditions ischémiques, les besoins énergétiques du cœur sont satisfaits principalement par l'oxydation des acides gras, et des voies anaérobies. Dans ces conditions, l'efficacité de la synthèse d'ATP est faible. En plus les intermédiaires essentiels du métabolisme des myocytes, en particulier du compartiment mitochondrial, s'épuisent. Des approches pharmacologiques ont été trouvées pour reconstituer ces intermédiaires et rediriger ainsi le métabolisme mitochondrial afin de favoriser l'oxydation du glucose au déterminant du catabolisme des acides gras. Des substrats tels que le glucose, le pyruvate et les acides aminés peuvent agir dans cette voie (Suleiman et al., 2001).

L'exemple d'approvisionnement de la mitochondrie en substrat est celui du glutamate. Cet acide aminé améliore le rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial ce qui augmente la disponibilité des équivalents réducteurs pour la synthèse de l'ATP. En plus, le glutamate peut participer à la détoxification des ERO lors de la reperfusion en maintenant l'apport de glutathion réduit pour éliminer les ERO (Williams et al., 2001).

II.3.2.2. Inhibition de la surcharge calcique

L'ischémie et plus particulièrement la reperfusion conduisent à une accumulation massive de calcium entraînant une production des ERO, aboutissant à une augmentation de la perméabilité de la membrane et à une altération des fonctions mitochondriales. Limiter cette surcharge calcique représente un objectif pertinent de la cardioprotection des lésions d'I-R. Vu que le potentiel de la membrane mitochondriale est un régulateur essentiel de la capacité des mitochondries à accumuler du calcium, les agents découplants et les activateurs des canaux potassium mitochondriaux ATP-dépendants (mito-K_{ATP}) semble avoir ce profil d'action cardioprotective (Morin et al., 2001; Suleiman et al., 2001).

a. Activateurs des canaux potassium mitochondriaux

Les canaux mito-K_{ATP} se trouvent au niveau de la mitochondrie ainsi qu'au niveau du sarcolemme. L'effet bénéfique de l'ouverture de ces canaux pourrait être la conséquence du flux de potassium entraînant une dissipation partielle du potentiel membranaire, ce qui empêcherait un excès d'accumulation de calcium (Suleiman et al., 2001; Testai et al., 2015).

Le diazoxide activateur des canaux mito-K_{ATP} est 2000 fois plus puissant pour ouvrir le canal potassique de la mitochondrie que pour ouvrir le canal sarcolemmique du potassium. Le diazoxide rétablit les taux d'ATP et de la créatine phosphate dans le myocarde et atténue la diminution de la consommation d'oxygène mitochondrial à la fin de l'ischémie et de la reperfusion (Iwai et al., 2000).

b. Agents découplants

Le découplage est le résultat d'une augmentation de la perméabilité des protons à travers la membrane mitochondriale. Un découplage prolongé affecte négativement le fonctionnement de la CRM. Cependant, un léger découplage pourrait constituer une stratégie de défense intéressante pour limiter les dommages mitochondriaux générés par les ERO. En effet, un potentiel électrochimique transmembranaire élevé, augmente la probabilité de formation des ERO (Korshunov et al., 1997). L'induction d'une fuite modérée de protons à travers la membrane interne par un agent découplant, permet d'augmenter la consommation d'oxygène et de réduire ainsi le potentiel électrochimique des protons et la production des ERO (Qun Chen et al., 2007). En outre, un léger découplage préventif limiterait également la surcharge calcique (Morin et al., 2001).

II.3.2.3. Inhibition de l'ouverture du PTPm

L'ouverture du PTPm est un événement clé dans la genèse de la mort cellulaire après une I-R. Des molécules capables d'inhiber le PTPm aideraient probablement la cellule à récupérer. La cyclosporine A (CsA) a fourni la première preuve que cette stratégie est pertinente. En effet, la CsA a été le premier médicament inhibant le PTPm (Nazareth, 1991; Griffiths et Halestrap, 1993), et à ce jour, il est le plus puissant. Cette CsA se lie, avec une affinité nanomolaire, à la cyclophiline D et empêche l'interaction de cette protéine avec l'ANT, inhibant ainsi l'ouverture des pores (Morin et al., 2009 ; Bernardi et Di Lisa, 2015)

II.3.2.4. Stratégie antioxydante

Le stress oxydant mitochondrial est également un composant majeur du processus physiopathologique de l'I-R. La protection des mitochondries contre ce stress oxydant représente un objectif majeur de cardioprotection. Cette stratégie est basée sur deux moyens principaux. Le premier consiste à empêcher la formation des ERO et le second consiste à éliminer les formes intermédiaires toxiques dérivés de l'oxygène (Morin et al., 2001 ; Sheu et al., 2006).

L'extrait hautement raffiné de Ginkgo biloba, riche en bilobalide, a prouvé ses effets protecteurs vis-à-vis des lésions de l'I-R. Cet effet peut être attribué aux propriétés de piégeage directe des radicaux par les flavonoïdes. En plus, cet extrait protège l'activité respiratoire des mitochondries et rétablit l'efficacité de la phosphorylation oxydative altérée par l'hypoxie-réoxygénation (Bernatoniene et al., 2011).

Une autre approche pour aider le système de défense antioxydant consiste à activer les enzymes responsables du piégeage des ERO ou à imiter leur effet. Ceci est obtenu par l'Ebselen (2-phenyl-1,2-benzisozelenazol-3(2H)-one). C'est un médicament sélénorganique non toxique aux propriétés protectrices anti-inflammatoire et anti-athéroscléreuse qui imite l'activité catalytique de la glutathion peroxydase sur les hydroperoxydes phospholipidiques (Schewe, 1995 ; Morin et al., 2003).

II.4. Modèles expérimentaux d'étude de l'ischémie-reperfusion cardiaque

Un large éventail de modèles expérimentaux d'I-R, allant de l'instrumentation avancée de grands animaux à l'imagerie des mitochondries dans les cardiomyocytes, est conçu pour

imiter la situation clinique. Développer ces modèles est très utile afin de comprendre les mécanismes pathologiques produits, pour développer des interventions de chirurgie, de revascularisation et d'ingénierie tissulaire ainsi que pour le dépistage de médicaments à grande échelle.

II.4.1. Modèles *in Vivo*

Afin d'être proche de la situation en médecine humaine et d'étudier l'influence des facteurs extra-cardiaques dans les cardiopathies ischémiques, le modèle de choix sera un modèle *in vivo*. La plupart de ces modèles d'ischémie myocardique ont été établis chez le chien, le porc, le lapin, le rat ou la souris. Ces modèles *in vivo* sont généralement divisés en modèles chroniques ou aigus. De plus, l'ischémie myocardique peut être étudiée à l'état conscient ou anesthésié (Ytrehus, 2006).

Dans la situation clinique, l'ischémie spontanée ou intentionnelle est régionale ou globale. De manière correspondante, les modèles expérimentaux visent à simuler une ischémie globale ou une ischémie régionale, cette dernière est réalisée par ligature de l'artère coronaire antérieure descendante gauche (*left anterior descending coronary artery LAD*) (figure 10) (Obame et al., 2008 ; Dare et al., 2015;). La localisation anatomique de la LAD est constante entre les individus chez la souris, ce qui fait de la souris un très bon modèle d'ischémie cardiaque régionale mais cela implique une miniaturisation des équipements et une aide optique pour identifier les structures organiques chez la souris (Chimenti et al., 2004).

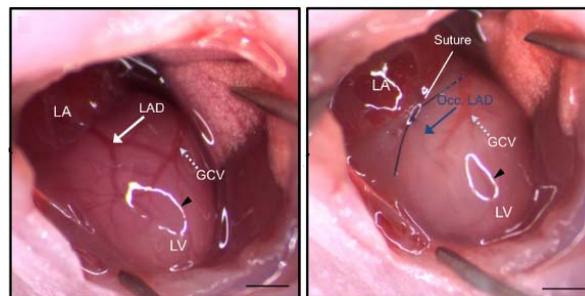


Figure 10: Ischémie régionale réalisée par ligature de la LAD (Blom et al., 2016).

II.4.2. Modèle *ex vivo*

Les cœurs perfusés isolés sont maintenant largement utilisés dans l'étude de l'ischémie myocardique. La simplicité de la technique et son coût relativement bas permettent

généralement de tester un plus grand nombre d'expériences et d'hypothèses par rapport aux modèles *in vivo* plus complexes.

Le cœur de rat isolé perfusé est généralement utilisé pour les analyses biochimiques du tissu cardiaque, diverses mesures fonctionnelles (paramètres hémodynamiques) et l'évaluation de la taille de l'infarctus (Devi et al., 2005 ; Qin et al., 2011 ; Testai et al., 2013).

II.4.3. Modèles *in vitro*

II.4.3.1. Préparations multicellulaires

Les préparations multicellulaires proviennent des muscles papillaires ou trabéculaires des oreillettes au niveau du cœur et perfusées avec un tampon. Les paramètres appropriés pour l'étude de l'ischémie dans ces préparations sont la force contractile et la libération d'enzymes (troponine T) pendant et après une ischémie simulée (Shanmuganathan et al., 2005; Ytrehus, 2006).

II.4.3.2. Cardiomyocytes

Dans ce modèle, les cellules néonatales ou embryonnaires isolées à partir de cœurs de rats et de souris peuvent être maintenues en suspension pendant des heures ou mises en culture pendant une courte durée. Dans ce modèle, l'ischémie est induite par manipulation du tampon d'incubation, par hypoxie ou anoxie. Les paramètres évaluant l'intégrité mitochondriale des cardiomyocytes ainsi que la production des ERO lors de la reperfusion sont testés en utilisant ce modèle *in vitro* (Bordoni et al., 2002; Liao et al., 2016).

II.4.4. Modèles *in silico*

Il existe une application limitée pour les modèles *in silico* dans la recherche cardiaque ischémique. La modélisation électrophysiologique concerne l'appréciation des conséquences suite aux modifications de l'équilibre ionique pendant l'ischémie. On peut citer la perte de potassium dans l'espace extracellulaire, l'accumulation de protons intracellulaire et l'ouverture des canaux potassiques dépendants de l'ATP, le découplage et la conduction électrique cellulaires et l'augmentation du sodium cellulaire (Keener, 2003 ; Nygren et al., 2006).

II.5. Evaluation des lésions induites par l'ischémie-reperfusion

Selon le modèle choisi pour induire l'ischémie cardiaque, une batterie de tests est disponible afin d'évaluer l'ampleur des dysfonctions cardiaques qu'elles soient à l'échelle, fonctionnelle, cellulaire ou sub-cellulaire.

II.5.1. Paramètres hémodynamiques

Les paramètres hémodynamiques indiquent la récupération fonctionnelle du cœur après l'épisode ischémique. Ces paramètres de performance cardiaque ont été déterminées en examinant les fonctions systolique et diastolique. Ils sont classés en indices éjectionnels (fréquence cardiaque, débit aortique, la pression systolique ventriculaire gauche, la pression de perfusion aortique et le dp/dt) et isovolumiques (la pression diastolique d'extrémité ventriculaire gauche (LVEDP), la pression développée ventriculaire gauche (LVDP)) (Lebeau et al., 2001 ; Cour et al., 2011). Ces paramètres sont souvent mesurés en continu dans le modèle *ex vivo* d'ischémie sur cœur perfusé, en utilisant un ballonnet en latex rempli d'eau, inséré dans le ventricule gauche et connecté à un transducteur de pression (Chang et al., 2006 ; Florian et al., 2006).

II.5.2. Mesure de la taille de l'infarctus

La mesure de l'aire infarctée du cœur concerne l'ischémie régionale effectuée par ligature de la LAD faite sur les deux modèles d'ischémie *in vivo* (Han et al., 2009 ; Matsui et al., 2001) ; et *ex vivo* (Ebel et al., 1999). Cette évaluation est réalisée par le test au triphényltétrazolium (TTC) qui différencie, par coloration, les cellules viables, métaboliquement actives et colorées en rouge, des cellules non viables nécrosées et colorées en blanc (Figure 11) (Chimenti et al., 2004 ; Philipp et al., 2005 ; Ferrera et al., 2009).

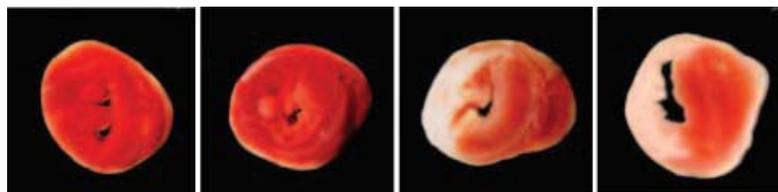


Figure 11: Photographies représentatives de la taille de l'infarctus mesurée par coloration au TTC (Gao et al., 2010).

II.5.3. Marqueurs de souffrance cellulaire cardiaques

L'estimation du taux de ces marqueurs se fait sur des échantillons prélevés à partir du sang, du liquide de perfusion ou même du milieu d'incubation, correspondant respectivement aux modèles d'ischémie *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* (Qin et al., 2011 ; Hwa et al., 2012 ; Yin et al., 2013). Ces paramètres biochimiques tels que la lactate déshydrogénase (LDH), la créatinine phosphokinase (CPK) et la troponine I sont indicateurs de l'intégrité des cardiomyocytes et celle du tissu cardiaque.

II.5.4. Paramètres du stress oxydant

Sachant l'implication du stress oxydant dans la physiopathologie de l'I-R (Scolletta et Biagioli, 2010), son évaluation est devenue une étape obligatoire dans l'appréciation de l'ampleur des dommages liés à l'ischémie et à la reperfusion. Ces mesures s'appliquent à tous les modèles d'ischémie cardiaque (Florian et al., 2006 ; Charniot et al., 2010; Shi et al., 2013) et concernent le statut oxydant et la défense antioxydants.

II.5.5. Nécrose, apoptose et libération des facteurs proapoptotiques

Bien que la mort cellulaire, par nécrose ou par apoptose, se produise lors de la reperfusion, c'est la durée de l'ischémie qui détermine si le myocarde reperfusé vit ou meurt (Philipp et al., 2005). La nécrose au niveau du myocarde ischémié puis reperfusé est évaluée par analyse histologique (Guler et al., 2011; Sahin et al., 2011). Quant aux cellules apoptotiques, elles sont détectées par marquage immunohistochimique en utilisant l'essai TUNEL (*terminal transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) dans lequel des résidus d'UTP marqués à la digoxigénine sont incorporés catalytiquement aux extrémités 3-OH des doubles ou simple brin d'ADN (Oriyanhan et al., 2005 ; Bak et al., 2006).

Par ailleurs, des facteurs proapoptotiques (cytochrome c, AIF, Bcl-2) libérés dans le cytoplasme en période de reperfusion et déclenchant la voie de signalisation de l'apoptose, peuvent être déterminés dans tous les modèles expérimentaux d'I-R (Matsui et al., 2001 ; Liao et al., 2016).

II.5.6. Evaluation de l'intégrité mitochondriale des cardiomyocytes

La mitochondrie est la première origine de production des ERO et spécialement au cours d'une I-R cardiaque. Elle représente également la cible de nombreux agents pharmacologiques testés afin de limiter les lésions dues à une I-R (Argaud et al., 2006). Les mitochondries sont isolées à partir de cœur ayant subi une ischémie globale ou régionale, ou issues à partir de cardiomyocytes en culture sujettes d'hypoxie-réoxygénation. Les tests réalisés sur la mitochondrie isolée sont la respiration mitochondriale, la production de l'ATP, le potentiel membranaire mitochondrial, la production des ERO, la capacité de rétention calcique mitochondriale (CRC) mesurée par l'ouverture du PTPm (Lu et al., 2011; Yuan et al., 2017).

Préservation du greffon cardiaque

III. Préservation du greffon cardiaque

La transplantation d'organe se résume à ces 4 phases ; prélèvement du greffon (explantation) et éventuellement arrêt de l'organe ; stockage et transport à froid ; implantation et reperfusion.

III.1. Préservation statique hypothermique : principe et limites

L'objectif de la préservation d'organes est d'assurer la meilleure fonction possible de l'organe transplanté (Tillou et al., 2014). Les principes de la préservation d'organes sont le rinçage, le refroidissement et l'intervention pharmacologique. La préservation peut être réalisée par perfusion, ensuite par conservation statique à basse température ou par perfusion continue en machine (Mühlbacher et al., 1999 ; Schipper et al., 2016).

L'hypothermie est utilisée pour diminuer le taux métabolique d'un organe non perfusé (Southard et Belzer, 1995). Du fait de sa nature techniquement simple et facilement reproductible, la préservation statique à froid est toujours la norme de référence en matière de protection du myocarde entre l'explantation à partir du donneur et l'implantation chez le receveur. Il permet des périodes ischémiques globales sûres allant jusqu'à 4 heures avec un taux d'échec de la greffe inférieur à 2% (Wagner, 2011 ; Jing et al., 2018).

Afin de réduire la nécessité d'une phase d'ischémie froide du myocarde entre l'explantation et l'implantation, des procédures de préservation à plus haute température ou même en normothermie sont mises au point, en particulier lorsque la perfusion est associée à la préservation (Southard et Belzer, 1995 ; Schipper et al., 2016).

Par ailleurs, la préservation statique hypothermique du myocarde est associée à un certain nombre de limites, notamment des lésions tissulaires induites par une préservation hypothermique prolongée, une difficulté à évaluer la fonction et la viabilité du greffon avant sa transplantations, l'inévitabilité d'une lésion d'I-R et des possibilités limitées de réparation du greffon cardiaque (Jeevanandam, 2010 ; Jing et al., 2018).

III.2. Solutions de préservation

Une solution de préservation doit protéger les cellules du greffon en réduisant le métabolisme à un niveau faible et en satisfaisant les besoins métaboliques minimums durant

la conservation. En plus de son rôle de vecteur de l'hypothermie, la solution de préservation doit prévenir ou limiter le gonflement cellulaire et l'œdème, l'accumulation intracellulaire de calcium, la perte en substrat énergétique, l'acidose intracellulaire, les lésions oxydatives, et l'inflammation (Fornas, 2001).

III.2.1. Composition

La solution de préservation contient des agents destinés à lutter contre les lésions d'I-R en ciblant les voies de ces lésions (Jamieson et Friend, 2008). Sa composition représente un facteur déterminant de la tolérance de l'organe au stockage hypothermique (Southard et Belzer, 1995).

III.2.1.1. Electrolytes

Les solutions de préservation devraient être hyperpotassiques comme le milieu intracellulaire, permettant de limiter l'entrée d'eau et de sodium dans la cellule (Hauet et Eugene, 2008).

III.2.1.2. Imperméants ou colloïdes

Ce sont des sucres (raffinose, sucrose, mannitol, glucose) ou des colloïdes (hydroxyéthyl amidon (HES), polyéthylène glycol (PEG), albumine) qui limitent la formation de l'œdème intracellulaire grâce à la pression osmotique qu'ils exercent dans le compartiment vasculaire (Fornas, 2001).

III.2.1.3. Antioxydants

Ce sont des piègeurs enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase), des antioxydants de faible poids moléculaire (vitamine E, N-acétylcystéine) ou des chélateurs de fer (déféroxamine, lactobionate). Leur action peut être intra et/ou extracellulaire selon leur nature (Fornas, 2001).

III.2.2 Exemples de solutions de préservation

Il existe différents types de solution de préservation des organes dont l'indication dépend de l'organe à conserver (tableau 1).

Tableau 1: Composition des solutions de préservation hypothermique d'organes (Parsons et Guarrera, 2014).

Celsior la solution Celsior ; HTK Solution Histidine-Tryptophane-Cétoglutarate ; ST Solution cardioplégique de l'Hôpital Saint-Thomas ; UW solution de l'Université de Wisconsin.

	<i>ST</i>	<i>UW</i>	<i>Celsior</i>	<i>HTK</i>
Electrolytes (mmole/L)				
<i>Sodium</i>	138	30	100	15
<i>Potassium</i>	20	125	15	9
<i>Chlore</i>	157	-	28	50
<i>Calcium</i>	2,7	-	0,245	0,015
<i>Magnésium</i>	16	5	13	4
<i>Phosphate</i>	-	25	-	-
<i>Sulfate</i>	-	5	-	-
<i>Bicarbonate</i>	8	-	-	-
Imperméants				
<i>HES (g/L)</i>	-	50	-	-
<i>Raffinose (mmole/L)</i>	-	30	-	-
<i>Glutamate (mmole/L)</i>	-	-	20	-
<i>Mannitol (mmole/L)</i>	-	-	60	30
<i>Histidine (mmole/L)</i>	-	-	30	198
<i>Tryptophane (mmole/L)</i>	-	-	-	2
<i>Cétoglutarate (mmole/L)</i>	-	-	-	1
<i>Glucose (mmole/L)</i>	-	-	-	-
<i>Lactate (g/L)</i>	28	-	-	-
Autres				
<i>Pénicilline (U/L)</i>	-	200	-	-
<i>Adénosine (mmole/L)</i>	-	5	-	-
<i>Allopurinol (mmole/L)</i>	-	1	-	-
<i>Dexaméthasone (mg/L)</i>	-	8	-	-
<i>Glutathion (mmole/L)</i>	-	3	3	-
<i>Polyéthylène glycol (35 kDa)</i>	-	-	-	-
<i>Procaine (mmole/L)</i>	1	-	-	-
pH	7,4	7,4	7,3	7,2
Osmolarité (mOs/L)	370	320	320	310

III.2.2.1. Solution de l'Université de Wisconsin (UW)

C'est une solution intracellulaire initialement développée pour la transplantation du foie (Southard et Belzer, 1995), son efficacité est prouvée dans la préservation du cœur et des poumons. Sa composition en ions K^+ et Na^+ est très élevée. Elle empêche le gonflement des cellules par le lactobionate et la raffinose. Elle comprend également des antioxydants (le

glutathion) et des piègeurs d'ERO ainsi que le HES, un colloïde qui empêche la formation d'œdème interstitiel (Wagner, 2011 ; Jing et al., 2018).

III.2.2.2. Solution Histidine-tryptophane-cétoglutarate

La solution HTK a été initialement développée pour la cardioplégie. Son utilisation a été étendue à la préservation du foie, des reins, du pancréas ainsi que du cœur et des poumons (Gu et al., 1996). L'effet protecteur de la solution HTK repose sur le pouvoir tampon élevé indépendant de la température qui est fourni par l'histidine et sa faible teneur en électrolytes, ce qui limite l'acidose tissulaire induite par l'ischémie. Le cétoglutaraldéhyde et le tryptophane sont les substrats énergétiques de la solution, car ils sont capables de produire l'ATP via une voie alternative inhibant la glycolyse (Wagner, 2011).

III.2.2.3. Solution de Celsior

La solution Celsior a été développée pour la préservation du cœur (Menasché et al., 1994), elle est également considérée comme liquide de perfusion lors de l'arrêt cardiaque initial du donneur, de la réimplantation du greffon après conservation et de la reperfusion précoce. La formulation de Celsior prévient le gonflement des cellules des vecteurs osmotiques inertes (lactobionate et manitol). Elle contient un puissant tampon (histidine), le glutamate comme substrat énergétique et une teneur élevée en magnésium pour limiter la surcharge en calcium (Yang and He, 2005 ; Cameron et Cornejo, 2015).

III.4. Nouvelles stratégies de préservation du greffon cardiaque

Le principal moyen d'augmenter la viabilité du greffon cardiaque est de limiter le temps d'ischémie. Cependant, dans la majorité des cas, cela est impossible pour des raisons techniques et logistiques. A cet égard, au cours des dernières décennies, plusieurs nouvelles approches visant à améliorer la préservation des greffons cardiaques et le maintien de la fonction de greffe sur des intervalles de temps prolongés ont été suggérées et validées expérimentalement.

III.4.1. Nouvelles formulations de solutions de préservation du cœur

Au cours de la dernière décennie, plusieurs nouvelles formulations de solution de préservation de cœur ont été développées et testées précliniquement. Une nouvelle solution

extracellulaire, Somah, comprend des substrats énergétiques, des modulateurs métaboliques, des antioxydants, de la L-arginine et des tampons de phosphate et de bicarbonate (Minasian et al., 2015). Une meilleure cardioprotection a été observée après 5 h de conservation d'un cœur de porc en utilisant Somah à 21 °C comparé avec les solutions Celsior et UW (Lowalekar et al., 2014).

III.4.2. Supplémentation de la solution de préservation standard avec des agents anti-ischémiques

Divers composés chimiques actifs ayant des propriétés anti-ischémiques (cyclosporine A, taurine, molécule libérant le monoxyde de carbone CORM-3, doxycycline, clustérine, lévocarnitine, etc.) ont été testés comme additifs aux solutions standards de préservation de cœur dans des modèles précliniques de préservation statique froide (Gao et al., 2005 ; Zhou et al., 2014). Bien que toutes les études aient démontré certains avantages en termes d'atténuation des lésions d'I-R myocardique, aucune des solutions de préservation cardiaque modifiées n'est actuellement approuvée pour utilisation clinique (Minasian et al., 2015).

III.4.3. Perfusion du greffon cardiaque

Actuellement, l'intérêt pour la technique de perfusion mécanique a grandi. La perfusion du cœur par une machine peut être réalisée de deux manières différentes : perfusion continue du cœur arrêté par la solution de perfusion froide et oxygénée (Collins et al., 2008) et la perfusion du cœur battant avec le sang en normothermie (Wagner, 2011). Afin d'améliorer encore la viabilité des greffons perfusés, des milieux de perfusion supplémentés avec divers agents antioxydants peuvent également minimiser efficacement les lésions induites par les ERO (Shi and Xue, 2016).

III.4.4. Préservation normothermique

Son principe de base consiste à fournir un environnement physiologique normal au greffon. Cette perfusion normothermique riche en oxygène évite les lésions liées à l'I-R et offre l'occasion d'évaluer la fonction du greffon dans un environnement *ex vivo*, éliminant ainsi le risque de rejet pour le receveur. Cependant, la préservation normothermique du greffon est plus complexe d'un point de vue technique car elle nécessite des compétences spécialisées et un appareil complexe. La conservation normothermique a été utilisée dans la préservation expérimentale des reins, du cœur, des poumons et du foie, mais elle n'a pas

encore été utilisée de manière clinique. Les résultats de la préservation du cœur et des poumons sont encourageants et nécessitent un développement ultérieur (Jamieson and Friend, 2008).

III.4.5. Pré-conditionnement et post-conditionnement de la greffe cardiaque

Le pré- et post-conditionnement trouve également leur application cardioprotectrice contre les lésions de reperfusion produites lors de la transplantation du greffon cardiaque. Il a été démontré que l'effet protecteur du PCI sur les greffes cardiaques pourrait être encore amélioré par l'administration de l'inhibiteur de l'échangeur Na^+/H^+ , cariporide, pendant l'épisode de PCI (Kevelaitis et al., 2001). En plus, un protocole de postCI consistant en trois épisodes d'ischémie globale de 30 secondes, réalisés après 4 h de stockage cardiaque hypothermique chez le rat, a permis, de supprimer les arythmies de reperfusion et de réduire la production d'anions superoxyde (Lauzier et al., 2007).

Propolis et Antioxydants Naturels

IV. Propolis et Antioxydants naturels

IV.1. Antioxydants naturels

IV.1.1. Polyphénols

Faisant partie intégrante de l'alimentation humaine, les polyphénols constituent le groupe de métabolites secondaires le plus large et le plus répandu du règne végétal (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les polyphénols sont des molécules dont la structure contient un ou plusieurs cycles benzéniques auxquels au moins deux groupes hydroxyl sont liés (figure 12). Le terme s'applique également, toutefois, à certains phénols simples dans lesquels un seul groupe hydroxyl libre est lié à un seul cycle benzène (Sandoval-Acuña et al., 2014).

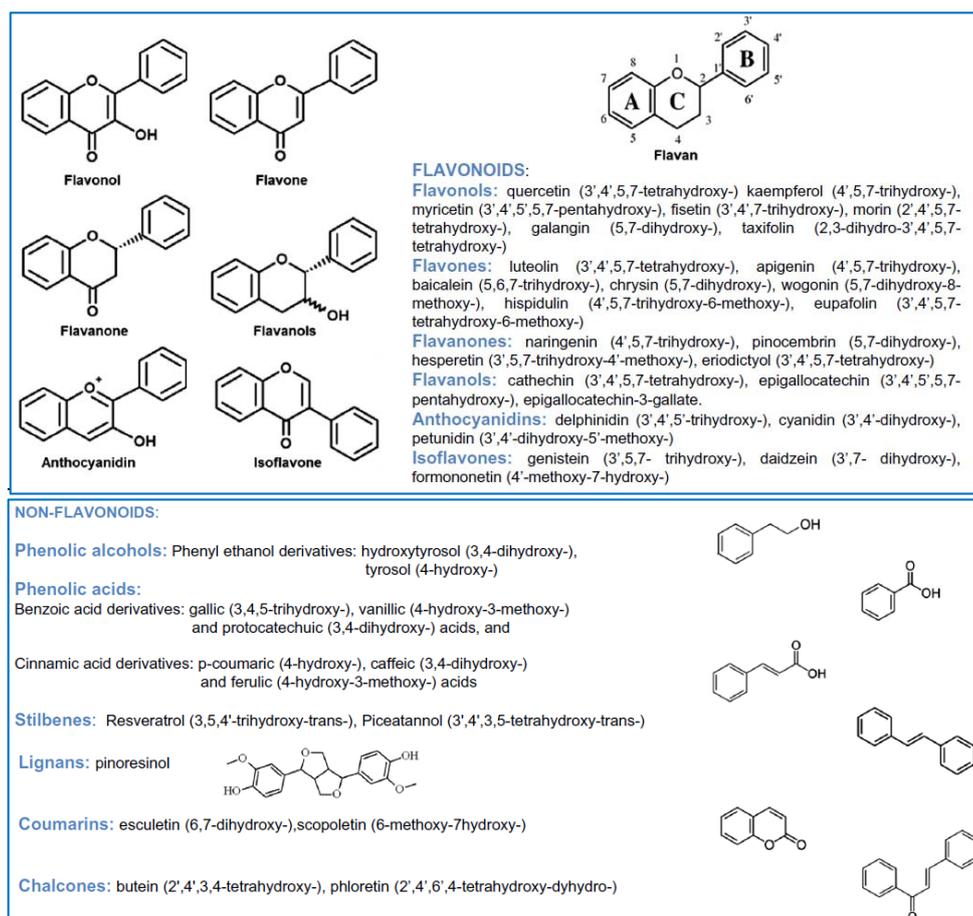


Figure 12: Structures de base des principales sous-classes des polyphénols (Sandoval-Acuña et al., 2014).

Plus de 8000 structures phénoliques sont connues, allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Du point de vue structurel, les polyphénols peuvent être classés en deux sous-groupes principaux distincts, à savoir les flavonoïdes et les non-flavonoïdes. Chaque sous-groupe comprend six sous-classes différentes (figure 12) (Sandoval-Acuña et al., 2014). Les polyphénols peuvent être conjugués avec des résidus sucrés ou être liés avec d'autres composés chimiques, tels que des acides carboxyliques, des amines ou des lipides.

IV.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont une famille de composés phénoliques connus pour être synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne (Kumar et Pandey, 2013).

Chimiquement, les flavonoïdes dérivent de l'enchaînement benzo- γ -pyrane. Ils possèdent tous un même squelette de base (flavane) à quinze atomes de carbone constitué de deux noyaux benzéniques (A et B) reliés par un hétérocycle pyrane (C) (figure 12) (Ghedira, 2005 ; Kumar et Pandey, 2013 ; Testai, 2015).

Plus de 5000 flavonoïdes distincts ont été identifiés. Ils peuvent être divisés en différents groupes en fonction du degré d'oxydation du cycle C en position 4, du schéma d'hydroxylation et de la substitution benzénoïde en position en C3. Les principales sous-classes de flavonoïdes sont au nombre de six: les flavonols (kaempférol, quercétine, myricétine, galangine), les flavones (techtchryisine, chryisine, lutéoline, baicaléine, apigénine), les flavanones (pinocembrine, pinostrobine naringénine, hespéridine), les flavan-3ols (pinobanksine, catéchine, silibinine), les anthocyanidines (apigénidine, cyanidine) et les isoflavones (genistéine, daidzine) (figure 12) (Kumar et Pandey, 2013; Testai, 2015).

Les flavonoïdes se présentent sous forme d'aglycones ou génines (entités dépourvues de reste osidique), d'hétérosides (portant un ou plusieurs résidus osidiques) et de dérivés méthylés (Ghedira, 2005 ; Kumar et Pandey, 2013).

IV.1.3. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Etant reconnue comme d'exceptionnels antioxydants, les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes, sont capables d'exercer une gamme variée d'activités biologiques. Les polyphénols exercent, entre autres, des effets antimicrobiens, anti-inflammatoires, anti-athérogènes, vasodilatateurs, anti-agrégants plaquettaires, anti-mutagènes et anti-cancérogènes, anti-allergiques, antivirales, immunomodulatrices (Sandoval-Acuña et al., 2014).

Chacune des activités biologiques est limitée à un nombre choisi de molécules phénoliques, leur sélectivité d'action semble être leur particularité structurale. En effet, au-delà de leurs différences et particularités structurales, un grand nombre de polyphénols, y compris les flavonoïdes, semblent pouvoir protéger contre des maladies (cancer, troubles cardiovasculaires et neurodégénératifs) qui, d'un point de vue physiopathologique, sont très différentes les unes des autres. Cependant, le stress oxydant fait partie des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la plupart de ces maladies connues (Sandoval-Acuña et al., 2014).

IV.1.3.1. Action antioxydante des flavonoïdes

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres tels que le radical hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2\cdot^-$), le radical peroxy, le radical peroxy-nitrite ($\text{OONO}\cdot$) et hypochlorite ($\text{ClO}\cdot$) selon la réaction illustrée par la figure 13 (Sandoval-Acuña et al., 2014).

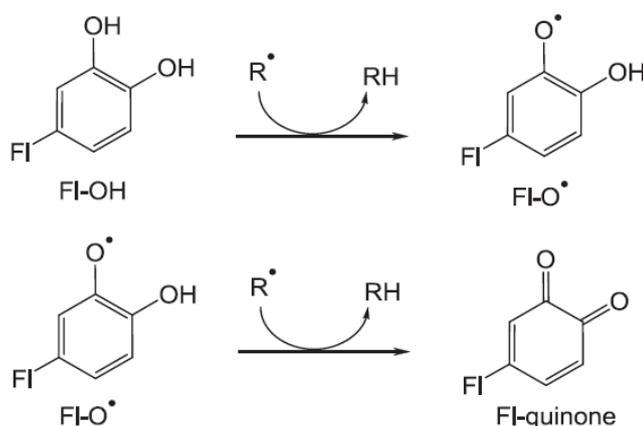


Figure 13: Réduction d'un radical libre ($\text{R}\cdot$) par un flavonoïde (Procházková et al., 2011).

La disposition spatiale des substituants peut être un facteur plus déterminant de l'activité antioxydante des flavonoïdes que le squelette de base flavane (Procházková et al., 2011). En effet, l'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de leur degré d'hydroxylation (Heim et al., 2002), d'autres substitutions (glycosylation et O-méthylation) (Mishra et al., 2003) et même de leur degré de polymérisation (Lotito et al., 2000).

Les principales caractéristiques structurales des flavonoïdes requises pour un piégeage efficace des radicaux sont résumées comme suit :

- une structure ortho-dihydroxy (catéchol) dans le cycle B, pour la délocalisation d'électrons (figure 14A).

- une double liaison en conjugaison avec une fonction 4-oxo dans le cycle C permet la délocalisation d'électrons à partir du cycle B (figure 14B).

- les groupes hydroxyles en positions 3 et 5 fournissent une liaison hydrogène au groupe oxo (figure 14C) (Procházková et al., 2011).

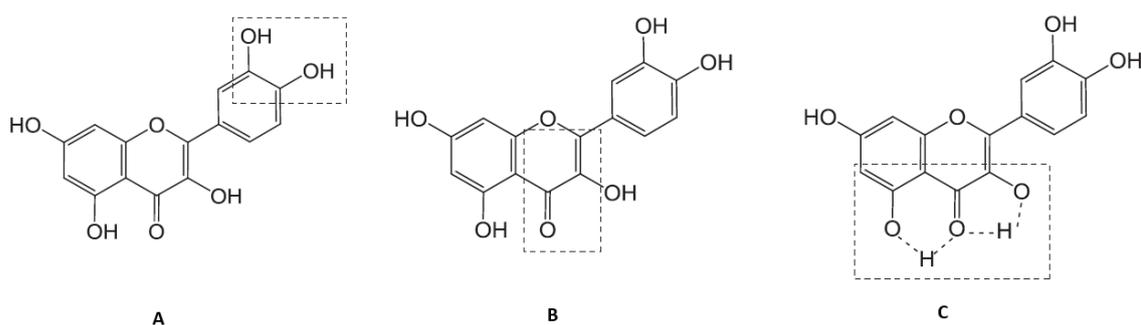


Figure 14: Principales caractéristiques structurales des flavonoïdes (Procházková et al., 2011).

(A) : Structure ortho-dihydroxy dans le cycle B ; (B) : Double liaison en conjugaison avec une fonction 4-oxo dans le cycle C ; (C) Groupes hydroxyles en positions 3 et 5.

IV.1.3.2. Action des flavonoïdes sur la mitochondrie

La plupart des recherches menées sur l'action des flavonoïdes et autres polyphénols sur les mitochondries s'est concentrée sur leur capacité à agir en tant qu'antioxydants. Cependant, plusieurs recherches rendent compte de la capacité potentielle de certains

flavonoïdes à moduler une variété de processus biologiques affectant directement les mitochondries (Sandoval-Acuña et al., 2014).

En effet, certains flavonoïdes augmentent la biogenèse mitochondriale se traduisant par une amélioration de l'endurance physique (Chung et al., 2010). L'un des effets les plus étudiés des flavonoïdes sur les mitochondries concerne leur capacité à moduler l'activité de certains complexes de la CRM (Zini et al., 1999). Les flavonoïdes présentent également une capacité à découpler le système de phosphorylation oxydatives (Pardo Andreu et al., 2015), et/ou à moduler l'ouverture du PTPm (Lu et al., 2011). Par conséquent, les flavonoïdes dissipent, d'une façon dépendante de la concentration, le potentiel membranaire mitochondriale (Dorta et al., 2005). En plus, les flavonoïdes possèdent un effet pro ou anti-apoptotique potentiel par lequel ces composés pourraient être cytoprotecteurs (Liao et al., 2016). Une autre action mitochondriale, limitée à quelques flavonoïdes, est celle d'inhiber l'activité ATPase du complexe V (Zheng et Ramirez, 2000).

IV.1.3.3. Cardioprotection spécifique des flavonoïdes

Un certain nombre d'études expérimentales ont examiné les effets de chaque classe de flavonoïdes sur plusieurs modèles animaux de lésion d'I-R du myocarde et ont mis en évidence une activité protectrice *in vitro* ou *in vivo* sur divers protocoles de traitement (Zhao et Zhao, 2010 ; Testai et al., 2013). Les effets protecteurs de différents flavonoïdes dans l'I-R comprennent une récupération fonctionnelle cardiaque améliorée après la phase d'ischémie, une augmentation du flux coronaire, une diminution des dommages oxydatifs et une protection contre la mort cellulaire.

a. Activité antioxydante

Les effets protecteurs des flavonoïdes sur le système cardiovasculaire et notamment en I-R, sont attribués à leur effet antioxydant. Cet effet est assuré principalement par leur propriété de piégeage direct des ERO (Falk et al., 2007 ; Akhlaghi and Bandy, 2009) et par leur activité de chélation des métaux (Malesev et Kuntic, 2007). Les flavonoïdes renforcent également la défense antioxydante en activant les enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx) et en induisant des enzymes de détoxification de phase II (la NAD(P)H-quinone oxydoréductase, la GS-T et l'UDP-glucuronosyl transférase) (Nagata et al., 1999). En outre, un certain nombre de flavonoïdes sont également reconnus pour leur capacité à réduire les

niveaux d'ERO en inhibant directement les principales enzymes qui les forment notamment au niveau de la CRM (Cos et al., 1998 ; Lagoa et al., 2011; Sandoval-Acuña et al., 2012) .

b. Activité anti-inflammatoire

Les lésions myocardiques dues à la reperfusion du tissu ischémique sont également causées par plusieurs facteurs pro-inflammatoires, notamment des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interleukine 1 β (IL-1 β) et l'interleukine 6 (IL-6) (Testai, 2015). Plusieurs rapports ont montré que les flavonoïdes sont capables de diminuer l'expression de la voie de signalisation inflammatoire, en inhibant la libération excessive de NO * , l'expression de la COX-2 et l'activation des leucocytes. En particulier, les flavonoïdes réduisent également la synthèse de la protéine iNOS en empêchant l'activation de NF- κ B (Chen et al., 2001; Ha et al., 2008).

c. Action sur la mitochondrie

L'activité de certains flavonoïdes sur les cibles mitochondriales peut expliquer l'effet cardioprotecteur, en rendant possible la production de l'ATP mitochondrial et de l'homéostasie calcique, en préservant au final l'ouverture du PTPm et l'apoptose cellulaire.

Plusieurs articles ont rapporté que les flavonoïdes influent sur le fonctionnement mitochondrial et qu'ils induisent un découplage modéré de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries cardiaques, améliorant ainsi la respiration mitochondriale sans la compromettre de manière irréversible (Dorta et al., 2005; Trumbeckaite et al., 2006). En plus, divers flavonoïdes, tels que le kaempférol, activent directement l'uniport de Ca $^{2+}$, à des concentrations compatibles avec une prise quotidienne d'aliments riches en flavonoïdes. Ceci suggère qu'une modulation de l'absorption mitochondriale de Ca $^{2+}$ *in vivo* dépend de l'apport alimentaire en flavonoïdes (Montero et al., 2004).

IV.2. Propolis

IV.2.1. Description de la propolis

La propolis est une matière résineuse recueillie par les abeilles à partir des exsudats et des bourgeons des plantes et à laquelle sont ajoutés des substances sécrétées par le métabolisme des abeilles (Burdock, 1998).

Le mot propolis, venant du grec 'pro' signifiant devant ou en défense et 'polis' signifiant la cité, reflète son importance pour les abeilles, car elles l'utilisent pour lisser les parois internes, ainsi que pour protéger la colonie contre les maladies, pour boucher les trous de la ruche et couvrir les carcasses d'intrus en évitant leur décomposition (Sforcin et Bankova, 2011).

Sa couleur varie du vert jaunâtre au brun foncé selon, sa source et son âge (figure 15). Sa texture est dure et cassante à froid, mais devient molle et très collante à chaud (Lotfy, 2006).

Actuellement, la Chine et le Brésil sont les deux principaux fournisseurs de propolis brute sur le marché mondial. La plupart des propolis chinoises proviennent du peuplier (*Populus sp.*). Tandis qu'au Brésil, la *Baccharis dracunculifolia*, plante indigène du sud-est du Brésil, est la plus importante source botanique de propolis verte brésilienne (Wang et al., 2015).



Figure 15: Aspects et couleurs de la propolis

IV.2.2. Origine et composition de la propolis

La propolis est composée de 50 % de résine végétale, de 30 % de cire, de 10 % d'huiles essentielles et composés phénoliques, de 5 % de pollen et de 5 % de matières diverses (organiques et minérales) (Burdock, 1998 ; Bankova et al., 2000;).

Chimiquement, la propolis est une véritable usine de substances composée essentiellement de flavonoïdes, d'acides et d'ester phénoliques, de terpénoïdes, d'acides

aliphatiques et de nombreuses vitamines (dont la vitamine A et les vitamines du groupe B). Les composés phénoliques sont les principaux composés responsables des activités biologiques de la propolis. On y trouve différents flavonoïdes (pinocembrine, pinostrobine, pinobanksine, chryisine, tectochryisine, acacétine, rutine, catéchine, naringénine, galangine, lutéoline, kaempférol, apigénine, myricétine et quercétine), des acides phénoliques (acide cinnamique et acide caféique) et un dérivé du stilbène, le resvératrol (Lotfy, 2006).

Il est important d'indiquer qu'il existe des différences significatives de composition en substances bioactives entre les différentes propolis, elle dépend des espèces d'abeilles, l'origine géographique, la nature et la disponibilité des végétaux nécessaires à l'élaboration de la propolis (Bankova et al., 2000). En effet, la propolis brésilienne est composée essentiellement d'artepelline C, de pinocembrine, de kaempférol et d'acide hydroxycinnamique. La propolis chinoise est composée d'apigénine, de kaempférol, de chryisine, de galangine et d'acide caféique phényle ester (Wang et al., 2015). Alors que la propolis chilienne est constituée de la pinocembrine, l'acide caféique phényle ester, la quercétine et la galangine (Daleprane et al., 2012). Par ailleurs, la propolis algérienne originaire de la région de Jijel est composée de pinocembrine, de pinostrobine chalcone et de tectochryisine ainsi que l'acide hydroxycinnamique (Lahouel et al., 2011).

IV.2.3. Extraction de la propolis et problème de standardisation

L'extraction des échantillons de propolis qui sont utilisés dans des études de recherche constitue une étape critique du processus du test expérimental. Les solvants utilisés pour l'extraction sont généralement des alcools (méthanol et éthanol) (Sforcin and Bankova, 2011). Le solvant le plus souvent utilisé est l'éthanol contenant différents pourcentages d'eau. Il a été constaté que 70 % d'éthanol peut extraire la plupart des composants actifs de la propolis mais pas les cires (Bankova et al., 1992).

La teneur en flavonoïdes dans les extraits de propolis est l'élément principal de leur standardisation. De plus, la nature des flavonoïdes extraits et leurs taux sont fonction du procédés d'extraction et de leurs origines végétale et géographique. Cet aspect rend difficile et même impossible la standardisation universelle de la propolis (Bankova, 2005; Ghedira, 2005; Sforcin et Bankova, 2011).

IV.2.4. Propriétés biologiques de la propolis

IV.2.4.1. Propriétés antioxydante

La capacité antioxydante de la propolis est liée à certains de ses effets biologiques. Les flavonoïdes contenus dans la propolis sont de puissants antioxydants, capables de piéger les radicaux libres et de protéger ainsi la membrane cellulaire contre la peroxydation des lipides (Kolankaya et al., 2002). De plus, les ERO sont impliqués dans le vieillissement et la mort cellulaire impliqués dans des conditions telles que les maladies cardiovasculaires, l'arthrite, le cancer, le diabète, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Daleprane et Abdalla, 2013). La propolis peut réduire les niveaux cellulaires de H₂O₂ et de NO*, qui pourraient être impliqués dans ses effets anti-inflammatoires (Tan-no et al., 2006).

IV.2.4.2. Propriété anti-inflammatoire

La propolis possède une activité immunomodulatrice et anti-inflammatoire en agissant sur différentes voies de la réponse immunitaire (Sforcin, 2007). L'exemple est celui de l'administration à court terme de la propolis (200 mg/kg) à des souris et qui inhibait la production d'IFN- γ dans des cultures de splénocytes (Orsatti et al., 2010). De plus, des souris traitées avec de la propolis verte brésilienne (200 mg/kg) pendant 14 jours ont montré une inhibition de la production d'IL-1, d'IL-6, d'IFN- γ , d'IL-2 et d'IL-10 par les cellules de la rate, ce qui suggère une activité anti-inflammatoire (Lee et al., 2005).

IV.2.4.3. Propriété antimicrobienne

Les activités antimicrobiennes de la propolis sont bien documentées contre différentes bactéries (Sforcin et al., 2000), les levures (Sforcin et al., 2001), les virus (Búfalo et al., 2009) et les parasites (Freitas et al., 2006). *In vitro*, la propolis peut agir directement sur les microorganismes, et *in vivo*, elle peut stimuler le système immunitaire en activant les mécanismes impliqués dans la destruction des microorganismes.

IV.2.4.4. Propriété anticancéreuse

Les principaux mécanismes par lesquels la propolis affecte les cellules tumorales sont liés à l'inhibition de la croissance cellulaire et à l'apoptose (Sforcin, 2007). En plus, le dérivé

de l'acide caféique (CAPE) contenu dans la propolis interfère dans l'arrêt du cycle cellulaire (Lee et al., 2005).

IV.2.4.5. Propriété hépatoprotectrice

Des études portées sur la propolis algérienne ont révélé un effet hépatoprotecteur en agissant essentiellement sur le stress oxydant par l'activation du système antioxydant enzymatique et l'inhibition de la peroxydation lipidique au niveau hépatique (Lahouel et al., 2004). L'action de la propolis cible également la mitochondrie hépatique en restaurant le coefficient de respiration mitochondriale et le potentiel de la membrane mitochondriale. La propolis prévient également le gonflement mitochondrial ce qui pourra inhiber le processus apoptotique (Benguedouar et al., 2008; Boussenane et al., 2009).

IV.2.4.6. Propriété cardioprotectrice

La modulation des marqueurs des différentes maladies cardiovasculaires par la propolis a été démontrée dans plusieurs études. Des essais *in vitro* et *in vivo* ont été mis au point pour élucider les mécanismes moléculaires de cet effet bénéfique. Il s'est avéré lié à la régulation du métabolisme du glucose et des lipoprotéines; la modulation de l'expression des gènes; la diminution de l'activité des cytokines inflammatoires et du stress oxydant; l'amélioration de la fonction endothéliale et enfin l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Daleprane et Abdalla, 2013).

Citons l'exemple de la propolis Malysienne dont le prétraitement chez les rats a montré un effet protecteur vis-à-vis de l'infarctus myocardique induit par l'isoprotérénol. Ce prétraitement a amélioré la défense antioxydante enzymatique et a diminué le taux de la peroxydation lipidique et celui des marqueurs cardiaques (Ahmed et al., 2017).

IV.2.5. Propolis et ischémie-reperfusion

Grâce à sa forte activité antioxydante la propolis qui lui confère des propriétés protectrices des fonctions rénale et cérébrale, la propolis a prouvé son efficacité sur des modèles d'I-R rénal et cérébral.

Dans une étude réalisée par da Costa et al., la propolis rouge Brésilienne, administrée par voie orale trois jours avant le procédé chirurgical, assurait une protection contre les

lésions induites par une ischémie- reperfusion rénale. La propolis diminuait le taux de la créatinine et celui de la peroxydation lipidique avec une augmentation du glutathion rénal. Elle atténuait l'induction de la NOS endothéliale avec augmentation de l'expression de la hème-oxygénase au niveau du tissu rénal (da Costa et al., 2015).

En outre, Bazmandegan et al., a étudié l'effet de la propolis originaire d'Iran sur un modèle d'ischémie cérébrale. La propolis brune était administrée par voie intrapéritonéale 48, 24 et 1 heures avant et 4 heures après l'occlusion de l'artère médiane cérébrale chez la souris. Le traitement a entraîné une restauration de l'activité des enzymes antioxydantes et une diminution de la peroxydation lipidique ainsi que du volume de l'infarctus cérébral. Les déficiences neurologique, sensorielle et motrice ont également été sensiblement améliorés (Bazmandegan et al., 2017).

Par ailleurs, dans quelques études, les chercheurs ont porté leur attention sur l'effet protecteur de la pinocembrine contre les lésions de l'I-R. Ce 5, 7-dihydroxyflavanone est l'un des flavonoïdes à la plus forte concentration dans la composition chimique de la propolis.

Dans une étude de Liu et ses collaborateurs, la protection par la pinocembrine a été étudiée au niveau d'un modèle *in vivo* d'occlusion et de reperfusion de l'artère médiane cérébrale chez le rat. La pinocembrine a été administrée au début de la reperfusion. La pinocembrine a nettement augmenté la viabilité du rat, réduit le volume d'infarctus cérébral et les scores de déficit neurologique dans tous les groupes de traitement.

Dans la même étude et en utilisant une culture de cellules neuronales corticales primaires, un modèle de lésion semblable à celui d'une I-R était réalisé par une privation en oxygène et en glucose suivie d'une réoxygénation durant laquelle la pinocembrine a été introduites. Les résultats ont montré une augmentation du taux de survie neuronale, une diminution de la libération de la LDH, avec une atténuation de l'apoptose. Cette protection était associée à l'augmentation du glutathion et à la réduction des taux des ERO, du NO[•] et de l'activité de la NOS neuronale (nNOS) et inductible (iNOS). La pinocembrine régulait négativement la protéine caspase-3 (Liu et al., 2008).

Dans le même contexte de lésion et en utilisant la même molécule flavonoïque, Lungkaphin et ses collaborateurs, testaient l'effet de la pinocembrine sur un modèle *in vivo*

d'ischémie cardiaque régionale de 30 min suivie de reperfusion de 120 min. La pinocembrine a été administrée par voie intraveineuse 30 minutes avant l'occlusion de la LAD. Le traitement par la pinocembrine a montré une amélioration de la fonction cardiaque, une diminution du nombre d'arythmies avec une diminution de 49 % de la taille de l'infarctus. En plus la pinocembrine diminuait les taux du MDA et des rapports Bax/Bcl-2 (Lungkaphin et al., 2015).

Les résultats des études susmentionnées suggèrent que les constituants de la propolis, seuls ou en synergie, pourraient constituer une nouvelle stratégie thérapeutique pour réduire les lésions de l'I-R de plusieurs organes. Ces effets protecteurs sont, en partie importante, liés à leurs actions antioxydante et anti-apoptotique.

Première partie expérimentale

*Modèle ex vivo d'ischémie-reperfusion
cardiaque*

Matériel et Méthodes

L'étude expérimentale a été effectuée en partie, au sein des laboratoires de Biochimie et à l'Université 8 mai 1945 Guelma. Dans le cadre d'un stage de formation, une autre partie du travail a été réalisée au niveau du laboratoire de pharmacologie clinique, Faculté de médecine, Université El Manar, Tunis, Tunisie. La suite du travail expérimental s'est déroulée au niveau du laboratoire de Pharmacologie (équipe 3 de l'unité INSERM U955, Laboratoire de physiopathologie et pharmacologie des insuffisances coronaire et cardiaque), Faculté de Médecine, Université de Paris –Est Créteil, France.

I. Matériel biologique

I.1. Animaux

Dans le premier volet de l'étude concernant l'ischémie-reperfusion *ex vivo*, l'expérimentation est effectuée sur des rats Wistar albinos mâles ayant un poids compris entre 180 et 200 g et provenant de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Tunis puis élevés et alimentés dans l'unité d'expérimentation animale de la Faculté de Médecine de Tunis.

Selon les recommandations du Conseil International des Sciences des Animaux de Laboratoire (ICLAS), Tous les animaux de laboratoire ont été logés dans des conditions environnementales constantes (température de 22-25 °C et une photopériode de 12 h/24 h) et ayant libre accès à l'eau et à la nourriture

I.2. Substance flavonoïdique : Propolis

L'extrait éthanolique lyophilisé de la propolis nous a été gracieusement fourni par le Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, Jijel. Algérie. Son analyse HPLC (Annexe 1) a révélé la présence de flavonoïdes (Pinostrobin Chalcone, Pinoembrine et Tectochrysin) et d'acides phénoliques (Acide Hydroxycinnamique) (Lahouel et al., 2011).

II. Méthodes

II.1. Solubilisation de la propolis

La propolis a une faible solubilité dans l'eau et peut être dissoute dans plusieurs solvants organiques. L'éthanol est un bon solvant solubilisant la propolis et possède un effet cardioprotecteur moindre sur le modèle d'I-R cardiaque, comparé au diméthylsulfoxyde (DMSO) (Shlafer et al., 1982 ; Chen et al., 1999).

La propolis a été préparée quotidiennement dans la solution de Krebs-Hensleit (KH) à 37 °C (Annexe 2), après avoir été dissoute dans une concentration finale de 0,25% d'éthanol.

II.2. Dosage des polyphénols

Le contenu de la propolis en polyphénols est évalué par la méthode décrite par Singleton et al., 1999 utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). A 50 µl de la solution de propolis à 1 mg/mL, est ajouté 750 µl du réactif de Folin dilué 10 fois. Après agitation, le mélange est incubé à température ambiante dans l'obscurité pendant 5 min. un volume de 750 µl de carbonate de sodium (NaCO₃) à 60mg/mL est ensuite ajouté. L'absorbance est lue à 725 nm après 90 min d'incubation dans l'obscurité. Le blanc est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant le réactif de Folin par de l'eau distillée.

Une gamme de concentrations croissantes de l'acide gallique (50-250 µg/mL) utilisé comme standard a été réalisée en suivant le même protocole. Les résultats sont exprimés en µg équivalent d'acide gallique par mg de propolis.

II.3. Activité antioxydante

La capacité de la propolis à piéger les radicaux libres a été estimée par une simple méthode colorimétrique (Koleva et al., 2002). Ce test utilise le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH[•]) de couleur violette à l'état stable. La couleur change en jaune en présence d'antioxydant donneur d'hydrogène.

1,5 mL de solution alcoolique de DPPH (10⁻⁴ M) fraîchement préparée a été ajouté à des tubes recouverts d'aluminium contenant un volume de 15 µl de chaque concentration de la solution éthanolique de propolis (10⁻⁴ ; 10⁻³ ; 10⁻² ; 10⁻¹ ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 ; 1 mg/mL). Après

agitation puis incubation à 25 °C pendant 15 minutes, l'absorbance du DPPH réduit a été mesurée à 517 nm. L'éthanol a été utilisé comme blanc. L'activité antioxydante de la propolis à différentes concentrations a été comparée à deux antioxydants standards, la quercétine et la vitamine E.

Les résultats du test sont exprimés en terme de pourcentage d'inhibition de DPPH'. La concentration efficace qui réduit à 50% le DPPH' est ainsi déduite à partir de la formule suivante : ***Pourcentage d'inhibition*** = $[(A_b - A_a) / A_b] \times 100$

A_a et A_b sont les valeurs d'absorbance du DPPH réduit à 517 nm de l'essai et du blanc respectivement.

II.4. Protocole expérimental de l'ischémie-reperfusion normothermique *ex vivo*

II.4.1 Sacrifice des rats

Les rats choisis pour ce volet de l'étude doivent être de sexe mâle, ayant un poids compris entre 200 et 250g. Après avoir anesthésié les rats, ils sont disposés en décubitus dorsal. Une incision abdominale puis thoracique est réalisée (Figure 16). Le cœur isolé de son péricarde est excisé en coupant l'aorte à un niveau supérieur et est arrêté en le plongeant dans une solution cardioplégique à 4 °C (solution de KH fraîchement préparée et refroidie à 4 °C à laquelle est ajouté un petit volume d'héparine diluée à 8 %).

II.4.2 Description du dispositif de Langendorff

Ce dispositif de Langendorff permet de réussir un modèle d'I-R « *ex vivo* » sur un cœur de rat isolé et perfusé. Cette perfusion peut s'effectuer selon un mode de circulation ouvert ou fermé à une pression constante (73 mmHg). Le système (*f*) est utilisé afin de piéger les bulles d'air qui ne doivent absolument pas passer par le cœur. Une pompe péristaltique (*g*) (Minimuls 3. Gilson) assure un débit de pompage constant à partir du réservoir de la solution de perfusion KH (*d*) oxygéné (95% O₂, 5% CO₂), ayant un pH 7,4 et maintenue à 37 °C par un bain à circuit (*a*) muni d'un circulateur chauffant (Polystat, Fisher Scientific). Le cœur est relié au système par une canule aortique (*h*) permettant sa perfusion. Le cœur est abrité dans une cupule à double paroi (*i*) reliée à un deuxième système (*b*, *c*) permettant la circulation d'eau thermostatée à 37 °C assurant ainsi le chauffage du cœur et du liquide de perfusion.

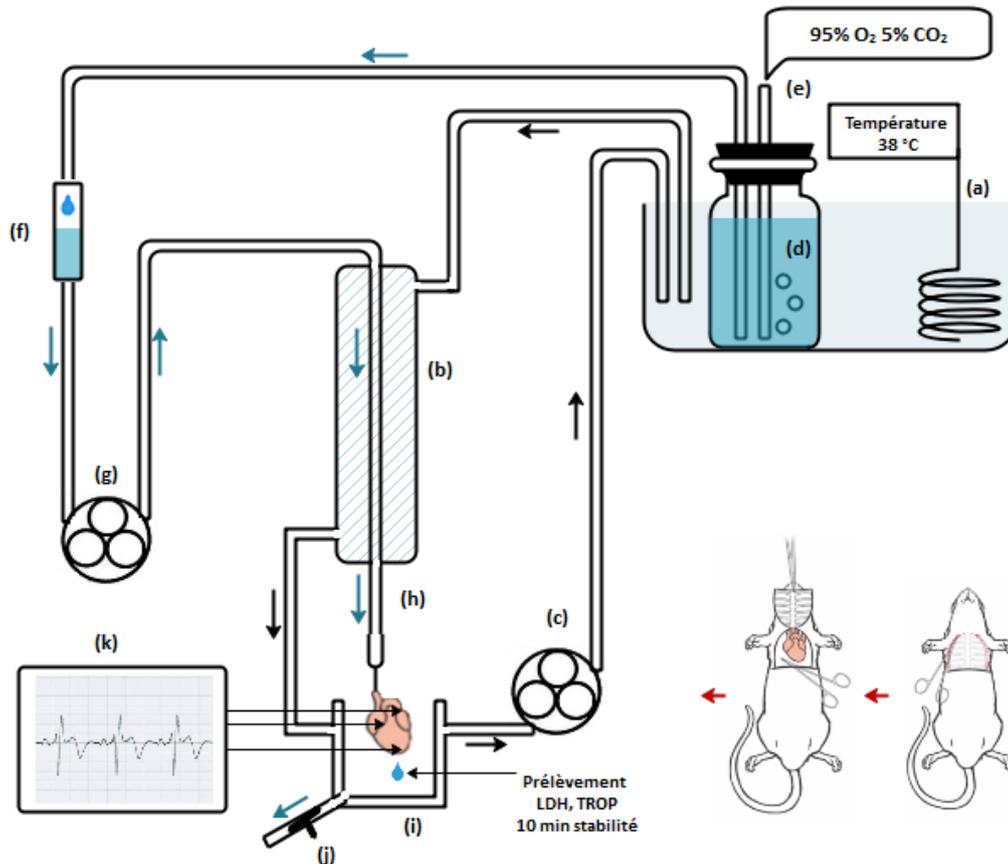


Figure 16: Dispositif du système de perfusion du cœur de rat isolé en mode Langendorff à circuit ouvert.

(a) : système de chauffage du montage et du perfusât. (b) : chambre chauffée. (c) : pompe péristaltique assurant le pompage de l'eau chauffée dans le dispositif. (d) : réservoir du perfusât. (e) : oxygénéateur. (f) : piègeur de bulles. (g) : pompe péristaltique assurant le pompage du perfusât vers le cœur. (h) : canule aortique. (i) : cupule chauffée contenant le cœur isolé. (j) : robinet assurant l'ouverture ou la fermeture du circuit de perfusion du cœur. (k) : système d'enregistrement de la fréquence cardiaque. (→ bleue) : sens de circulation du perfusât du cœur isolé. (→ noire) : sens de circulation de l'eau de chauffage du dispositif.

Le liquide de perfusion sortant du cœur par l'artère pulmonaire est recueilli dans la cupule qui est munie d'un robinet (j) permettant l'ouverture ou la fermeture du circuit de perfusion. Lors de la fermeture du circuit, le robinet est fermé et le tuyau d'alimentation du circuit de perfusion est déplacé vers la cupule qui recueillera le perfusât sortant du cœur et qui sera chauffé et oxygéné à son tour (Figure 17).

L'activité électrique du cœur est surveillée et enregistrée en continu à l'aide d'un système de capteurs (k) dont les électrodes sont fixées sur les ventricules et l'apex du cœur perfusé.

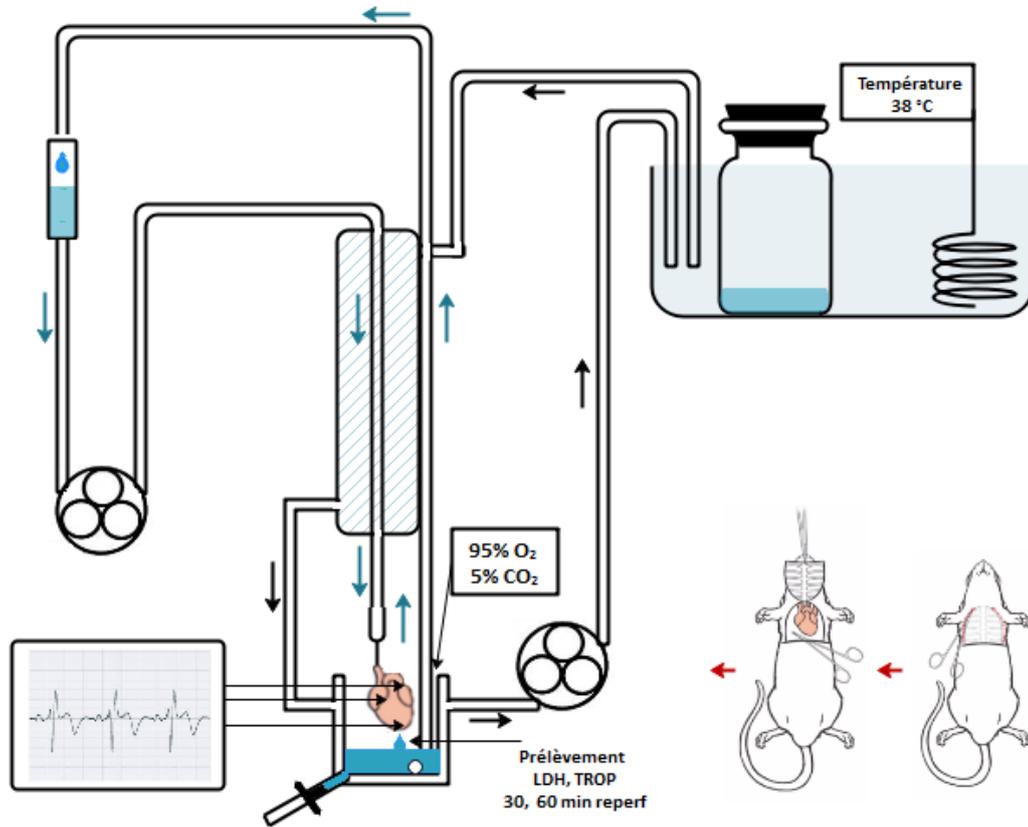


Figure 17: Dispositif du système de perfusion du cœur de rat isolé en mode Langendorff à circuit fermé.

II.4.3 Description du protocole d'ischémie-reperfusion normothermique *ex vivo*

Après une période de perfusion basale de 10 min où le circuit de perfusion est ouvert, le cœur est soumis à une ischémie globale de 30 minutes qui est réalisée par un arrêt total de la perfusion. A 20 minutes d'ischémie, le circuit de perfusion est fermé en utilisant un volume de 15 mL de la solution de Krebs pour la reperfusion (soit le volume moyen du sang d'un rat). La période de reperfusion en mode fermé est débutée en redémarrant la pompe péristaltique (g) pour une durée de 60 min.

Le protocole expérimental concernant l'I-R *ex vivo* sont détaillés comme suit (figure 18) :

Groupe Témoin (Sham) (n = 5) : après une perfusion de stabilité de 10 min à circuit ouvert, les cœurs restent perfusés mais à circuit fermé pendant 90 min ce qui correspond à la somme des périodes respectives d'ischémie (30 min) et de reperfusion (60 min). Les cœurs étaient perfusés par la solution de KH seule pH 7,4 à 37 °C.

Groupe Ischémie-reperfusion (I-R) (n = 5) : après une perfusion de stabilité de 10 min à circuit ouvert, les cœurs perfusés ont subi une ischémie normothermique de 30 min suivie de 60 min de reperfusion à circuit fermé. Les cœurs étaient perfusés par la solution de KH seule pH 7,4 à 37 °C.

Groupe de propolis (P) (n = 5) : après une perfusion basale de 10 min à circuit ouvert, les cœurs perfusés ont subi une ischémie de 30 min suivie de 60 min de reperfusion à circuit fermé. Les cœurs étaient perfusés par la solution de KH pH 7,4 à 37 °C supplémenté de propolis à la concentration de (50 µg/mL). Le traitement du cœur par la propolis était en période de stabilité (avant ischémie) et durant la reperfusion.

Groupe Véhicule éthanol (E) (n = 5) : Pour évaluer l'effet spécifique de l'éthanol, considéré comme véhicule solubilisant la propolis, les cœurs perfusés ont subi une ischémie normothermique de 30 min suivie de 60 min de reperfusion à circuit fermé. Les cœurs étaient perfusés par la solution de KH pH 7,4 à 37 °C supplémenté uniquement d'éthanol à 0,25 %.

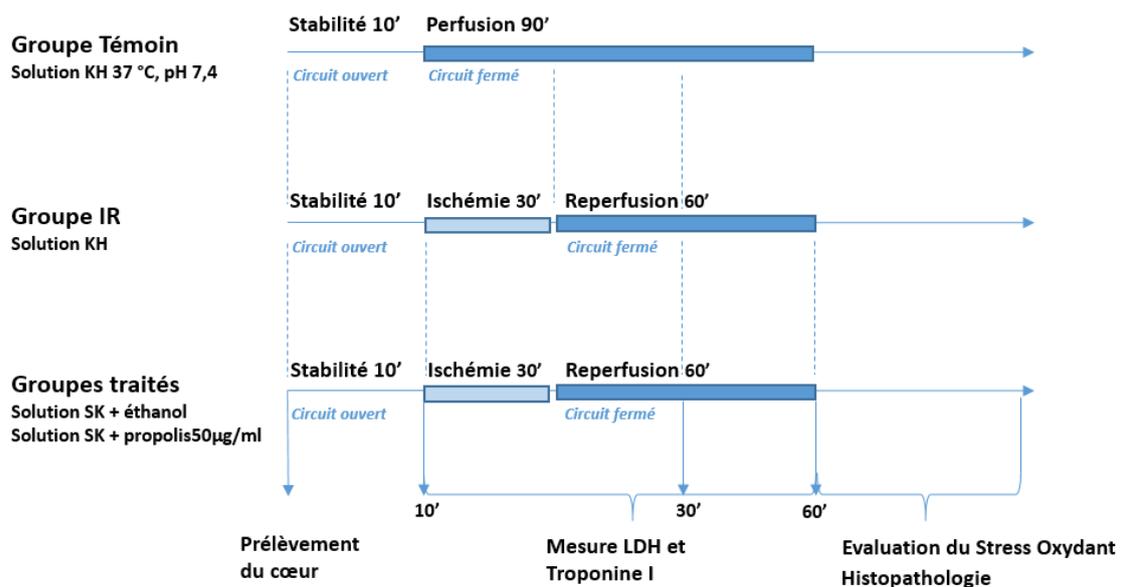


Figure 18: Description des différents groupes expérimentaux du modèle d'I-R.

II.5. Préparation de la fraction cytosolique

A la fin de la période de reperfusion, une partie du cœur au niveau de l'apex a été prélevée pour l'étude histopathologique. Le reste du tissu cardiaque a été pesé, coupés en petits morceaux, immergés dans trois volumes du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4 à 4 °C) contenant du KCl (1,17%), puis homogénéisé au moyen d'un homogénéiseur ULTRA-TURRAX (IKA T10, position 6).

Un volume de 0,5 mL d'acide trichloroacétique (TCA 5 %) est additionné au même volume de l'homogénat brut et centrifugé à 4 °C pendant 10 min à 4000 tpm. Le surnageant résultant est utilisé pour le dosage du glutathion réduit.

Le reste de l'homogénat brut a été centrifugés à 4 °C pendant 15 minutes à 4000 tpm. Une partie du surnageant a été utilisé pour le dosage du MDA cardiaque. Le reste du surnageant a été centrifugé à 4 °C pendant 45 min à 10000 tpm. Le surnageant résultant a été utilisé pour l'estimation de l'activité des enzymes antioxydantes.

II.6. Evaluation de la peroxydation lipidique

Le taux du malondialdéhyde (MDA), considéré comme un produit final de la peroxydation lipidique, a été mesuré selon la méthode colorimétrique d'Okhawa ([Okhawa et al., 1979](#)).

Le MDA contenu dans 0,5 mL du surnageant réagit avec 1 mL d'acide thiobarbiturique (TBA) (0,67 %) en présence de 0,5 mL d'acide trichloroacétique (TCA 20 %). Le mélange réactionnel a été incubé à 100 °C pendant 15 minutes puis refroidi. Le composé rose formé a été extrait par addition de 4 mL du n-butanol. La phase organique contenant le complexe formé entre MDA et TBA a été ensuite séparé par centrifugation à 3000 tpm pendant 15 min. Son absorbance a été mesurée à 532 nm (spectrophotomètre UV / visible Jenway 6305).

Le taux du MDA dans le tissu cardiaque sont exprimés en nmole de MDA/g de tissu cardiaque en utilisant une courbe d'étalonnage réalisé à partir du 1,1,3,3-tétraéthoxypropane qui lors de son hydrolyse acide libère du MDA.

II.7. Evaluation du statut antioxydant

II.7.1. Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) a été évaluée selon la méthode de Fridovich (Beauchamp et Fridovich, 1971). Cette méthode évalue la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitrobluetétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde qui est généré à partir de la photoréaction entre l'oxygène et la riboflavine donnant comme produit final le formazan qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 560 nm.

Un volume de 0,05 mL de la source enzymatique est ajouté à 2 mL de milieu réactionnel (pH 7,8) contenant du cyanure de sodium (NaCN 10 mM), du NBT (0,176 mM), de l'EDTA (66 mM), de la méthionine (10 mM) et de la riboflavine (2 µM). Ce mélange de solution a été exposé à une lampe de 15 W pendant 10 minutes pour induire la photoréaction entre la riboflavine et l'oxygène. La réduction du NBT en formazan a été mesurée par spectrophotométrie à 560 nm.

L'activité enzymatique a été exprimée en UI/mg de protéine/g de tissu. Elle est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$SOD \text{ (UI/mg prot)} = (\% \text{ d'inhibition} \times 6.35) / C \text{ protéines}$$

$$\% \text{ d'inhibition: } (DO_{\text{blanc}} - DO_{\text{test}} / DO_{\text{blanc}}) \times 100$$

C protéines : Concentration des protéines (mg/g de tissu).

II.7.2. Evaluation de l'activité de la catalase (CAT)

L'activité de la CAT a été mesurée selon la méthode de Clairborne qui est basée sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est suivie à 240 nm (Clairborne, 1985).

Dans une cuve en quartz, 0,025 µl du surnageant a été ajouté à 1 mL de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,2) et à 0,975 mL de solution de H₂O₂ (0,091 M) fraîchement préparé. L'absorbance a été mesurée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes.

L'activité enzymatique a été exprimée en UI/mg de protéine/g de tissu. Elle est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Activité de la CAT} = \left(\log \frac{A1}{A2} \times \Delta t \right) \times \frac{Fd}{\varepsilon \times L \times C \text{ protéines}}$$

A1 : Absorbance au temps 0 min.

A2 : Absorbance au temps 1 min.

Δt : intervalle de temps en minute.

Fd : Facteur de dilution (*Vt/Vs*) où *Vt* : Volume total de milieu réactionnel, *Vs* : Volume du surnageant.

ε : Coefficient d'extinction molaire du H₂O₂ (43.6 M⁻¹ cm⁻¹).

L : Longueur de la cuve utilisée (L = 1 cm).

C protéines : Concentration des protéines (mg/g de tissu).

II.7.3. Dosage du glutathion réduit (GSH)

La méthode d'Ellman a été adoptée pour l'évaluation du taux du glutathion cytosolique cardiaque (Ellman, 1959). Elle est basée sur l'oxydation du GSH par le l'acide 5,5-dithio-2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide 2-nitro 5-mercaptobenzoïque, qui à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm.

1,5 mL du tampon Tris (pH 8,2 ; 0,2 M préparé dans l'EDTA 0.02 M) est ajouté à 0.5 mL du surnageant. Puis, 0,1 mL de la solution de DTNB (0.01 M préparée dans du méthanol pur) est ajouté et le volume du mélange est complété à 10 mL par du méthanol. Après agitation et incubation pendant 15 min à température ambiante, le mélange est centrifugé à 3000 tpm pendant 15 min. La densité optique du surnageant est mesurée par spectrophotomètre à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'EDTA.

Le taux du GSH est calculé à partir d'une courbe étalon préparée par le GSH à des concentrations croissantes (de 0,2 à 1 mM). Les résultats sont exprimés par μmole/g de tissu.

II.7.4. Evaluation de l'activité de la glutathion S-transférase (GS-T)

L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase a été déterminée selon la méthode décrite par (Habig et al., 1974). Cette activité enzymatique est étudiée en cinétique. Le principe du dosage est basé sur une réaction de transfert du GSH sur le substrat de l'enzyme qui est le 1-Chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB). Ce transfert aboutit à la formation d'une nouvelle molécule le 1-(S-Glutathionyl) -2,4-dinitrobenzène qui absorbe la lumière à une longueur d'onde de 340 nm.

1,7 mL du tampon phosphate (0.1 M, pH 6.5) est ajouté à 100 µl de la solution de CDNB (20 Mm préparé dans l'éthanol). Après une incubation de 10 min à 37 °C, 100 µl de la solution de GSH (20 mM) est ajouté suivi de 100 µl de la source enzymatique. La densité optique est mesurée toutes les minutes durant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm. La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate remplaçant la source enzymatique.

L'activité enzymatique de la GS-T est exprimée en UI/mg de protéines/g de tissu. Elle est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Activité de la GST} = \left(\frac{\Delta DO \text{ essai} - \Delta DO \text{ blanc}}{\Delta t} \right) \times \frac{Fd}{\epsilon \times L \times C \text{ protéines}}$$

ΔDO : Différence de la densité optique entre le début et la fin de la réaction.

Δt : intervalle de temps en minute.

Fd : Facteur de dilution (Vt/Ve) où Vt : Volume total de milieu réactionnel, Vs : Volume du surnageant.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du CDNB ($9,6 \text{ nM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L : Longueur de la cuve utilisée ($L = 1 \text{ cm}$).

$C \text{ protéines}$: Concentration des protéines (mg/g de tissu).

II.7.5. Dosage des protéines

La teneur en protéines des échantillons du tissu cardiaque a été déterminée par la méthode de (Bradford, 1976). Cette méthode très sensible et très rapide, est basée sur l'adsorption d'un colorant, le bleu de Coomassie G250 aux protéines.

Un volume de 4 mL du réactif de Bradford est ajouté à 0,1 mL de chaque échantillon de surnageant. Après agitation suivie d'une incubation pendant 5 minutes, la densité optique du mélange réactionnel est lue à 590 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec de l'eau distillée.

La concentration en protéines est calculée à partir d'une courbe étalon préparée par l'albumine sérique bovine (BSA) à des concentrations croissantes (de 0,1 à 1 mg/mL). Les résultats sont exprimés par mg/mL.

II.8. Evaluation des paramètres biochimiques cardiaques

Certaines enzymes comme la lactate déshydrogénase (LDH) et la créatine phosphokinase (CPK) sont libérées normalement dans le sang à partir des cellules cardiaques à de faibles taux. Toutefois l'augmentation anormale de leurs niveaux peut être un indicateur fiable de lésions ou altérations cardiaques.

Quant à la libération de la troponine dans le sang, elle se produit en deux phases. La première consiste en une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui permet une libération des troponines libres, et la seconde consiste en une nécrose de la cellule, ce qui induit une libération des troponines liées (Mair, 1999).

Concernant l'étude d'I-R *ex vivo*, les prélèvements de la LDH et de la troponine I ont été effectués trois fois. D'abord à la fin des 10 min de stabilité ensuite à 30 min puis à 60 min de reperfusion. Le même volume de la solution de Krebs sortant directement du cœur perfusé est récupéré à chaque prélèvement.

La LDH a été évaluée dans la solution de perfusion en utilisant un kit commercial (spinreact, Espagne). Cette mesure enzymatique a été réalisée par un analyseur automatisé (SELECTRA PRO S).

La troponine I libérée dans la solution de perfusion a également été dosée par VIDAS troponine I haute sensibilité en utilisant la technique ELFA (*Enzyme-Linked Fluorescent Assay*).

II.9. Analyse histopathologique

Pour ce volet d'étude concernant l'I-R, des échantillons de cœurs appartenant aux rats des différents groupes expérimentaux ont été fixés dans du formaldéhyde 10 %, imprégnés puis inclus dans des blocs de paraffine. Après l'étape d'inclusion, des coupes de 5µm ont été réalisées puis colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E). La visualisation des éventuelles lésions affectant le tissu cardiaque a été réalisée en utilisant le microscope optique (Olympus C 41) muni d'un appareil photo intégré (Zoom 6 Méga pixel) permettant la numérisation des images des coupes histologiques agrandies quatre cent fois (400 x).

II.10. Analyse statistique

Toutes les données ont été exprimées en moyenne \pm S.E.M., l'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 5.01. Les différences entre les groupes ont été analysées à l'aide de l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie du *post-test* de comparaison multiple de Tukey. Pour interpréter statistiquement les différences entre les résultats des paramètres biochimiques à 10 min, à 30 min et à 60 min, l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) suivie du *post-test* de Bonferroni a été adopté. Un $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

Résultats et Interprétation

III. Résultats et interprétation

III.1. Dosage des polyphénols

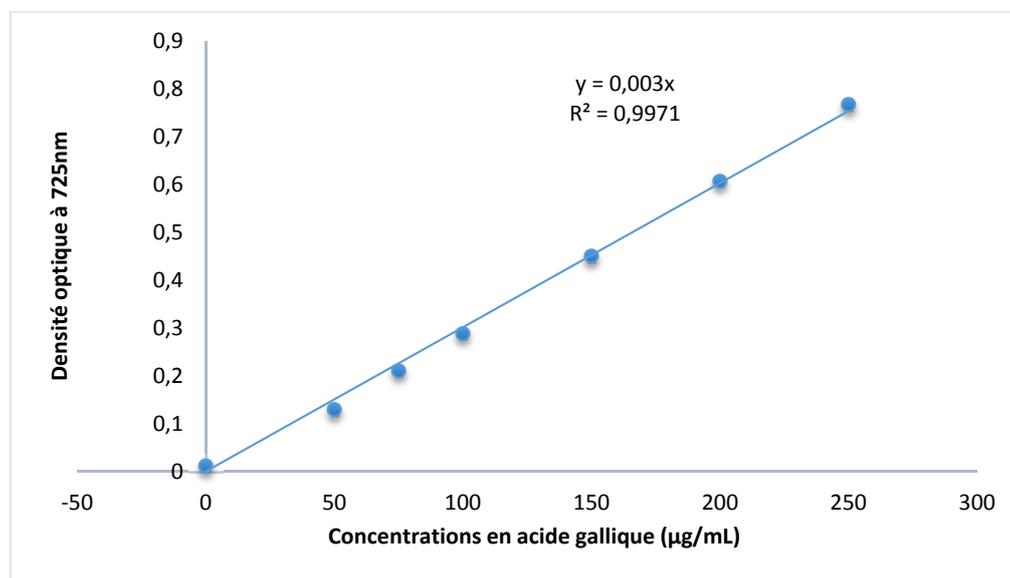


Figure 19: Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols à concentrations croissantes en acide gallique.

En utilisant la courbe d'étalonnage à des concentrations croissantes en acides gallique, la teneur de la propolis en polyphénols est de $228,09 \pm 16,23$ µg équivalent acide gallique/mg de propolis (figure 19).

III.2. Activité antioxydante *in vitro*

La figure 20 montre l'activité antioxydante de l'extrait de propolis déterminée par la méthode de piégeage du radical DPPH*. L'extrait de propolis a un effet piègeur minimal (10,96 %) aux concentrations 0,1, 1 et 10 µg/mL, cet effet est comparable à ceux de la quercétine et de la vitamine E (12,84 % et 8,67 % respectivement) utilisés comme antioxydants standards. De plus, l'activité antioxydante de l'extrait de propolis augmente de manière dépendante de la concentration jusqu'à atteindre 85,4 % à 0,25 mg/mL, contre 84,5 % à 0,1 mg/mL pour la quercétine et 77,4 % à 0,5 mg/mL pour la vitamine E. D'après ces données, l'extrait de propolis semble être plus efficace que la vitamine E ($p < 0,05$).

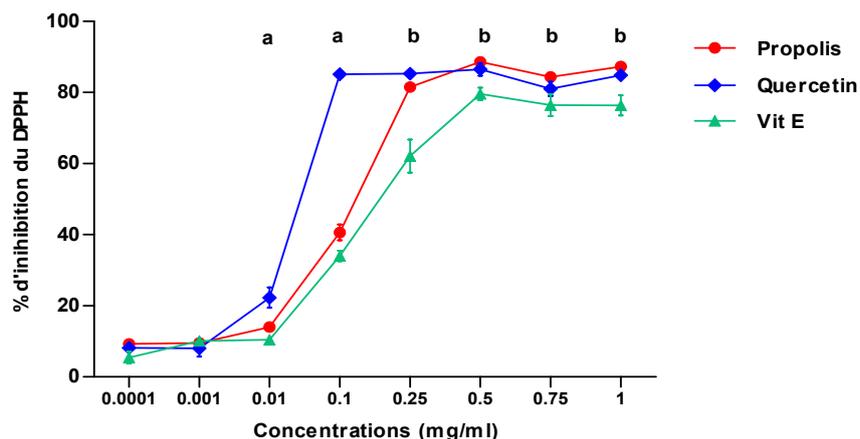


Figure 20: Activité de piégeage *in vitro* des radicaux libres par la propolis et par des antioxydants de référence à différentes concentrations.

L'activité de piégeage radicalaire est donnée en pourcentage de l'inhibition de la DPPH. Les valeurs sont en moyennes \pm S.E.M. de trois essais pour chaque concentration. **a** : la propolis est significativement différente de la quercétine, **b** : la propolis est significativement différente de la vitamine E (Analyse d'ANOVA suivie du test de comparaison multiple de Tukey).

Par ailleurs, la quantité d'extrait de propolis nécessaire pour l'inhibition de 50 % du DPPH' illustrée dans le tableau 2 (IC_{50}) était de $0,14 \pm 0,00$ mg/mL, ce qui est significativement plus élevé que la IC_{50} de la quercétine ($0,05 \pm 0,00$ mg/mL). Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée par rapport à la vitamine E qui a une IC_{50} ($0,18 \pm 0,03$ mg/mL).

Tableau 2: Valeurs des IC_{50} de la propolis et des antioxydants de référence.

Echantillon	Propolis	Quercétine	Vitamine E
IC_{50} (mg/mL)	$0,14 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$	$0,18 \pm 0,03$

III.3. Effet de la propolis sur la peroxydation lipidique induite par l'ischémie-reperfusion

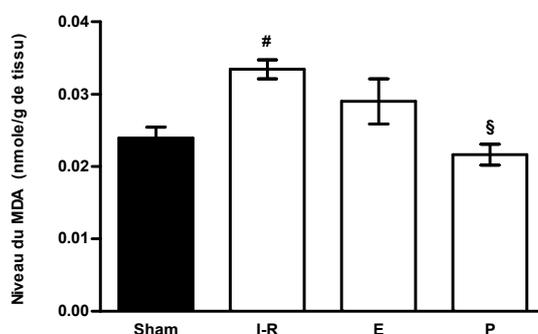


Figure 21: Effet de la supplémentation en propolis sur la peroxydation lipidique induite lors de l'I-R *ex vivo*.

Pour l'I-R, les cœurs perfusés *ex vivo* par la solution de KH ont subi une ischémie normothermique de 30 min suivie d'une reperfusion de 60 min. Les cœurs ischémiques ont été traités par la propolis (50 µg/mL (P)) et par l'éthanol (0,25% (E)) avant l'ischémie et pendant la reperfusion. Le groupe Sham a été soumis à 90 min de perfusion à circuit fermé. Chaque barre représente la moyenne ± S.E.M. de cinq rats. Les données ont été analysées par le test d'ANOVA à un facteur suivi du post-test Tukey (# : significativement différent du groupe Sham ; § : significativement différent du groupe I-R ; * : significativement différent du groupe E. $p < 0,05$).

Au regard des résultats illustrés dans la figure 21, l'ischémie-reperfusion a provoqué une augmentation significative du taux du MDA ($0,033 \pm 0,001$ nmole/g de tissu) par rapport au lot témoin ($0,023 \pm 0,001$ nmole/g de tissu) ce qui correspond à une augmentation de la peroxydation lipidique, signe de cardiotoxicité.

Cependant, la supplémentation du perfusât en propolis a réduit significativement la peroxydation lipidique en diminuant la formation du MDA durant l'I-R à $0,021 \pm 0,001$ nmole/g de tissu.

III.4. Evaluation du statut antioxydant

III.4.1. Restauration de l'activité de la SOD et de la CAT par la propolis

D'après la figure 22, il apparaît clairement que l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT diminue simultanément d'une façon significative ($p < 0,05$) chez le groupe I-R (6661

± 160 et $0,224 \pm 0,087$ UI/mg de protéines respectivement) comparé aux groupes témoins respectifs (8433 ± 232 et $0,736 \pm 0,118$ UI/mg de protéines).

Par ailleurs, la propolis supplémentée dans la solution de perfusion a rétabli significativement ($p < 0,05$) le niveau normal de l'activité de la SOD et de celle de la CAT avec des valeurs (8089 ± 80 et $0,520 \pm 0,054$ UI/mg de protéines) non significativement différentes de celles des lots témoins respectifs.

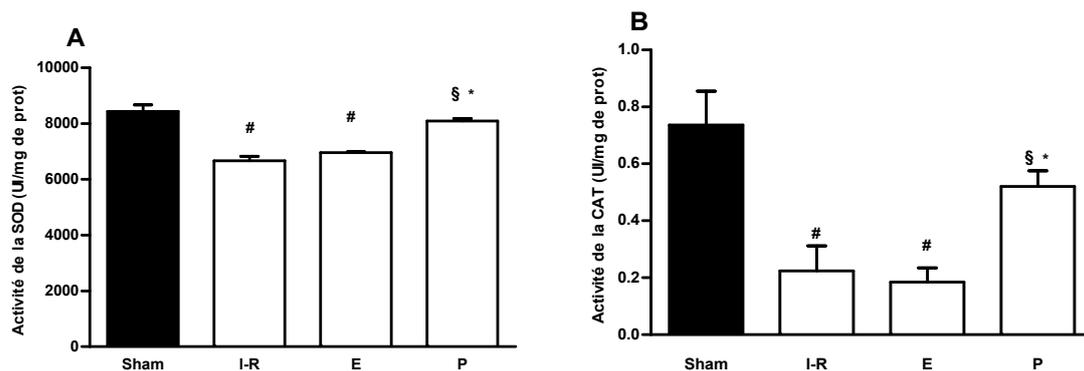


Figure 22: Effet de l'I-R et de la supplémentation en propolis sur l'activité de la superoxyde dismutase et de la catalase.

(A) superoxyde dismutase ; (B) catalase. Pour l'I-R, les cœurs perfusés ex vivo par la solution de KH ont subi une ischémie normothermique de 30 min suivie d'une reperfusion de 60 min. Les cœurs ischémiques ont été traités par la propolis (50 $\mu\text{g/mL}$ (P)) et par l'éthanol (0,25% (E)) avant l'ischémie et pendant la reperfusion. Le groupe Sham a été soumis à 90 min de perfusion à circuit fermé. Chaque barre représente la moyenne \pm S.E.M. de cinq rats. Les données ont été analysées par le test d'ANOVA à un facteur suivi du post-test de Tukey (# : significativement différent du groupe Sham ; § : significativement différent du groupe I-R ; * : significativement différent du groupe E. $p < 0,05$).

III.4.2. Restauration du taux de GSH et de l'activité de la GS-T par la propolis

D'après la figure 23A, on constate que suite à une ischémie de 30 min suivie d'une reperfusion de 60 min, le taux du glutathion réduit a diminué significativement ($0,60 \pm 0,20$ $\mu\text{mole/g}$ de tissu) comparé au groupe sham ($1,25 \pm 0,07$ $\mu\text{mole/g}$ de tissu). Cette déplétion est accompagnée par une augmentation significative de l'activité de la GS-T ($0,215 \pm 0,010$ contre $0,150 \pm 0,008$ UI/mg de protéine pour le groupe Sham) (figure 23B).

Le traitement des cœurs ischémisés puis reperfusés par la propolis a provoqué une augmentation non significative ($p > 0,05$) du taux de GSH ($0,84 \pm 0,03$ $\mu\text{mole/g}$ de tissu)

comparé au groupe I-R, cette valeur est également non significative par rapport au groupe Témoin (figure 23A). L'augmentation du taux de GSH est associée à la diminution de l'activité enzymatique de la GS-T ($0,150 \pm 0,008$ UI/mg de protéine) comparée au groupe I-R, ce qui correspond à une restauration de cette activité à une valeur qui n'est pas significativement différente de celle du groupe témoin (figure 23B).

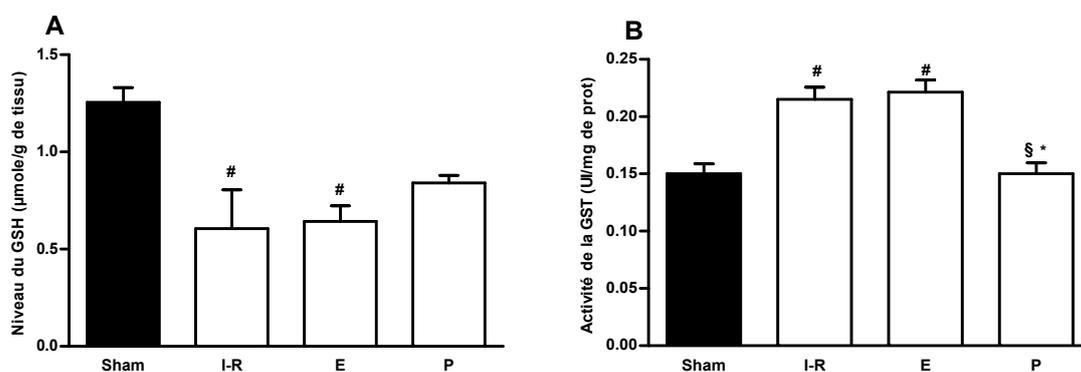


Figure 23: Effet de l'I-R et de la supplémentation en propolis sur le taux de glutathion réduit et l'activité de la glutathion-S-transférase.

(A) glutathion réduit ; (B) glutathion-S-transférase (B) Pour l'I-R, les cœurs perfusés ex vivo par la solution de KH ont subi une ischémie normothermique de 30 min suivie d'une reperfusion de 60 min. Les cœurs ischémiques ont été traités par la propolis ($50 \mu\text{g/mL}$ (P)) et par l'éthanol (0,25% (E)) avant l'ischémie et pendant la reperfusion. Le groupe Sham a été soumis à 90 min de perfusion à circuit fermé. Chaque barre représente la moyenne \pm S.E.M. de cinq rats. Les données ont été analysées avec le test d'ANOVA à un facteur suivi du post-test Tukey (# : significativement différent du groupe Sham ; § : significativement différent du groupe I-R ; * : significativement différent du groupe E. $p < 0,05$).

III.5. Protection de l'intégrité du tissu cardiaque par la propolis

Les résultats de la figure 24 montre que comparé à la période de stabilité, les paramètres biochimiques LDH et troponine-I libérés dans le perfusât augmentent significativement ($p > 0,05$) en période de reperfusion et ce en fonction du temps chez tous les lots, cette augmentation est plus accentuée dans le lot I-R (806 ± 60 à 30 min et 1260 ± 133 à 60 min contre 42 ± 8 UI/L pour la LDH et $5,07 \pm 1,06$ à 30 min et $7,69 \pm 1,18$ à 60 min contre $0,06 \pm 0,01$ UI/L pour la troponine-I) ce qui révèle une lésion myocardique. Cependant, l'activité de la LDH chez le lot propolis à 30 min de reperfusion ne montre pas une différence significative par rapport au lot témoin (157 ± 44 UI/L contre 52 ± 16 UI/L).

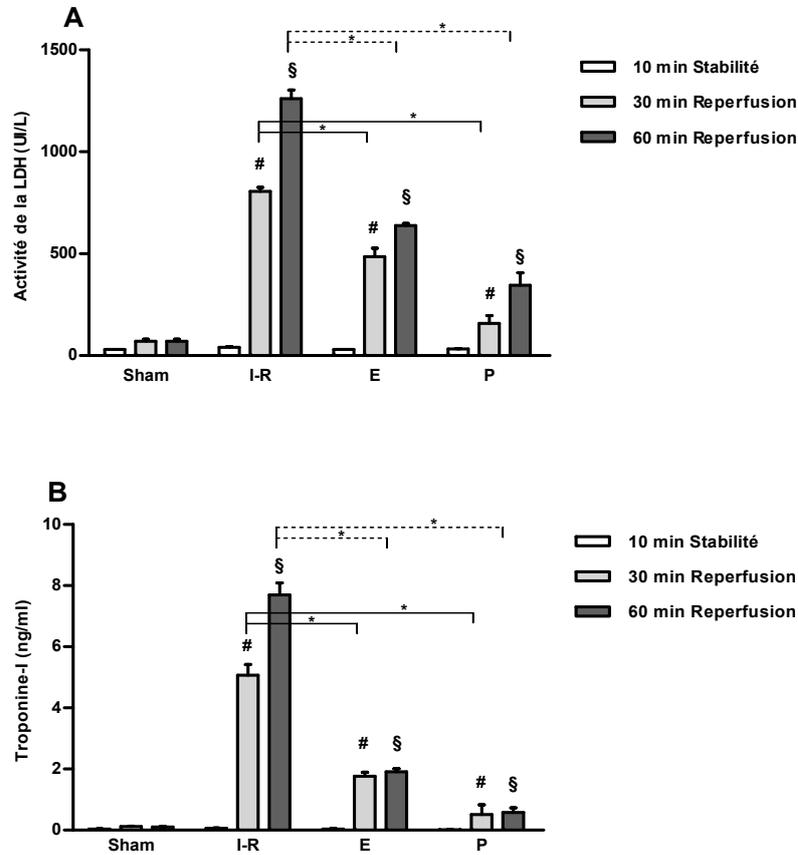


Figure 24: Effet de la propolis sur la lésion cardiaque induite par l'I-R chez le rat.

(A) lactate déshydrogénase, (B) troponine-I. Pour l'I-R, les cœurs perfusés ex vivo par la solution de KH ont subi une ischémie normothermique de 30 min suivie d'une reperfusion de 60 min. Les cœurs ischémiques ont été traités par la propolis (50 µg/mL (P)) et par l'éthanol (0,25% (E)) avant l'ischémie et pendant la reperfusion. Le groupe Sham a été soumis à 90 min de perfusion à circuit fermé. Les marqueurs biochimiques des lésions cardiaques ont été évalués dans la solution de perfusion à 10, 30 et 60 min. Chaque barre représente la moyenne ± S.E.M. de cinq rats. Les différences entre les résultats des paramètres biochimiques à 10 min, à 30 min et à 60 min ont été analysées par l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) suivie du post-test de Bonferroni (# : différence significative entre 10 min et 30 min de chaque lot. § : différence significative entre 10 min et 60 min). Les différences entre les groupes E et P par rapport au groupe I-R ont été analysées par le test d'ANOVA à un facteur suivi du post-test de Tukey (* $p < 0,05$).

Dans une deuxième comparaison faite avec le groupe I-R, la supplémentation du perfusât par la propolis à 50 µg/mL a diminué significativement le taux de la LDH et celui de la troponine-I à 30 min. Les pourcentages de réduction de ces paramètres étaient 80% et

90% respectivement. La même diminution a été observé à 60 min suite à l'addition de la propolis, les taux étaient 72 % pour la LDH et 92 % pour la troponine-I.

De ces résultats, il apparaît également que le traitement par l'éthanol a réduit significativement les taux de LDH et de la troponine-I par rapport au groupe I-R avec des taux respectifs de 39% et 49 % à 30 min et 65% et 75% à 60 min. Toutefois, la différence entre le groupe propolis et celui de l'éthanol est statistiquement significative ($p < 0,05$).

III.6. Etude histopathologique

L'examen histopathologique du tissu cardiaque de rat appartenant aux différents lots testés a confirmé les données biochimiques indiquées ci-dessus. L'histologiques au niveau des cœurs de rats témoins (tableau 3 Sham) montre des fibres musculaires cardiaques intactes bien arrangées et composées de cardiomyocytes ayant des noyaux centrés et allongés.

L'ischémie de 30 min suivi de reperfusion de 60 min (tableau 3 I-R) a provoqué des dommages considérables au tissu cardiaque caractérisés par une désorganisation des fibres musculaires (grande flèches), un œdème interstitiel (étoile) et plusieurs sites de nécrose (cercle).

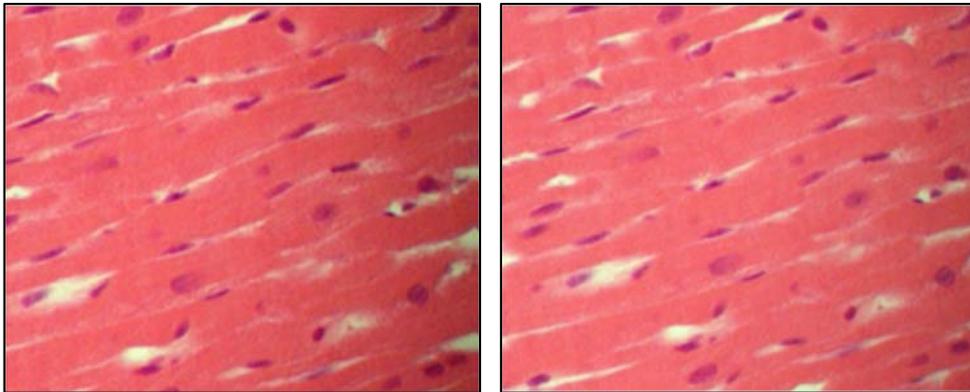
Les cœurs traités par à l'éthanol, considéré comme véhicule, présentent un meilleur aspect que celui de cœurs ischémiés puis reperfusés (tableau 3 E). Ceci est caractérisé par une légère perte d'arrangement myofibrillaire, un œdème interstitiel moins important et des zones nécrosés moins élargies.

Le traitement des cœurs ischémiés par la propolis présente un tableau histologique meilleur que celui des cœurs ayant subi une I-R et ceux étant traités par l'éthanol seul (tableau 3 P). Les cardiomyocytes ont une morphologie normale et les myofibrilles sont intactes. Bien que ces cœurs présentent de rares zones de nécrose focale, la propolis améliore nettement les altérations histopathologiques induites par l'I-R au niveau du tissu cardiaque. La propolis à la concentration de 50 µg/mL assure une bonne protection mais qui reste incomplète.

Tableau 3: Examen histologique des cœurs de rats ayant subi une I-R normothermique (30-60 min).

Micrographies représentatives du tissu cardiaque de rats soumis à une ischémie normothermique de 30 min suivie de reperfusion de 60 min, montrant la désorganisation des fibres myocardiques (grande flèche), l'œdème interstitiel (étoile) et des sites de nécroses (cercle) par rapport au tissu normal (Sham). Des coupes de tissu cardiaque des groupes éthanol (E) ont présenté des sites nécrosés moins élargis (cercle). Le traitement des tissus cardiaques exposés à une I-R et traités à la propolis (50 µm/mL (P)) a révélé une morphologie cardiaque presque intacte avec de rares zones de nécrose focale (coloration H & E 400 ×). Les deux photos histologiques de chaque lot, représentent deux prises différentes du même lot.

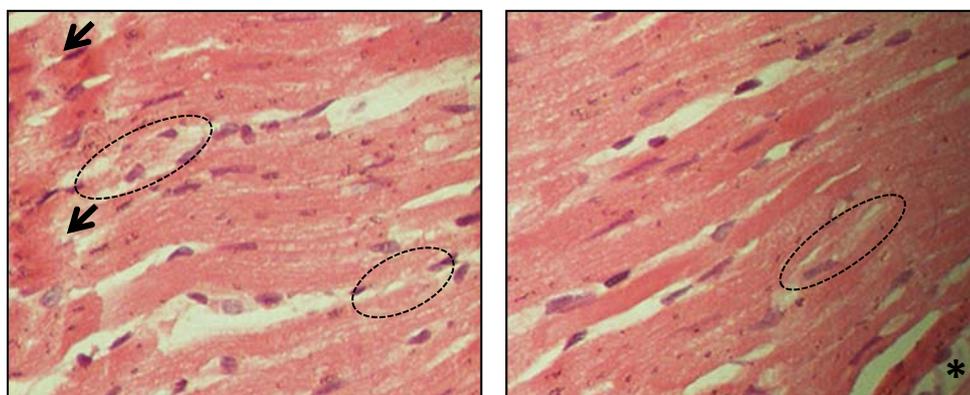
Ischémie-Reperfusion normothermique (30-60 min)



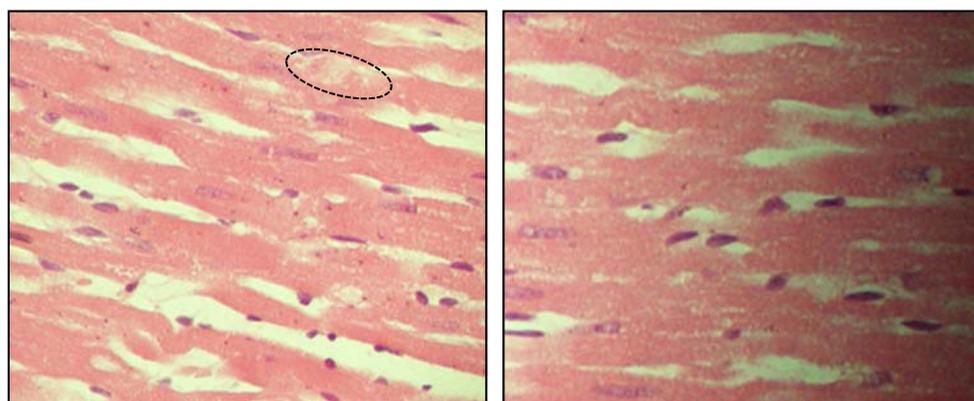
Sham



I-R



E



P

Discussion

IV. Discussion

La propolis est une matière résineuse recueillie par les abeilles à partir des bourgeons et des écorces des arbres. Notre résultat concernant la teneur de la propolis algérienne en polyphénols qui était de 228.09 ± 16.23 mg/g, est inférieure aux concentrations des propolis Brésiliennes verte, rouge et brune estimée à 315 ± 26 , 306 ± 29 et 344 ± 17 mg/g respectivement (Daleprane et Abdalla, 2013). Elle est également inférieure à la concentration de la propolis Chinoise qui est égale à $537,9 \pm 8,7$ mg/g (Wang et al., 2015). Cependant, notre propolis contient plus de polyphénols que celles de la Corée avec $212,7 \pm 7,4$ mg/g (Choi et al., 2006); de l'Argentine avec 187 mg/g (Bankova et al., 2000), de l'Inde avec $159,10 \pm 0,26$ mg/g (Laskar et al., 2010), du Portugal avec $151 \pm 0,01$ mg/g (Moreira et al., 2008), du Chypre avec $100,4 \pm 7,2$ mg/g (Kalogeropoulos et al., 2009) et enfin de la Thaïlande avec $31,2 \pm 0,7$ mg/g (Kumazawa et al., 2004).

Avec ses différents types (brune, rouge et verte), la propolis brune est la plus couramment étudiée et utilisée dans le monde. Elle montre un fort potentiel thérapeutique avec un large spectre d'activités biologiques (Daleprane et al., 2012). La composition phénolique de la propolis algérienne lui confère plusieurs propriétés pharmacologiques, la plus importante étant l'activité antioxydante (Ahn et al., 2007; Lahouel et al., 2011). L'essai de DPPH a montré que notre extrait de propolis possède une forte activité de piégeage d'oxydant avec une IC_{50} de $0,14 \pm 0,00$ mg/mL proche de celle de la quercétine et plus efficace que celle de la vitamine E. Cette capacité peut s'expliquer par la structure chimique des acides phénoliques et des flavonoïdes présents dans l'extrait, comme la pinocembrine, qui possède une capacité de donation d'hydrogène et forme un radical phénoxy stable (Rice-Evans, 2004). Cette activité antioxydante est moindre, comparée à l'activité antioxydante de la propolis brésilienne qui est de $0,036 \pm 0,001$ mg/mL et celle de la propolis chinoise étant $0,015 \pm 0,001$ (Wang et al., 2015). Ceci peut s'expliquer par la différence de composition de la propolis selon son origine géographique et la flore présente à la disposition des abeilles.

Il est bien établi que la propolis possède une forte activité antioxydante. En plus, la relation entre le stress oxydant et les maladies cardiovasculaires est évidente (Daleprane et Abdalla, 2013). Par conséquent, la propolis attire de plus en plus l'attention des chercheurs pour prévenir ou traiter différentes pathologies cardiaques. En effet, des études récentes ont

révélé l'effet protecteur de la propolis dans l'infarctus du myocarde induit par l'isoprotérénol (Aloutabi et al., 2017), ainsi que dans d'autres modèles de cardiotoxicité induite par le chlorure d'aluminium (Alqayim, 2015) et par la doxorubicine (Alyane et al., 2008). En outre, la propolis possède un effet protecteur limitant les lésions d'I-R dans différents organes en utilisant principalement leurs activités antioxydantes spécifiques (Testai et al., 2013; Yao et al., 2014 ; Lan et al., 2016). Une étude récente a révélé que la pinocembrine, un flavonoïde essentiel de la propolis, améliore les lésions ischémiques dans les accidents vasculaires cérébraux et protège contre les maladies cardiovasculaires (Lungkaphin et al., 2015; Saad et al., 2015). Elle a prouvé son efficacité contre les dommages provoqués suite à une I-R cérébrale et rénale (Shimazawa et al., 2005 ; da Costa et al., 2015 ; Bazmandegan et al., 2017).

Dans ce contexte, notre étude vient tester l'effet protecteur de l'extrait de la propolis algérienne au cours d'un épisode d'ischémie normothermique de 30 min suivie d'une reperfusion de 60 min sur un modèle *ex vivo* de cœur de rat perfusé.

Il est important de préciser que la solution de Krebs-Henseleit est une solution de perfusion ou de préservation extracellulaire (Chien et al., 2000), elle a une composition de base qui n'est pas spécifique à la perfusion cardiaque, elle est également dépourvue de molécules antioxydantes. Cette solution a été choisie dans notre étude car notre but était de tester l'effet protecteur et antioxydant de la propolis sans aucune interférence pouvant être causée par un autre antioxydant qui fait préalablement partie de la composition de la solution de perfusion pour le modèle *ex vivo* d'I-R ou de la solution de préservation concernant le modèle *in vitro* d'ischémie hypothermique.

En outre, l'éthanol a été choisi comme véhicule afin de solubiliser la propolis car elle a une faible solubilité dans l'eau pur. De nombreuses concentrations d'éthanol ont été testées pour solubiliser l'extrait de propolis et nous avons trouvé que 0,25 % est la concentration minimale suffisante pour solubiliser la propolis aux concentrations utilisées (50, 150 et 250 µg/mL). Cette faible concentration a été utilisée pour minimiser autant que possible l'effet cardioprotecteur de l'éthanol.

Les lésions du myocarde au cours de l'I-R seraient en grande partie dues au stress oxydant (Dhalla, 2000). Il a été démontré que les ERO peuvent avoir un effet négatif sur la

survie des cellules lors d'une I-R en raison des dommages oxydatifs causés à la membrane cellulaire, aux protéines et à l'ADN (Noeman et al., 2011).

Dans notre modèle d'I-R réalisée sur cœur perfusé de rat, le stress oxydant s'est bien manifesté par l'augmentation significative du taux du malondialdéhyde (MDA). Ce dernier est l'un des produits terminaux de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires. Son dosage par réaction à l'acide thiobarbiturique est accepté, en plus du 4-hydroxynonéal (4-HNE), comme indice de l'ampleur de la peroxydation lipidique (Strobel et al., 2011). La vulnérabilité des membranes lipidique à l'oxydation par les ERO est due à leur concentration élevée en acides gras insaturés (Kohen et Nyska, 2002). Cette augmentation de la peroxydation lipidique peut s'expliquer par le fait qu'après une ischémie de 30 min en conditions normothermique, la chaîne respiratoire mitochondriale, instable et défaillante, devient plus susceptible à produire des quantités excessives d'anion superoxyde qui est transformé en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier peut réagir, par la réaction de Haber-Weiss avec le fer pour former le radical hydroxyl hautement cytotoxique qui peut initier la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires. La peroxydation lipidique est d'autant plus intense dans le tissu cardiaque à cause de l'augmentation du substrat lipidique dans le myocarde (Park et al., 2007 ; Goldberg et al., 2012), ce qui peut servir de cible plus grande pour l'oxydation par les radicaux libres

D'après nos résultats, la peroxydation lipidique qui s'est produite pendant l'I-R entraîne une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire et provoque, par conséquent, sa rupture. Cette lyse cellulaire est confirmée par l'augmentation des activités de la lactate déshydrogénase et de la troponine-I dans le liquide de perfusion. Ces derniers sont considérés comme marqueurs de l'activité cardiaque et de l'intégrité tissulaire du cœur. En cas d'infarctus du myocarde, après la phase d'ischémie et de nécrose initiales, la reperfusion induit un endommagement sévère et prolongé des cardiomyocytes, la troponine I atteint son pic sérique de façon précoce (Mair, 1999).

En plus des paramètres biochimiques indiquant l'atteinte de l'intégrité cellulaire du cœur ayant subi une I-R, l'étude histopathologique a révélé que des dommages considérables au tissu cardiaque ont eu lieu avec une désorganisation des fibres musculaires, apparition d'œdème interstitiel ainsi que plusieurs sites de nécrose du tissu cardiaque. Le type de mort cellulaire, observé dans notre cas est la nécrose. Ceci n'indique en rien que l'apoptose n'a pas eu lieu.

Plusieurs études ont montré que l'I-R myocardique est associée à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques (Kajstura et al., 1996 ; Dong et al., 2011; Shi et al., 2013), et que la nécrose s'y produit également en fonction du statut énergétique de la cellule (Noeman et al., 2011).

Nos résultats concernant l'augmentation de la peroxydation lipidique et de la libération des marqueurs biochimiques cardiaques résultants des dommages histologique du tissu cardiaque corroborent avec les résultats d'études précédentes, qui ont révélé que l'ischémie globale normothermique de 20, 30 ou 45 min suivie de reperfusion de 30, 45, 60 ou 120 min sur cœur de rat isolé selon le modèle de Langendorff provoquait une augmentation des taux de MDA et de LDH reflétant un état de nécrose tissulaire (Florian et al., 2006 ; Qin et al., 2011) avec accroissement du risque d'infarctus du myocarde évalué par calcul de l'aire infarctée du cœur (Bak et al., 2006; Jiang et al., 2014). Il a été également montré que l'I-R réalisé *ex vivo* augmentait le taux des cellules apoptotiques au niveau du cœur en utilisant la technique de marquage TUNEL ou en évaluant l'expression des protéines proapoptotiques Bax, Bcl-2 et NF- κ Bp65 (Dong et al., 2011; Shi et al., 2013).

Par ailleurs, la cellule vivante est dotée de système enzymatique et non enzymatique de défense antioxydante. Les principales enzymes antioxydantes, notamment la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase, sont considérés, en plus du glutathion réduit, comme la première ligne de défense antioxydante contre les ERO, générées *in vivo* au cours du stress oxydant, empêchant ainsi les macromolécules biologiques d'être endommagés par les ERO (Sudheesh et al., 2010). La SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est réduit en eau et en oxygène par la CAT et la GPx limitant ainsi la formation des radicaux hydroxyls (Lin et al., 2007).

Le glutathion réduit (GSH) est également considéré comme effecteur indispensable dans la protection antioxydante de première ligne grâce à ses multiples fonctions dans la cellule. Il assure le piégeage direct des radicaux libres et des produits de peroxydation lipidique catalysés par les GSH peroxydases. Il protège les groupes thiols des protéines contre l'oxydation (Shan et al., 1990). Le glutathion sert également de coenzyme pour certaines enzymes telles que la GPx et comme substrat pour d'autres telles que les glutathion S-transférases (GS-T) (Moron et al., 1979).

La GS-T est considérée, entre autres, comme une deuxième ligne de protection cellulaire antioxydante. Elle catalyse la réaction de la conjugaison du GSH avec des composés électrophiles permettant leur métabolisation et leur excrétion par l'organisme et joue également un rôle de GS-T peroxydase. La GS-T est une enzyme qui protège la cellule contre les carbonyles, les époxydes et les hydroperoxydes α , β -insaturés hautement réactifs qui sont produits *in vivo* comme sous-produits d'oxydation des macromolécules durant un stress oxydant (Sudheesh et al., 2010). La capacité de la GS-T à réduire les hydroperoxydes lipidiques en leurs alcools respectifs est d'une importance biologique car, en présence de métaux de transition, les hydroperoxydes sont vulnérables à la conversion en radicaux peroxy, participant ainsi aux réactions de propagation de la peroxydation lipidique et conduisant à la décomposition de la membrane cytoplasmique. Il existe de bonnes preuves expérimentales que la GS-T peut agir *in vivo* pour inhiber ce processus (Hayes et McLellan, 1999).

Concernant nos résultats décrivant le statut antioxydant de la cellule cardiaque, l'I-R a induit une diminution significative de l'activité de la SOD et de la CAT ainsi qu'une déplétion significative du GSH réduit. Cependant l'activité de la GS-T a été significativement augmentée.

La raison possible du déclin de l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT s'explique par la génération excessive d'ERO par la chaîne respiratoire mitochondriale qui devient défaillante après la reperfusion des cellules ischémisées. Des preuves, utilisant un modèle animal génétiquement modifié, ont été présentées pour montrer l'importance de la CAT et de la SOD dans la protection du myocarde contre les lésions d'I-R (Chen et al., 1998; Woo et al., 1998). Bien que l'activité de la catalase dans le myocarde ait été signalée comme étant faible, de nombreuses études antérieures ont révélé son rôle important dans la protection du cœur contre l'I-R (Dhalla, 2000). En utilisant le 3-amino triazole, un inhibiteur de la catalase, il a été montré que 57% de l' H_2O_2 mitochondrial était inhibé par catalase dans des cœurs de rats isolés (Nohl et Jordan, 1980).

Nos résultats montrent également une corrélation négative entre les niveaux de MDA et les activités enzymatiques de la SOD et de la CAT. Ceci pourrait être due à la consommation rapide et à l'épuisement du stockage de ces enzymes pour lutter contre les radicaux libres générés excessivement au cours de la phase de reperfusion et provoquant une importante peroxydation lipidique. Il a été rapporté que le MDA dans l'étude de Noeman et al., que le

MDA peut établir une liaison croisée avec les enzymes SOD et CAT ce qui explique leur baisse d'activité (Noeman et al., 2011).

Par ailleurs, notre résultat de déplétion du GSH réduit en phase de reperfusion est expliquée par sa consommation tant par son piégeage direct des radicaux libres que par sa réparation des protéines oxydées ou par son implication dans les processus de conjugaison et de détoxification des peroxydes assurés par la GPx et la GS-T. Ces résultats suggèrent que le GSH réduit pourraient constituer une première ligne de défense contre le stress oxydant pendant l'I-R. Une étude a montré que les antioxydants hydrophiles tels que le glutathion, ont été diminués pendant 40 min de reperfusion, mais pas après l'ischémie. La formes oxydée du GSH (GSSG) a été nettement augmentées au cours de la reperfusion dans les cœurs de rats isolés (Haramaki et al., 1998).

Nos résultats de déclin des activités de la SOD, de la CAT et du taux du GSH dans le cœur ischémié concordent avec les données précédemment rapportées par Sudheesh et al., qui ont révélé une diminution des antioxydants dans le cœur ischémié après reperfusion et que ce changement dépendait de la gravité de l'ischémie-reperfusion (Sudheesh et al., 2010).

D'autre part, le changement affectant l'activité de la GS-T cardiaque suite à l'I-R ne semble pas suivre celui des autres enzymes antioxydantes SOD et CAT. Bien au contraire, nos résultats ont montré l'augmentation de son activité qui est positivement corrélée avec le taux du MDA, ce qui peut justifier l'augmentation de son activité, car la GS-T est extrêmement efficace pour conjuguer le GSH avec les hydroperoxydes et les aldéhydes toxiques issus de la peroxydation lipidique tels que le 4-hydroxynonéanal et le MDA (Hayes et McLellan, 1999). Notre résultat suggère que la GS-T n'a pas été épuisé comme l'ont été la SOD et la CAT et qu'elle représente un antioxydant enzymatique de seconde ligne de défense. En plus, il a été montré que la GS-T était activée *in vitro* et *in vivo* par les ERO générés de manière endogène ou pendant un état de stress oxydant (Aniya et Anders, 1989).

En effet, la sévérité des dommages ischémiques, le niveau du stress oxydant qui en résulte et l'interaction des antioxydants avec les ERO semblent déterminer l'efficacité des antioxydants pour la cardioprotection (Dhalla, 2000).

De nombreuses études indiquent qu'une augmentation du contenu cellulaire en GSH peut protéger contre les dommages ischémiques et ceux de la reperfusion. Abe et ses

collaborateurs ont rapporté que le prétraitement du cœur de rat avec de la N-acétylcystéine (NAC), un donneur du groupe sulfhydryl et stimule la production de glutathion, possède un effet cardioprotecteur contre les dommages induits par l'I-R. Cette cardioprotection était différente selon le mode d'administration. Il est nécessaire de maintenir la concentration sanguine au début de la reperfusion pour obtenir l'effet bénéfique du NAC (Abe et al., 2008).

Dans le même contexte, le traitement des cœurs perfusés par la propolis avant la phase d'ischémie et pendant la phase de reperfusion a réduit significativement le stress oxydant cardiaque par rapport aux cœurs ischémiés puis reperfusés. La diminution significative du taux du MDA et l'augmentation de la défense antioxydante assurée par la SOD, la CAT et le GSH réduit en témoigne.

Concernant la peroxydation lipidique, elle a été diminuée suite à l'ajout de la propolis dans la solution de perfusion. Ceci est reflétée par un taux de MDA significativement diminué par rapport aux cœurs ischémiés. Ce résultat explique le pouvoir antioxydant des substances phénoliques bioactives de la propolis qui assurent le piégeage des ERO susceptibles d'attaquer les lipides membranaires. En plus, la capacité des flavonoïdes à interagir avec la membrane cellulaire, de part leur liposolubilité, leur confère le pouvoir d'inhiber la chaîne de réactions en cascade de la peroxydation lipidique (Sajja et al., 1995).

Par conséquent, la propolis a préservé l'intégrité de la membrane cellulaire en diminuant remarquablement la libération des enzymes cardiaques LDH et troponine-I. L'analyse histologique a confirmé cet effet protecteur de la propolis par un aspect normal des cardiomyocytes malgré la présence de quelques zones de nécrose focale. La propolis, à la concentration de 50µg/mL, a limité considérablement les lésions cellulaires au niveau du myocarde et ce grâce à l'action directe de ses antioxydants. Cet effet protecteur est lié proportionnellement à la quantité des antioxydants présente dans l'extrait de propolis comme l'a montré le résultat de l'examen histopathologique dans la deuxième partie expérimentale. Donc, une augmentation de la dose de la propolis supplémenté au liquide de perfusion dans ce modèle d'ischémie pourrait avoir un meilleur effet de préservation du tissu cardiaque avec un aspect histologique complètement normal. Ceci est en ligne avec l'étude de Devi et al. qui montre que le traitement de cœurs perfusés de rat soumis à une ischémie de 20 min suivie de 40 min de reperfusion avec deux concentrations différentes 0,01 % et 0,05 % d'extrait aqueux de *Clerodendron colebrookianum* montre une protection des lésions tissulaires induites avec une nette amélioration à la plus grande concentration (Devi et al., 2005).

Par ailleurs, d'après nos résultats, la diminution du stress oxydant par la supplémentation de la propolis a également été observé par l'augmentation significative des activités enzymatiques de la SOD et de la CAT ainsi que l'élévation du taux de GSH réduit. Ces antioxydants enzymatiques et non enzymatique de première ligne ont été restauré à leurs valeur normale où aucune différence significative par rapport au cœurs perfusés n'a été remarquée. Ce résultat peut s'expliquer par l'action antioxydante des polyphénols contenus dans la propolis qui prévient la formation du MDA et qui protège les enzymes antioxydantes de l'éventuelle liaison croisée avec le MDA (Noeman et al., 2011). La propolis renforce l'activité antioxydante de la SOD et de la CAT. D'une autre part, Il est vrai que le taux du GSH a été rétablit par la propolis mais cette augmentation n'est pas significativement différente de celle observée dans le lot I-R. Ceci peut être expliqué par le manque de régénération de la forme réduite du GSH par la glutathion réductase ou que l'équilibre du rapport GSH/GSSG n'a pas été encore rétablit au bout de 60 min de reperfusion.

Nos résultats ont également montré une différence non significative de l'activité de la GS-T cardiaque par rapport aux cœurs perfusés avec une diminution significative comparés au cœurs ischémiés et reperfusés. Ce qui suggère un rétablissement de l'activité à sa valeur normale grâce à la capacité de la propolis à piéger les ERO limitant ainsi la peroxydation lipidique et réduisant de ce fait la formation du MDA et des hydroperoxydes conjugués par la GS-T. Cette explication est appuyée par la corrélation positive entre le taux du MDA et l'activité de la GS-T.

Nos résultats concernant le statut antioxydant après traitement par la propolis sont en ligne avec ceux observés dans l'étude de Jiang et al., et celle de Devi et al., ayant mis en évidence que l'extrait des flavonoïdes totaux de *Dracocephalum moldavica* L. et de l'extrait de feuille de *Clerodendron colebrookianum* protègent le cœur perfusé contre le stress oxydant induit par l'I-R, en atténuant la production de MDA, renforçant l'activité de la SOD et rétablissant le rapport GSH/GSSG (Devi et al., 2005; Jiang et al., 2014). Le même résultat a été observé dans l'étude de Florian et al., qui a utilisé les isoflavones osajine et pomiferine comme antioxydants (Florian et al., 2006).

D'autre part, dans les deux modèles d'ischémie cardiaque étudiés, l'éthanol a montré un effet protecteur mais qui n'est pas significatif. L'effet cardioprotecteur de l'éthanol est lié à la réduction de la peroxydation lipidique. En effet, dans la cellule, l'éthanol est principalement métabolisé par l'alcool déshydrogénase en acétaldéhyde qui est beaucoup

plus réactif et cytotoxique que l'éthanol lui-même. L'acétaldéhyde est ensuite métabolisé par l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale pour former de l'acétate et du NADH. Mais les myocytes cardiaques n'expriment pas l'alcool déshydrogénase et exprime l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH2). Cette ALDH2 mitochondriale joue un rôle cardioprotecteur important (Chen et al., 2008) . Le mécanisme de la cardioprotection induite par ALDH2 contre l'ischémie serait dû à la réduction de la formation d'aldéhydes cytotoxiques tels que le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) et le malondialdéhyde (MDA). De cette façon, la peroxydation lipidique est empêchée sur la membrane cardiaque, comme le montre une diminution du taux de MDA dans le groupe éthanol par rapport au groupe ischémie. Cette diminution est également observée dans la libération d'enzymes cardiaques telles que la LDH, qui dépend de l'intégrité de la membrane cellulaire.

Deuxième partie expérimentale

*Modèle in vitro d'ischémie cardiaque
hypothermique*

Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

I.1. Animaux et entretien

Concernant le deuxième volet de ce travail relatif à l'ischémie froide *in vitro*, il a été réalisé d'une part sur des souris albinos mâles pesant entre 25 et 40 g et provenant de l'Institut Pasteur d'Alger et d'une autre part sur des souris mâles C57BL6 pesant entre 21 et 26 g et provenant de Janvier (Le Genest-St-Isle, France).

Tous les animaux de laboratoire utilisés dans cette étude ont été logés dans des conditions environnementales constantes (température de 22-25 °C et une photopériode de 12 h/24 h) et ayant libre accès à l'eau et à la nourriture. Les expérimentations animales ont été menées conformément aux normes éthiques approuvées par la Directive du Conseil de la Communauté européenne (*European Community Council Directive*) du 24 novembre 1986 (86-609 / EEC) et le Décret du 20 octobre 1987 (87-848 / EEC).

I.2. Substance flavonoïdique : Propolis

Le même extrait éthanolique lyophilisé de la propolis a été utilisé pour ce deuxième volet d'étude.

II. Méthodes

II.1. Solubilisation de la propolis

La propolis a été préparée quotidiennement dans 15 mL de solution de Krebs-Hensleit (KH) à 4 °C, après avoir été dissoute dans une concentration finale de 0,25% d'éthanol.

II.2. Protocole expérimental de l'ischémie hypothermique *in vitro*

II.2.1 Sacrifice des souris

Pour ce volet d'étude, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Elles sont rapidement disposées en décubitus dorsal. Une incision abdominale puis thoracique a été réalisée. Les cœurs battants ont été rapidement excisés et plongés dans la solution de KH pH 7,4 à 4 °C et à laquelle une solution d'héparine (10 UI/mL) a été ajoutée afin d'éliminer le

sang pouvant rester à l'intérieur des cavités cardiaques. Afin d'améliorer le rinçage ; les cœurs ont été perfusés manuellement par la solution de KH froide héparinée à l'aide d'une seringue en suivant un débit de perfusion constant.

II.2.2 Description du modèle d'ischémie hypothermique *in vitro*

Les cœurs prélevés et rincés ont été préservé individuellement dans des petits pots de polyéthylène contenant chacun 15 mL de solution de KH (pH 7,4 ; 4 °C). La préservation a été effectuée à froid (4 °C) et a duré 8 et 24 h ce qui correspond à une période d'ischémie hypothermique statique courte et prolongée respectivement. La propolis a été supplémentée selon le protocole détaillé ci-dessous (figure 25) :

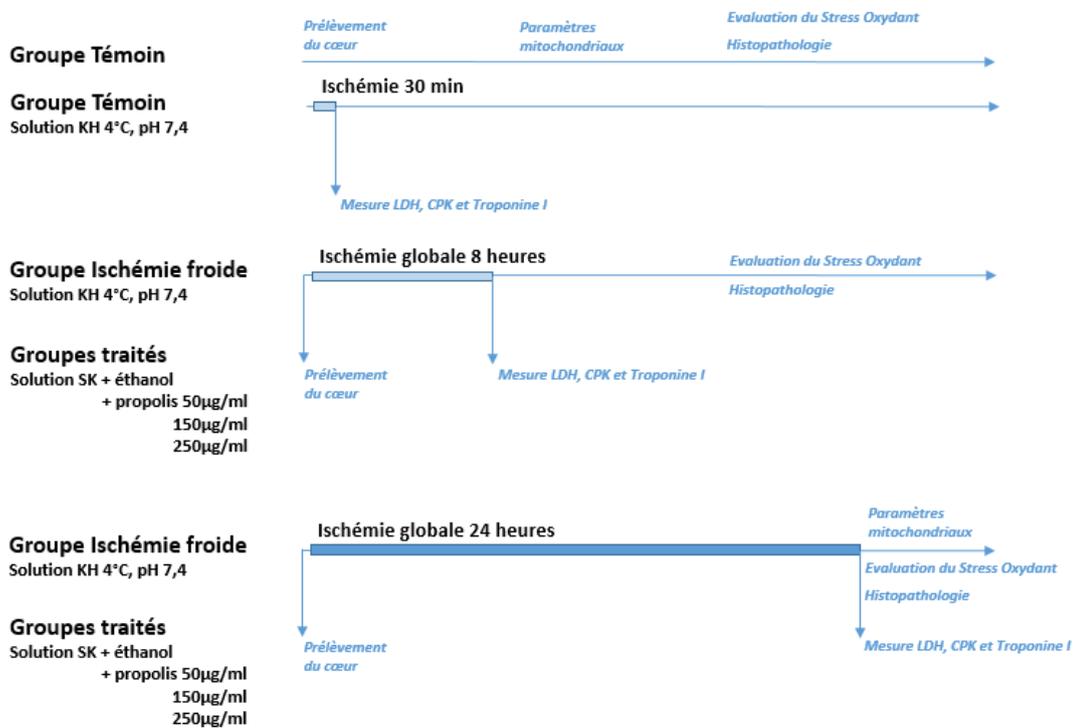


Figure 25: Description des différents groupes expérimentaux du modèle d'ischémie hypothermique

Groupe Témoin (Sham) (n = 16) : les cœurs ont été rapidement prélevés, rincés du sang avec du NaCl à 0,9%. Les biomarqueurs du stress oxydant ainsi que les paramètres mitochondriaux ont été évalués. Pour les biomarqueurs de l'intégrité cardiaque libérés des cœurs, une comparaison a été faite avec un groupe témoin, où les cœurs sont conservés brièvement pendant 30 minutes dans 15 mL de solution de KH à 4 °C.

Groupe Ischémique (ischémie) (n = 16) : les cœurs ont été soumis à 8 et 24 h de préservation hypothermique dans 15 mL de la solution de KH (pH 7,4, 4° C) non supplémentée en propolis.

Groupes de propolis (P1, P2 et P3) (n = 48) : les cœurs ont été préservés pendant 8 et 24 h dans 15 mL de la solution de KH (pH 7,4, 4° C) supplémentée de propolis à des concentrations croissantes (50, 150 et 250 µg/mL).

Groupe Véhicule éthanol (E) (n = 16) : Pour évaluer l'effet spécifique de l'éthanol, considéré comme véhicule solubilisant la propolis, les cœurs ont été préservés dans 15 mL de la solution de KH (pH 7,4, 4° C) supplémentée uniquement d'éthanol (0,25%).

II.3. Préparation de la fraction cytosolique

A la fin de la période d'ischémie hypothermique, des échantillons de tissus cardiaques ont été prélevés pour l'étude histopathologique.

Le reste du tissu cardiaque a été pesé, coupés en petits morceaux, immergés dans trois volumes du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4 à 4 °C) contenant du KCl (1,17 %), puis homogénéisé au moyen d'un homogénéiseur ULTRA-TURRAX (IKA T10, position 6).

Un volume de 0,5 mL d'acide trichloroacétique (TCA 5 %) est additionné au même volume de l'homogénat brut et centrifugé à 4 °C pendant 10 min à 4000 tpm. Le surnageant résultant est utilisé pour le dosage du glutathion réduit.

Le reste de l'homogénat brut a été centrifugés à 4 °C pendant 15 minutes à 4000 tpm. Une partie du surnageant a été utilisé pour le dosage du MDA et des produits avancés d'oxydation protéique cardiaques (AOPP). Le reste du surnageant a été centrifugé à 4 °C pendant 45 min à 10000 tpm. Le surnageant résultant a été utilisé pour l'estimation de l'activité des enzymes antioxydantes. La teneur du tissu cardiaque en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (cf page 63) ([Bradford, 1976](#)).

Pour l'évaluation des paramètres mitochondriaux l'homogénéisation des tissus cardiaques sera détaillée dans la section suivante

II.4. Détermination des dommages oxydatifs aux lipides et aux protéines

II.4.1. Evaluation de la peroxydation lipidique

Le taux du MDA au niveau du tissu cardiaque a été mesuré selon la méthode colorimétrique de (Ohkawa et al., 1979) (cf page 59).

II.4.2. Evaluation de l'oxydation protéique

Le niveau de l'oxydation des protéines au niveau du tissu cardiaque a été évalué en mesurant les produits avancés d'oxydation protéique (AOPP *Advanced Oxidation Protein Products*) quantifiés par une méthode spectrophotométrique décrite par (Witko-Sarsat et al., 1996).

0,2 mL du surnageant a été dilué dans le tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) et mélangé avec 0,1 mL d'iodure de potassium (1,16 M). Deux minutes plus tard, 0,2 mL d'acide acétique glacial a été ajouté et le mélange a été centrifugé à $3500 \times g$ pendant 15 minutes à 4 °C. L'absorbance de l'échantillon en dessous de la phase lipidique a été mesurée à 340 nm.

La teneur du tissu cardiaque en AOPP a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction et exprimée en nmole/mg de protéines. Elle est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Taux d'AOPP} = DO \times \frac{Fd}{\epsilon \times L \times C \text{ protéines}}$$

DO : Densité optique de l'échantillon à 340 nm.

Δt : intervalle de temps en minute.

Fd : Facteur de dilution (Vt/Ve) où **Vt** : Volume total de milieu réactionnel, **Vs** : Volume du surnageant.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire de l'AOPP (261 mM⁻¹ cm⁻¹).

L : Longueur de la cuve utilisée (L = 1 cm).

C protéines : Concentration des protéines (mg/g de tissu).

II.5. Evaluation du statut antioxydant

II.5.1. Evaluation de l'activité de la superoxyde dismutase

L'activité de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) a été évaluée selon la méthode de (Beauchamp et Fridovich, 1971) (cf page 60).

II.5.2. Evaluation de l'activité de la catalase (CAT)

L'activité de la CAT a été mesurée selon la méthode de (Clairborne, 1985) (cf page 60).

II.5.3. Dosage du glutathion

La méthode de (Ellman, 1959) a été adoptée pour l'évaluation du taux du glutathion cytosolique cardiaque (cf page 61).

II.5.4. Evaluation de l'activité de la Glutathion S-Transférase

L'activité enzymatique de la glutathion-S-transférase a été déterminée selon la méthode décrite par (Habig et al., 1974) (cf page 62).

II.6. Evaluation des paramètres mitochondriaux sur le modèle d'ischémie hypothermique

II.6.1. Isolement des mitochondries cardiaques

Le tissu des cœurs préservés dans la solution de KH (tissu de cœurs sains pour le groupe témoin) a été finement coupé sur une plaque froide en acier inoxydable (déposée sur un bac de glace) puis homogénéisé (homogénéisateur Polytron réglé à 1500 tpm) dans un tampon (4 °C, pH 7,4) contenant 220 mM mannitol, 70 mM saccharose, 10 mM Hepes, 1 mM EGTA et 30% d'albumine sérique bovine (BSA) libre d'acide gras.

L'échantillon a d'abord été centrifugé à 4 °C pendant 5 minutes à 3000 tpm (Sorvall RC-5C Plus), le surnageant a été ensuite centrifugé à 10 000 tpm pendant 10 minutes. Le culot contenant les mitochondries a été finalement mis en suspension dans le tampon d'homogénéisation duquel l'EGTA et la BSA ont été éliminés. La suspension mitochondriale a été conservée dans la glace jusqu'à ce que les paramètres mitochondriaux

soient testés. Les concentrations en protéines ont été déterminées par le réactif de dosage *Advanced Protein* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

II.6.2. Respiration mitochondriale

La mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène est réalisée immédiatement après l'isolement des mitochondries à l'aide d'une chambre hermétique équipée d'une micro-électrode à oxygène de Clark calibrée (Oxygraph, Hansatech EUROSEP instruments/ Logiciel Oxyg32) (Woodman et al., 2014). La mesure de la consommation d'oxygène est réalisée à 30 °C sous agitation.

Le calibrage de l'électrode est réalisé avec une solution d'eau distillée laissée à l'air ambiant, correspondant à notre concentration maximum en oxygène. La valeur 0 est obtenue en utilisant une solution d'eau distillée bullée à l'azote pour éliminer l'oxygène présent.

Dans un volume total de 500 µl, le tampon de respiration (50 mM saccharose, 100 mM KCl, 10 mM Hepes, 5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) est mis dans la cuve, les mitochondries sont ensuite ajoutées (0,2 mg de protéines/mL). 2,5 µl de glutamate/malate (G/M 1 M, substrats du complexe I) est ajouté afin d'initier la respiration des mitochondries par activation de la chaîne respiratoire (stade 2 ou V₂). La cuve est fermée et l'enregistrement de la mesure de la consommation d'oxygène est entamée.

Au bout d'une minute, la consommation d'oxygène est accélérée par ajout de 2,5 µl d'ADP (0,2 M) dans la cuve à l'aide d'une seringue (Hamilton) afin de provoquer la synthèse d'ATP (stade 3 ou V₃). Après 2 à 3 min, 1 µl de carboxyatractyloside (CATR 1 mM, inhibiteur de la ADP/ATP translocase) est ajouté pour stopper la consommation d'ADP et la synthèse d'ATP, la vitesse de consommation d'oxygène est réduite et devient équivalente à celle du stade 2 (stade 4 ou V₄) (figure 26).

Cette consommation d'oxygène est exprimée en nmoles d'O₂/min/mg de protéines mitochondriales. Le coefficient respiratoire (CR ou RCR *respiratory control ratio*) qui correspond au couplage entre la consommation en oxygène et la synthèse d'ATP par la mitochondrie est calculé. Il est défini comme le rapport stade 3/stade 4 (V₃/V₄). Un bon état de fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est témoigné par une valeur importante de ce CR.

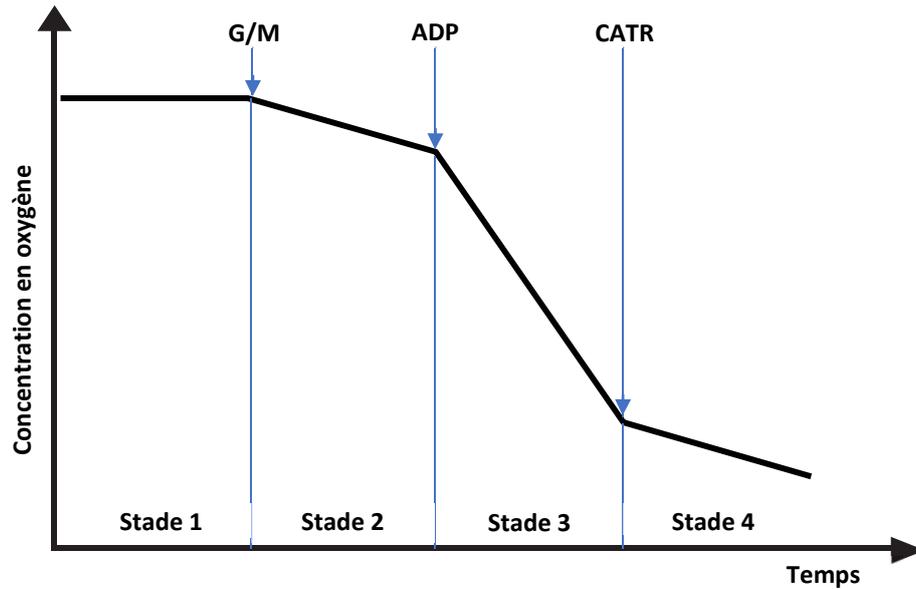


Figure 26: Représentation schématique des stades de respiration en fonction du temps.

La respiration mitochondriale est initiée par l'ajout de glutamate/malate (G/M) (passage de de stade 1 à 2) puis elle est accélérée par l'ajout de l'adénosine diphosphate (ADP) permettant la synthèse d'ATP (stade 3). Cette synthèse est stoppée et la consommation en oxygène est ralentie (stade 4) par l'ajout de carboxyatractyloside (CATR). Le coefficient respiratoire (CR) est le rapport de la consommation mitochondriale en oxygène entre le stade 3 et le stade 4.

II.6.3. Capacité de rétention du calcium (Pulse calcique)

La capacité de rétention calcique mitochondriale (CRC) est définie comme la quantité de calcium nécessaire à l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm) après additions successives et régulières de calcium (Woodman et al., 2014).

Les mouvements du calcium dans le milieu extramitochondrial sont visualisés à l'aide d'une sonde « calcium green » qui émet de la fluorescence en présence de calcium. La libération massive du calcium par les mitochondries marque l'ouverture du PTPm. La CRC est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Perkin-Elmer SA LS50B longueur d'onde d'excitation 506 nm, longueur d'onde d'émission 532 nm) thermostaté et muni d'un agitateur électromagnétique.

Dans un volume total de 300 μ l, le tampon de respiration (50 mM saccharose, 100 mM KCl, 10 mM Hepes, 5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) est mis dans la cuve en quartz, 1 μ l de Ca^{2+}

green (0.5 mM). Les mitochondries sont ensuite introduites dans la cuve (0,8 mg de protéines/mL). L'enregistrement de la mesure est alors initié.

Après 50 secondes d'enregistrement 1 μl de G/M (1 M) est ajouté. A la fin de cette période de pré-incubation (100 secondes) la suspension reçoit un pulse de 1 μl de CaCl_2 (3mM) toutes les 30 à 60 secondes, cette injection de Ca^{2+} est associée à un enregistrement d'un pic de fluorescence dans le milieu extramitochondrial. Le calcium est rapidement capté par les mitochondries, ce qui se traduit par un retour rapide de la fluorescence au niveau basal. Après une surcharge calcique suffisante, la fluorescence augmente rapidement ce qui indique un relargage massif et irréversible de Ca^{2+} par les mitochondries dû à l'ouverture du PTPm.

La quantité de Ca^{2+} nécessaire pour obtenir cette transition de perméabilité mitochondriale (CRC), exprimée en nmole CaCl_2/mg de protéines, est utilisée comme indicateur de la susceptibilité d'ouverture du PTP lors d'une surcharge calcique.

La figure 27 montre un exemple de l'enregistrement de la CRC par des mitochondries saines.

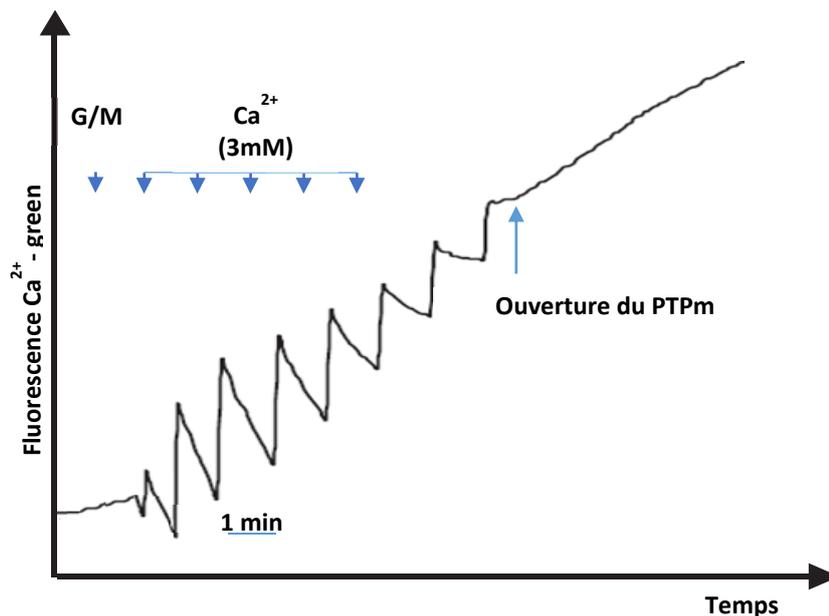


Figure 27: Courbe typique de mesure de la capacité de rétention calcique des mitochondries (CRC).

Une augmentation de la fluorescence est enregistrée après chaque administration de 3 mM de CaCl_2 . Le Ca^{2+} est immédiatement capté par les mitochondries, avec un retour de la fluorescence vers la ligne de base. Après une surcharge calcique suffisante, on assiste à une libération massive de calcium par les mitochondries et une augmentation de la fluorescence correspondant à l'ouverture du pore de transition de perméabilité.

II.6.4. Mesure de la production des ERO

La mesure d' H_2O_2 extramitochondrial est admise comme un indicateur de la production mitochondriale d'ERO. Les radicaux O_2^\cdot produits par la chaîne de transfert des électrons sont immédiatement convertis en H_2O_2 sous l'effet de la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD) et deviennent rapidement indétectables. Les molécules d' H_2O_2 ont la capacité de traverser la membrane mitochondriale et servent ainsi d'indicateur stoechiométrique de la production de ROS mitochondriaux.

La détermination de la production d'ERO (génération de H_2O_2) est basée sur l'oxydation de la N-acétyl-3,7-dihydroxyphénoxazine (Amplex Red) par du H_2O_2 en présence de la Peroxydase de Raifort (*Horse Radish peroxidase HRP*), qui génère de la résorufine, un produit fortement fluorescent ([Mohanty et al., 1997](#) ; [Lo Iacono et al., 2011](#)).

1 μl d'Amplex red (5 mM) et 1 μl d'HRP (500 U / mL) ont été ajoutés aux tampon de respiration (50 mM saccharose, 100 mM KCl, 10 mM Hepes, 5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4). Pour un volume total de 500 μl , les mitochondries fraîchement isolées (0,2 mg / mL de protéines) sont ensuite introduites et maintenues à 30 °C. l'enregistrement de la fluorescence est alors entamé. Après addition de substrat respiratoire (G/M ou succinate, 1 M), les mitochondries génèrent du superoxyde qui est converti de manière endogène en H_2O_2 .

L'augmentation de la fluorescence correspondant à l'élévation de la production de H_2O_2 qui a été suivie au cours du temps en utilisant un spectromètre à fluorescence (Perkin-Elmer SA LS 50B, longueur d'onde d'excitation 563 nm, longueur d'onde d'émission 587 nm).

Le système de données FLWin Lab (Perkin-Elmer) a été utilisé pour estimer $\Delta\text{H}_2\text{O}_2$ en présence ou en absence de 1 μl de roténone ou d'antimycine (1 mM, inhibiteurs des complexes mitochondriaux I et III respectivement) en mesurant la pente de la courbe de fluorescence. Les résultats sont exprimés en nmole/min/mg de protéines mitochondriales.

La figure 28 montre un exemple de l'enregistrement de la production de H_2O_2 par des mitochondries sham.

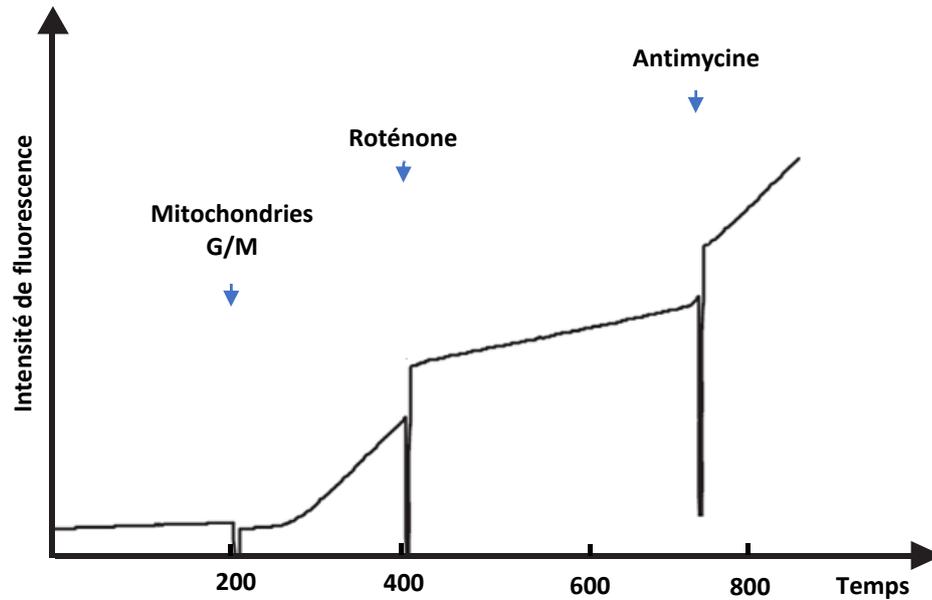


Figure 28: Exemple typique d'enregistrement de la production de H_2O_2 par les mitochondries.

L'augmentation de l'intensité de fluorescence après l'ajout des mitochondries indique une production d' H_2O_2 par les mitochondries en présence de G/M ou de succinate. Après l'ajout de la roténone (1 mM), le flux inverse d'électrons vers le complexe I de la chaîne respiratoire est inhibé. Par conséquent, la production d' H_2O_2 diminue, ce qui est détecté ici par une moindre intensité de fluorescence. Après l'ajout de l'antimycine (1 mM), le complexe III est inhibé résultant d'une production massive d' H_2O_2 détectée ici par une intensité de fluorescence plus importante.

II.7. Evaluation des paramètres biochimiques cardiaques

Après 8 et 24 heures d'ischémie hypothermique, l'activité de la LDH et la CPK ont été évaluées dans la solution de conservation en utilisant des kits commerciaux (spinreact et bioSystems, Espagne). Cette mesure enzymatique a été réalisée par un analyseur automatisé (SELECTRA PRO S).

La troponine I libérée dans la solution de conservation a également été dosée dans la solution de préservation par VIDAS troponine I haute sensibilité en utilisant la technique ELFA (*Enzyme-Linked Fluorescent Assay*).

II.8. Analyse histopathologique

Des échantillons de cœurs de souris appartenant aux différents lots expérimentaux ont été fixés dans du formaldéhyde 10 %. Après l'étape d'inclusion des coupes de $5\mu m$ ont été

colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E) puis observées en utilisant le microscope optique (Olympus C 41) muni d'un appareil photo intégré (Zoom 6 Méga pixel) permettant la numérisation des images des coupes histologiques agrandies quatre cent fois (400 x).

II.9. Analyse statistique

Toutes les données ont été exprimées en moyenne \pm S.E.M., l'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism 5.01. Les différences entre les groupes ont été analysées à l'aide de l'analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie des tests de comparaison multiple de Tukey. Un $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

Résultats et Interprétation

III. Résultats

III.1. Protection du cœur ischémique des dommages oxydatifs par la propolis

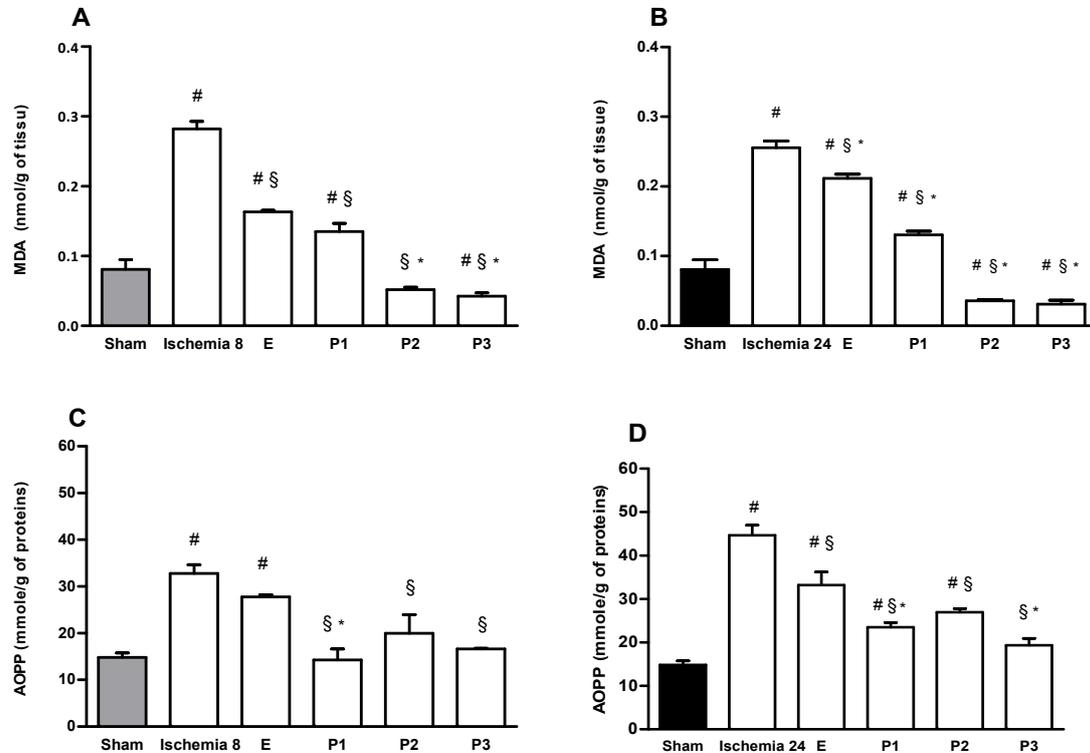


Figure 29: Effet de la supplémentation en propolis sur l'oxydation des lipides et des protéines lors d'une ischémie hypothermique.

(A), (B) oxydation de lipides ; (C), (D) oxydation des protéines. Pour l'ischémie hypothermique, les cœurs ont été conservés dans la solution de KH à 4 °C pendant 8 et 24 h. Les cœurs ischémiques ont été traités avec des concentrations croissantes de propolis (50 (P1), 150 (P2), 250 (P3) µg/mL) et d'éthanol (E) 0,25% comme véhicule. Le groupe Sham n'a pas été soumis à une ischémie hypothermique prolongée. Chaque barre représente la moyenne ± S.E.M. de cinq souris. Les données ont été analysées par le test d'ANOVA à un facteur suivi du post-test de Tukey (# : significativement différent du groupe Sham ; § : significativement différent du groupe I-R ; * : significativement différent du groupe E. $p < 0,05$).

La cardiotoxicité induite par l'ischémie froide prolongée a été confirmée par une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'oxydation des lipides et des protéines du myocarde (figure 29). En effet, les taux de MDA et d'AOPP à 8 et 24 h d'ischémie étaient respectivement de $0,282 \pm 0,010$ et $0,255 \pm 0,010$ nmole/g de tissu cardiaque et de $32,79 \pm 1,87$ et $44,67 \pm 2,31$ mmole/g de protéines, contre $0,081 \pm 0,014$ nmole/g de tissu cardiaque et $14,85 \pm 0,92$ mmole/g de protéines du groupe sham.

Cependant, la supplémentation de la solution de conservation en propolis aux trois concentrations testées a empêché significativement ($p < 0,05$) l'augmentation de la formation de MDA dans le cas de 8 h d'ischémie ($0,135 \pm 0,011$, $0,051 \pm 0,003$ et $0,042 \pm 0,005$ nmole/g de tissu cardiaque) (figure 29A) et dans le cas de 24 h d'ischémie ($0,130 \pm 0,005$, $0,036 \pm 0,002$ et $0,031 \pm 0,006$ nmole/g de tissu cardiaque) (figure 29B). Il est à noter que le taux de MDA observé en présence des deux concentrations les plus élevées de propolis était plus faible que dans les cœurs sains (sham).

De même, la teneur en AOPP dans les trois groupes de propolis a diminué significativement ($p < 0,05$) par rapport au groupe ischémie et la meilleure valeur réduite ($16,65 \pm 0,15$ mmole/g de protéine dans le cas de 8 h d'ischémie et $19,39 \pm 1,51$ mmole/g de protéine dans le cas de 24 h d'ischémie) a été obtenue avec la plus forte concentration (P₃) de propolis qui n'a montré aucune différence significative par rapport au groupe sham (figure 29C et D).

III.2. Restauration de l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT par la propolis

Comparativement au groupe témoin, il apparaît clairement que les activités enzymatiques de la SOD et de la CAT augmentent significativement ($p < 0,05$) après 24 heures d'ischémie hypothermique de $313,2 \pm 4,8$ et $0,0126 \pm 0,0004$ UI/mg de protéine à $518,3 \pm 56,2$ et $0,0255 \pm 0,0046$ UI/mg de protéine, respectivement (figure 30 B, D). Dans le cas de 8 h d'ischémie (figure 30 A, C), l'augmentation des activités enzymatiques SOD et CAT a été également observée mais elle n'est significative que pour la CAT ($0,0147 \pm 0,0030$ UI/mg de protéine contre la valeur du groupe sham qui est de $0,0126 \pm 0,0004$ UI/mg de protéine).

Par ailleurs, les trois concentrations supplémentées de propolis ont rétabli significativement ($p < 0,05$) le niveau normal d'activité de SOD et de CAT, constaté chez le groupe sham pour les deux périodes d'ischémies hypothermique ($428,3 \pm 25,51$ et $351,6 \pm 28,28$ UI/mg de protéine correspondant à l'activité de la SOD à 8 et 24 h respectivement et $0,0049 \pm 0,0006$ et $0,0053 \pm 0,0056$ UI/mg de protéine correspondant respectivement à l'activité de la CAT à 8 et 24 h).

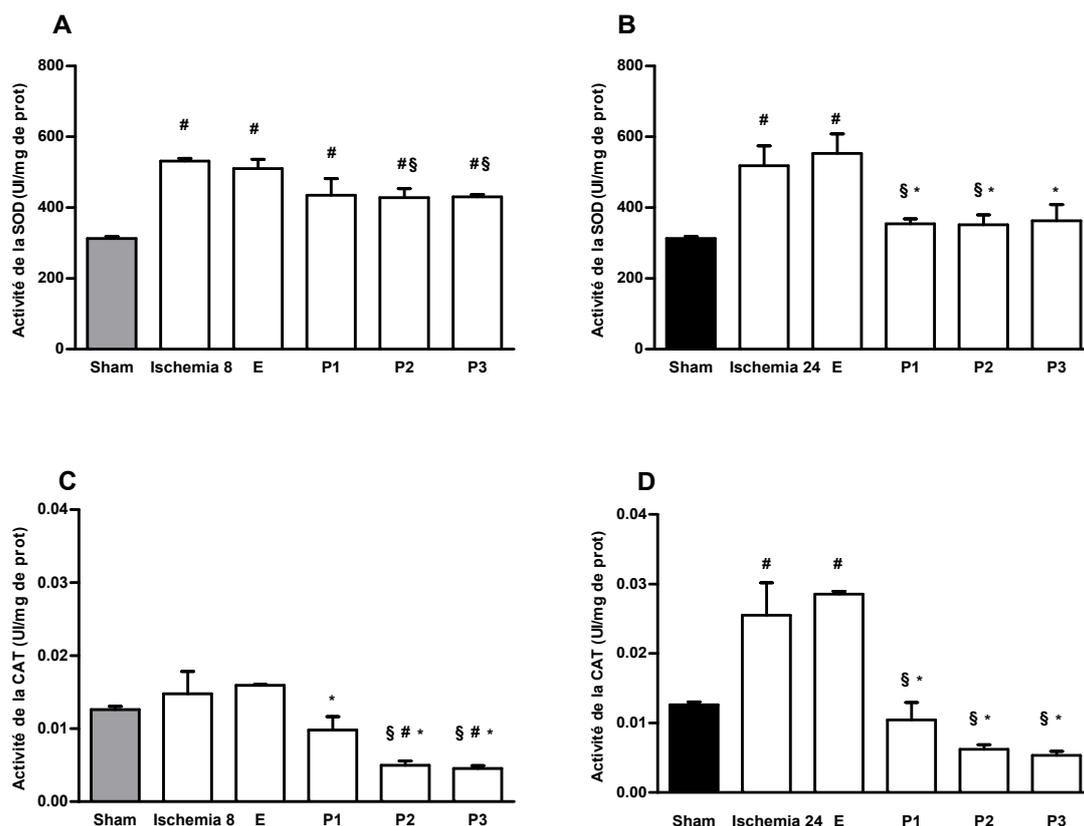


Figure 30: Effet de l'ischémie froide et de la supplémentation en propolis sur les niveaux de la superoxyde dismutase et de la catalase du myocarde.

(A), (B) superoxyde dismutase ; (C), (D) catalase. Pour l'ischémie hypothermique, les cœurs ont été conservés dans la solution de KH à 4 °C pendant 8 et 24 h. Les cœurs ischémiques ont été traités avec des doses croissantes de propolis (50 (P1), 150 (P2), 250 (P3) µg/mL) et de l'éthanol (E) 0,25% comme véhicule. Le groupe Sham n'a pas été soumis à une ischémie hypothermique prolongée. Chaque barre exprime la moyenne ± S.E.M. de cinq souris. Les données ont été analysées avec le test d'ANOVA à un facteur suivi du post-test de Tukey (# : significativement différent du groupe Sham ; § : significativement différent du groupe I-R ; * : significativement différent du groupe E. $p < 0,05$).

III.3. Restauration du taux du GSH et de l'activité de la GS-T par la propolis

La figure 31A, C montre que l'ischémie froide de 8 h et de 24 h a réduit significativement le taux du GSH cardiaque ($0,58 \pm 0,05$ et $0,59 \pm 0,03$ µmole/g de tissu respectivement) comparé au groupe Sham ($1,35 \pm 0,05$ µmole/g de tissu). Cette déplétion du GSH est accompagnée par une augmentation non significative ($p > 0,05$) de l'activité de la GS-T ($0,079 \pm 0,005$ et $0,087 \pm 0,009$ respectifs à 8 et 24 h d'ischémie froide) contre $0,064 \pm 0,005$ UI/mg de protéine pour le groupe Sham (figure 31B, D).

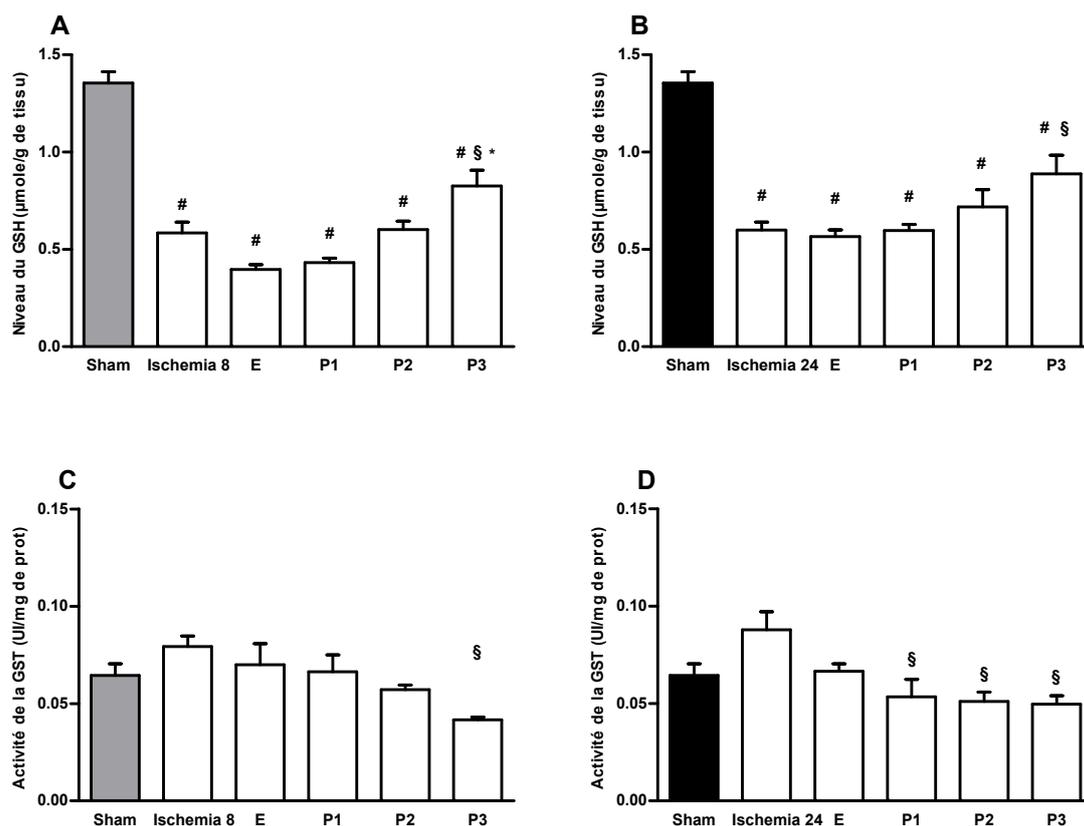


Figure 31: Effet de l'ischémie froide et de la supplémentation en propolis sur les niveaux du glutathion réduit et de la glutathion S-transférase du myocarde.

(A), (B) glutathion réduit ; (B), (C) glutathion S-transférase. Pour l'ischémie hypothermique, les cœurs ont été conservés dans la solution de KH à 4 °C pendant 8 et 24 h. Les cœurs ischémiés ont été traités avec des doses croissantes de propolis (50 (P1), 150 (P2), 250 (P3) µg/mL) et de l'éthanol (E) 0,25% comme véhicule. Le groupe Sham n'a pas été soumis à une ischémie hypothermique prolongée. Chaque barre exprime la moyenne \pm S.E.M. de cinq souris. Les données ont été analysées avec le test d'ANOVA à un facteur suivi du post-test de Tukey (# : significativement différent du groupe Sham ; § : significativement différent du groupe I-R ; * : significativement différent du groupe E. $p < 0,05$).

Comparé au groupe I-R, la supplémentation de la solution de préservation par la propolis a provoqué une légère élévation mais qui reste non significative du taux de GSH. Cette augmentation devient significative à la concentration de 250 µg/mL de propolis ($0,82 \pm 0,08$ et $0,88 \pm 0,09$ µmole/g de tissu respectifs à 8 et 24 h d'ischémie). Ces valeurs restent significativement différentes du taux normal de GSH du groupe Sham (figure 31A, C).

Quant à l'activité de la GS-T, la propolis a diminué l'activité de la GS-T par rapport au groupe I-R d'une façon significative à la concentration de 250µg/mL pour 8 h d'ischémie

($0,041 \pm 0,001$ UI/mg de protéine) et aux trois concentrations pour le cas de 24 h d'ischémie ($0,053 \pm 0,008$; $0,051 \pm 0,004$ et $0,049 \pm 0,004$ UI/mg de protéine). Ces valeurs d'activité enzymatiques ne montrent pas de différences significatives par rapport à celle du groupe Sham ($0,064 \pm 0,005$ UI/mg de protéine) correspondant ainsi à une restauration de l'activité de GS-T à sa valeur normale (figure 31B, D).

III.4. Effet de la propolis sur la respiration mitochondriale

La fonction mitochondriale a été évaluée en enregistrant la vitesse de respiration mitochondriale aux stades 2 (oxydation du substrat G/M, V_2), 3 (ajout d'ADP, V_3) et 4 (ajout de CATR).

Les variations de la V_2 reflètent les modifications de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux protons ou aux ions et permet, conjointement avec le calcul du CR (puisque la V_4 est similaire à la V_2), de déterminer l'efficacité de la phosphorylation de l'ADP dans les mitochondries. Les modifications de V_3 reflètent la capacité maximale de la chaîne respiratoire et le taux de production d'ATP.

Les mitochondries extraites de cœurs ayant subi une ischémie hypothermique de 24 heures n'ont pas montré de variation significative des vitesses de respiration au stade 2 et 4. Par contre, la vitesse de respiration au stade 3 (V_3) a été significativement diminuée de 38 % par rapport à celle des mitochondries saines (figure 32A). Le coefficient de respiration a été également diminué significativement de 31 % comparées aux mitochondries saines ($3,23 \pm 0,44$ contre $4,74 \pm 0,51$ respectivement) (figure 32B).

Lorsque la propolis à la plus basse concentration ($50\mu\text{g/mL}$) a été supplémentée à la solution de préservation, l'ischémie froide de 24 heures endommageait moins les fonctions mitochondriales. En effet, la vitesse de respiration au stade 3 a été significativement augmentée de 26 % par rapport à celle des mitochondries isolées de cœurs ischémiés sans supplémentation (figure 32A). Cette augmentation est, par conséquent, reflétée par l'augmentation du coefficient de respiration où la différence de sa valeur par rapport à celle du CR des mitochondries saines est non significative ($3,71 \pm 0,19$ contre $4,77 \pm 0,53$ respectivement) (figure 32B). Il est à noter que les vitesses V_2 et V_4 n'ont pas été affectées par la supplémentation de propolis à cette concentration (figure 32A).

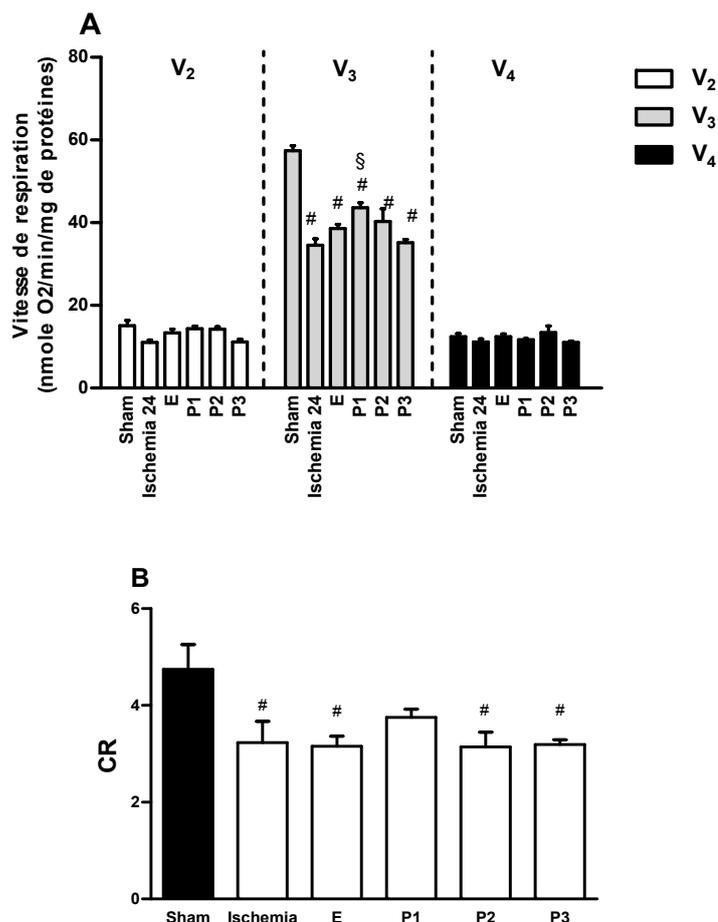


Figure 32: Variations des vitesses et des coefficients de respiration des mitochondries isolées de cœurs ischémiques et traités par la propolis.

Les vitesses (A) et les taux des coefficients de respiration mitochondriale (B) ont été évalués dans les mitochondries isolées des cœurs soumis à une ischémie hypothermique prolongée de 24 h en l'absence ou en présence de concentrations de propolis supplémentées (50 (P1), 150 (P2), 250 (P3) $\mu\text{g}/\text{mL}$) et éthanol (E) 0,25% comme véhicule. La vitesse de respiration mitochondriale (V_2) a été initiée par l'addition du glutamate/malate, substrat du complexe I, suivie de l'addition de l'ADP afin d'accélérer la respiration (V_3) et assurer la synthèse de l'ATP. Cette dernière est stoppée par le CATR et la vitesse est ralentie (V_4). Le coefficient de respiration mitochondriale (CR) correspond au rapport V_3/V_4 . Chaque barre exprime la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences indépendantes. Les données ont été analysées par l'analyse ANOVA à un facteur suivi de post-test de Tukey (# : significativement différent des cœurs sham ; § : significativement différent des cœurs ischémiques sans supplémentation).

Toutefois, la supplémentation de la solution de préservation par les deux concentrations les plus élevées de propolis (150 et 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) n'ont pas affecté les vitesses de respiration V_2 et V_4 . Mais elles ont diminué de 29 et 38 % respectivement la vitesse de respiration au stade 3 (figure 32A), ceci se reflète par conséquent sur le taux du coefficient de respiration

qui montre une diminution significative de 33 % et de 32 % par rapport à celui des mitochondries saines et aucune différence significative par rapport celui des mitochondries ischémisées sans supplémentation ($3,14 \pm 0,30$ et $3,19 \pm 0,10$ contre $3,23 \pm 0,44$ respectivement) (figure 32B).

Concernant, la supplémentation en éthanol, elle n'influait pas la vitesse de respiration des mitochondries cardiaques isolées aux stade 2 et 4 mais elle diminuait de 32 % la vitesse V_3 (figure 32A) et la valeur du CR d'une façon significative par rapport aux mitochondries saines ($3,16 \pm 0,20$ contre $4,74 \pm 0,51$ respectivement) (figure 32B).

III.5. Réduction de la production mitochondriale des ERO par la propolis

Les mitochondries ont été isolées à partir de cœurs ischémiques qui ont été exposés à 24 h d'ischémie hypothermique dans une solution de KH additionnée de trois concentrations de propolis. La production des ERO à partir des mitochondries isolées a été induite par l'addition de substrats du complexe I (glutamate/malate) de la chaîne de transport d'électrons (figure 33). Dans ce cas, aucune différence significative dans le taux de génération de H_2O_2 n'a été observée entre les groupes ischémiques et Sham ($0,055 \pm 0,006$ et $0,048 \pm 0,006$ nmole de H_2O_2 /min/mg de protéine, respectivement). La remarque est similaire en présence de roténone ($0,306 \pm 0,074$ nmole H_2O_2 /min/mg contre $0,301 \pm 0,0805$). Cependant, l'ajout de propolis, et surtout à $250\mu\text{g/mL}$, à la solution de préservation a diminué de manière significative le taux de production de H_2O_2 ($0,010 \pm 0,003$ nmole H_2O_2 /min/mg de protéine) comparée au groupe ischémie (figure 33A). Il est de même en présence de roténone, le groupes propolis (150 et $250\mu\text{g/mL}$) ont montré des taux de production de H_2O_2 ($0,1109 \pm 0,0155$ et $0,100 \pm 0,0100$ nmole H_2O_2 /min/mg de protéine) significativement diminués par rapport au groupe ischémie (figure 33B).

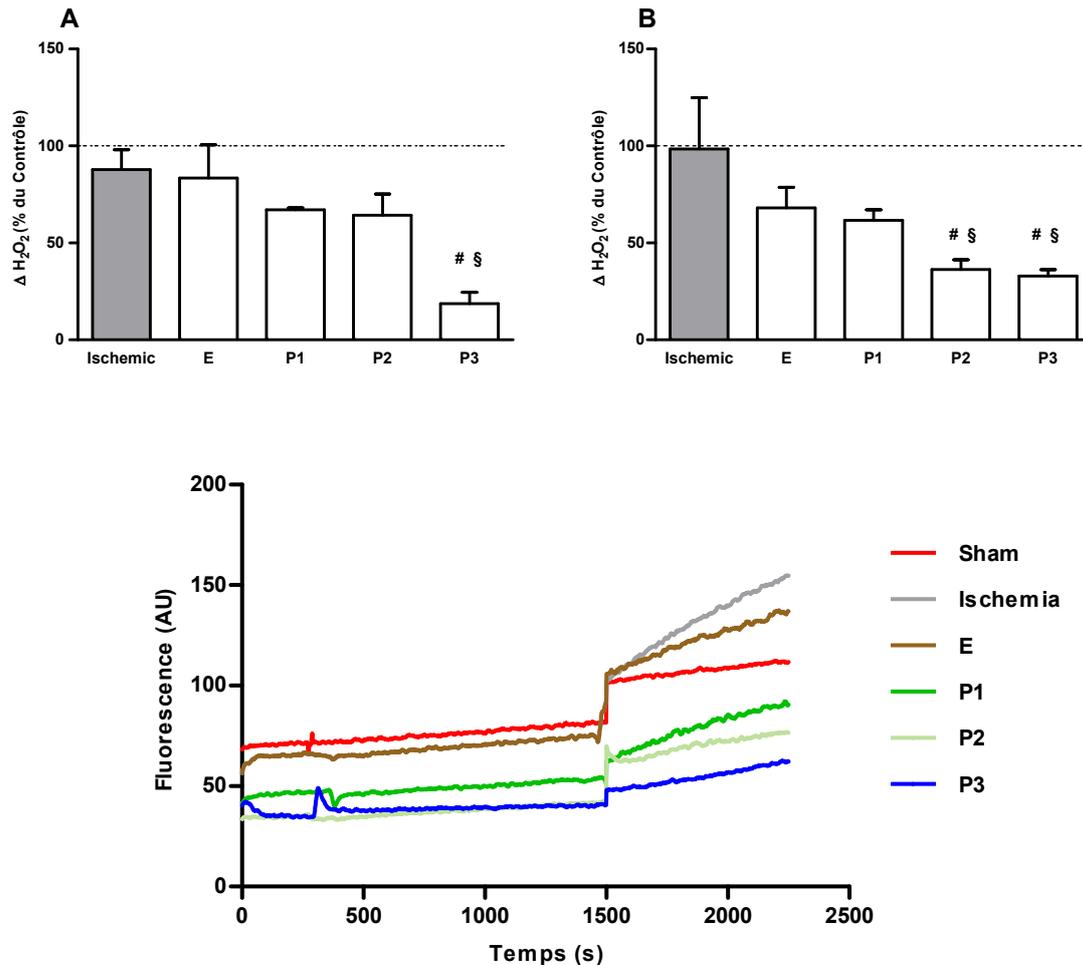


Figure 33: Variation de la production de peroxyde d'hydrogène à partir des mitochondries respirant sur glutamate/malate en absence ou en présence de roténone.

Le taux de production de H_2O_2 a été évalué au cours du temps dans les mitochondries isolées des cœurs soumis à une ischémie hypothermique prolongée en l'absence ou en présence de concentrations de propolis supplémentées (50 (P1), 150 (P2), 250 (P3) $\mu\text{g/mL}$) et éthanol (E) 0,25% comme véhicule. La production de H_2O_2 a été induite par l'addition du substrat glutamate/malate (A) du complexe I et en présence de roténone, inhibiteur du complexe I de chaîne respiratoire mitochondriale (B). Les données sont présentées en pourcentage du groupe témoin (mitochondries du cœur non traité). Les valeurs témoins sont $0,055 \pm 0,006$, $0,306 \pm 0,074$ nmole $H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéine correspondant à (A), (B) respectivement. Chaque barre exprime la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences indépendantes. Les données ont été analysées par l'analyse ANOVA à un facteur suivi de post-test de Tukey (# : significativement différent des cœurs sham ; § : significativement différent des cœurs ischémiques sans supplémentation. $p < 0,05$).

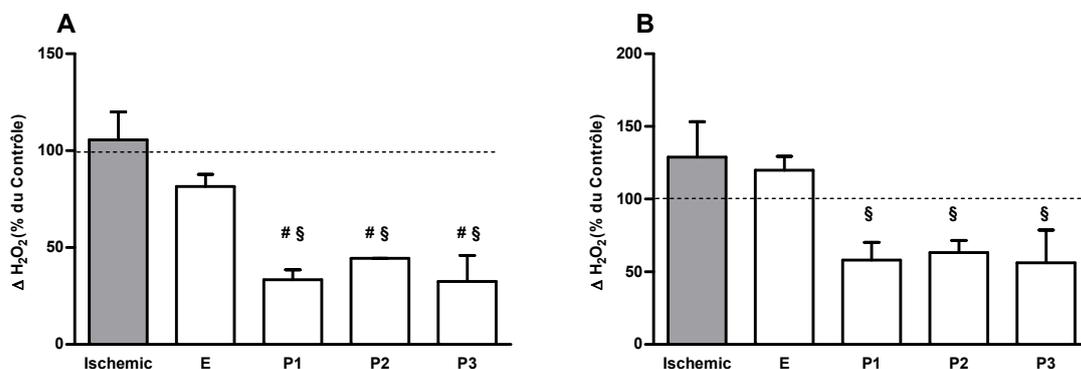
Dans une seconde expérience, la chaîne respiratoire mitochondriale a été alimentée avec du succinate (substrat du complexe II) (figure 34). Cela génère une grande quantité de H_2O_2 ($0,339 \pm 0,050$ nmole $H_2O_2/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) par rapport à l'effet observé avec le

glutamate/malate ($0,055 \pm 0,006$ nmole H_2O_2 /min/mg protéine). Dans ces conditions (figure 34A), les mitochondries isolées à partir de cœurs ischémiques ont montré une légère augmentation du taux de H_2O_2 ($0,358 \pm 0,049$ nmole H_2O_2 /min/mg de protéine) par rapport aux mitochondrie saines mais cet effet n'était pas significatif. Toutefois, les trois concentrations de la propolis réduisent significativement le taux de H_2O_2 généré par les mitochondries ($0,114 \pm 0,017$, $0,151 \pm 0,001$ et $0,111 \pm 0,045$ nmole H_2O_2 /min/mg de protéine correspondant à 50, 150 et 250 $\mu\text{g/mL}$ de propolis, respectivement).

L'effet de la propolis sur la production des ERO a également été testé en présence de la roténone et d'antimycine, qui inhibent le complexe I et le complexe III, respectivement.

Quand La roténone a été ajoutée à des mitochondries isolées à partir de cœurs ischémiques et nourries avec du succinate (figure 34B), le taux de production de H_2O_2 a diminué comme prévu à $0,156 \pm 0,013$ et $0,201 \pm 0,038$ nmole de H_2O_2 /min/mg de protéine, respectivement. La présence de propolis dans la solution de préservation a renforcé cette diminution ($0,091 \pm 0,019$, $0,099 \pm 0,013$ et $0,088 \pm 0,035$ nmole H_2O_2 /min/mg de protéine correspondant aux concentrations de propolis de 50, 150 et 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivement).

Comme attendu, en présence d'antimycine (figure 34C), une grande quantité de H_2O_2 a été produite par les mitochondries du groupe Sham ($0,654 \pm 0,053$ nmole H_2O_2 /min/mg protéine) ou dans les mitochondries isolées de cœurs ischémiques ($0,707 \pm 0,027$ nmole H_2O_2 /min/mg protéine). Dans ces conditions, la propolis joue un rôle bénéfique puisqu'elle réduit le taux de production de H_2O_2 à $0,450 \pm 0,008$ et $0,412 \pm 0,040$ nmole H_2O_2 /min/mg de protéine à des concentrations respectives de propolis de 150 $\mu\text{g/mL}$ et 250 $\mu\text{g/mL}$.



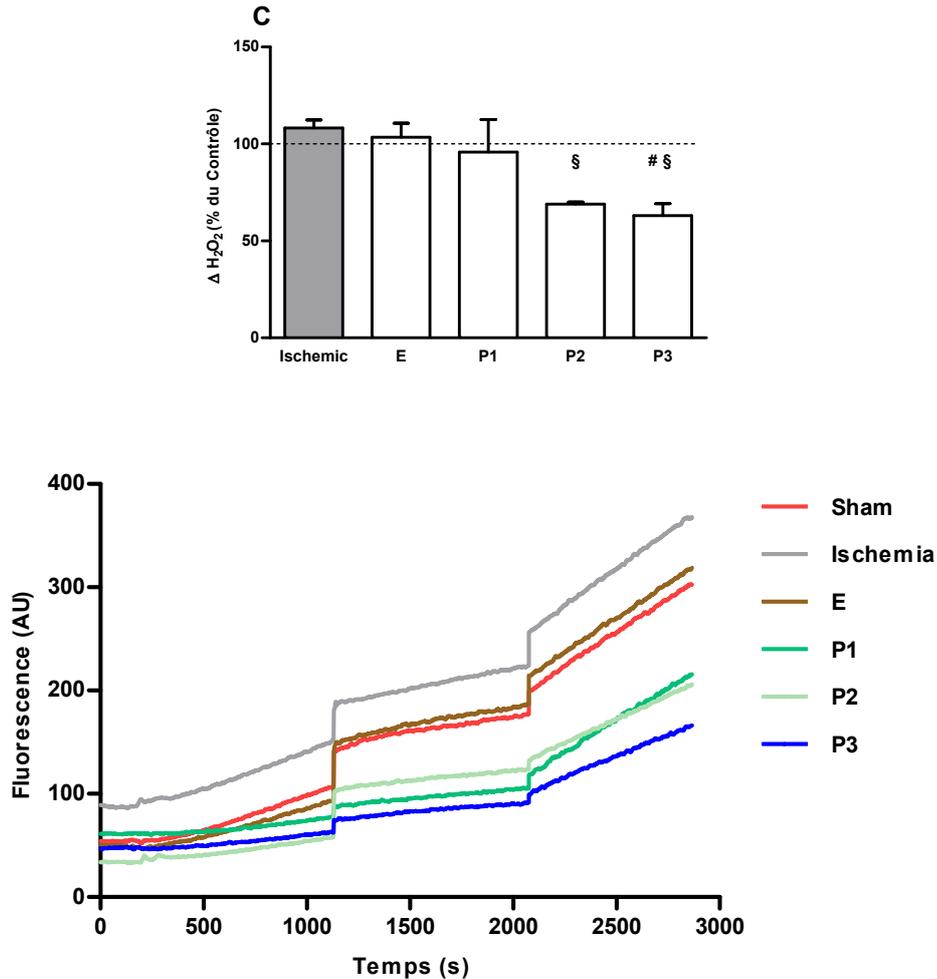


Figure 34: Variation de la production de peroxyde d'hydrogène à partir des mitochondries respirant sur succinate en absence ou en présence de roténone et d'antimycine.

Le taux de production de H₂O₂ a été évalué au cours du temps dans les mitochondries isolées des cœurs soumis à une ischémie hypothermique prolongée en l'absence ou en présence de concentrations de propolis supplémentées (50 (P1), 150 (P2), 250 (P3) µg/mL) et éthanol (E) 0,25% comme véhicule. La production de H₂O₂ a été induite par l'addition du substrat succinate (A) du complexe II et en présence de roténone (B) et d'antimycine (C) (inhibiteurs du complexe I et le complexe III respectivement). Les données sont présentées en pourcentage du groupe témoin (mitochondries du cœur non traité). Les valeurs témoins sont $0,339 \pm 0,050$, $0,156 \pm 0,013$ et $0,654 \pm 0,053$ nmole H₂O₂/min/mg de protéine correspondant à (A), (B) et (C) respectivement. Chaque barre exprime la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences indépendantes. Les données ont été analysées par l'analyse ANOVA à un facteur suivi de post-test de Tukey (# : significativement différent des cœurs sham ; § : significativement différent des cœurs ischémiques sans supplémentation).

III.6. Effet de la propolis sur la capacité de rétention du calcium

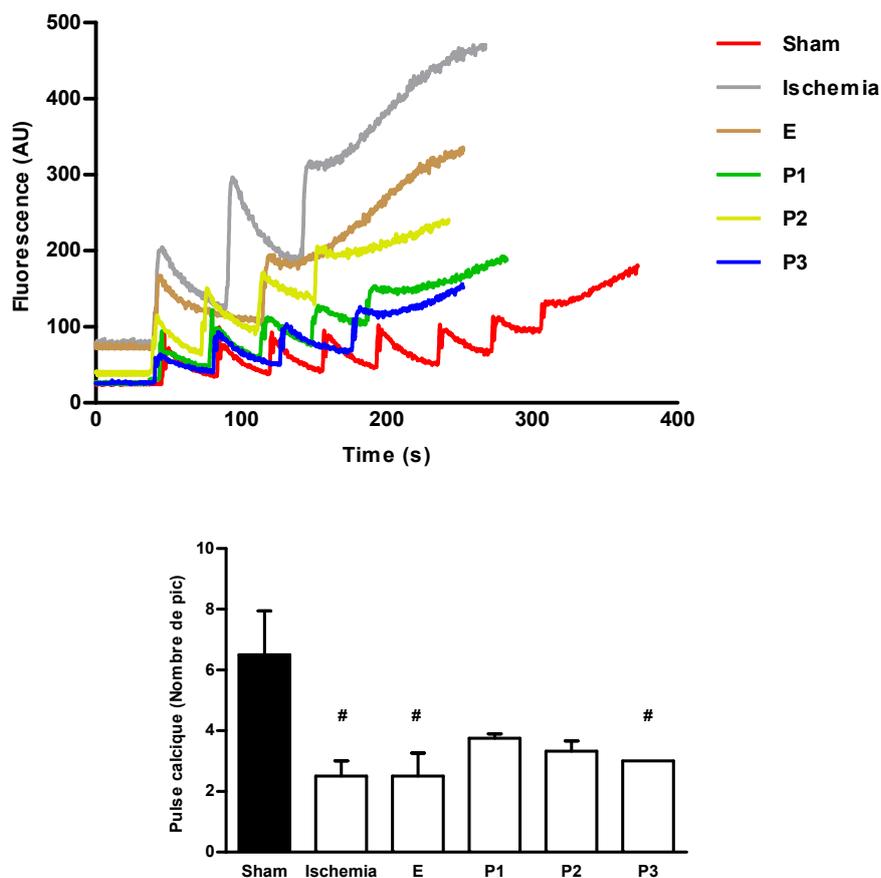


Figure 35: Variation de la capacité de la rétention du calcium au niveau des mitochondries isolées de cœurs ischémiques et traités.

La capacité de la rétention du calcium a été évaluée dans les mitochondries isolées des cœurs soumis à une ischémie hypothermique prolongée de 24 h en l'absence ou en présence de concentrations de propolis supplémentées (50 (P1), 150 (P2), 250 (P3) $\mu\text{g}/\text{mL}$) et éthanol (E) 0,25% comme véhicule. La surcharge de calcium nécessaire pour induire l'ouverture du PTPm au niveau des mitochondries isolées et mises en suspension en présence de glutamate/malate a été induite par des pulses de 1 μl de CaCl_2 (3mM) toutes les 30 à 60 secondes. Les données sont présentées en nombre de pic de fluorescence dans le milieu extramitochondrial. Chaque barre exprime la moyenne \pm S.E.M. de trois expériences indépendantes. Les données ont été analysées par l'analyse ANOVA à un facteur suivi de post-test de Tukey (# : significativement différent des cœurs sham ; § : significativement différent des cœurs ischémiques sans supplémentation).

D'après les résultats de la figure 35, la préservation prolongée des cœurs à basse température augmente la vulnérabilité du PTPm à l'ouverture suite à une surcharge calcique, ceci est exprimé par la réduction significative de nombres de pics de fluorescence dans le

milieu extramitochondrial (2.5 ± 0.5 par rapport à 7.2 ± 1.2 chez les mitochondries normales). Cependant l'addition de la propolis à la solution de conservation a augmenté la résistance du PTPm à la rétention calcique interprété par l'augmentation du nombre de pic de fluorescence dans le milieu extramitochondrial. Cette augmentation n'est pas significative comparée au groupe ischémie mais elle est significative comparée au groupe sham. La propolis a donc augmenté légèrement la capacité de rétention mitochondriale du calcium.

III.7. Effet protecteur de la propolis sur l'intégrité du tissu cardiaque

La figure 36 montre que les cœurs soumis à 8 et 24 h d'ischémie hypothermique présentaient une lésion myocardique reflétée par une augmentation significative ($p < 0,05$) de la libération de la LDH, la CPK et la troponine-I comparés aux groupes témoins respectifs ($76,3 \pm 4,9$ et $130 \pm 12,7$ UI/L correspondant à l'activité de la LDH à 8 et 24 h respectivement, $61,6 \pm 6,3$ et $101,7 \pm 4,1$ UI/L correspondant à l'activité de la CPK à 8 et 24 h respectivement et $501 \pm 45,6$ et $1795,4 \pm 158,9$ ng/L correspondant au taux de la Troponine I à 8 et 24 h respectivement).

Cependant, l'introduction des trois concentrations de propolis dans la solution de KH a réduit les niveaux très élevés des marqueurs de lésions cardiaques d'une manière concentration-dépendante. Les valeurs de réduction par rapport aux cœurs ischémiques étaient -79 % pour la LDH et la CPK et de -77 % pour la troponine I dans le cas de 8 h d'ischémie et de -86 % pour la LDH et la CPK et de -89,34 % pour la troponine I dans le cas de 24 h d'ischémie. Il convient de noter qu'une réduction significative des taux de LDH, de CPK et de troponine I a été observée dans le groupe du véhicule (Ethanol) par rapport au groupe ischémie, mais la différence statistique entre les trois groupes de propolis et l'éthanol reste hautement significative.

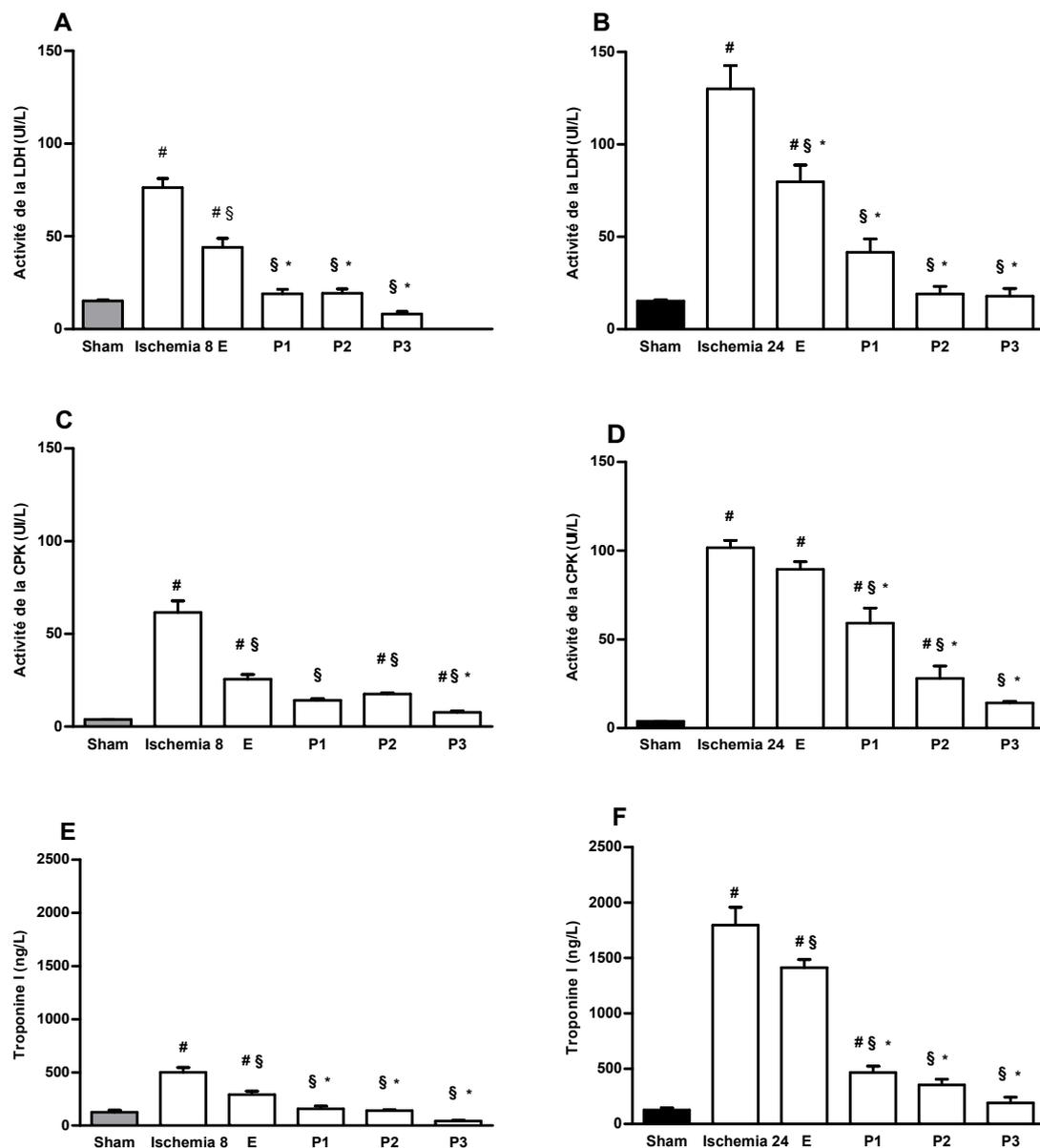


Figure 36: Effet de la propolis sur une lésion cardiaque induite par l'ischémie hypothermique chez la souris.

(A) et (B) LDH lactate déshydrogénase, (C) et (D) CPK créatine kinase, (E) et (F) Troponine-I. Les marqueurs biochimiques des lésions cardiaques ont été évalués dans la solution de conservation de KH après 8 et 24 heures de stockage au froid. Les cœurs ischémiques ont été traités avec des concentrations croissantes de propolis (50 (P1), 150 (P2), 250 (P3) $\mu\text{g}/\text{mL}$) et d'éthanol (E) 0,25% comme véhicule. Le groupe Sham a été soumis à 30 minutes d'ischémie hypothermique. Chaque barre représente la moyenne \pm S.E.M. de cinq souris. Les données ont été analysées par le test d'ANOVA à un facteur suivi du post-test de Tukey (# : significativement différent du groupe Sham ; § : significativement différent du groupe I-R ; * : significativement différent du groupe E. $p < 0,05$).

III.8. Etude histopathologique

Les photos issues de l'analyse microscopique des coupes histologiques effectuées en section longitudinale sur le cœur de souris, sont représentées dans le tableau 4 suivant.

Les modifications des paramètres biochimiques mentionnées ci-dessus étaient confirmées par les résultats de l'étude histopathologique. En effet, le groupe témoin (tableau 4A) a montré un arrangement normal de fibres myocardiques composées de cardiomyocytes allongés avec des noyaux centraux allongés dans le sens de l'axe de la cellule.

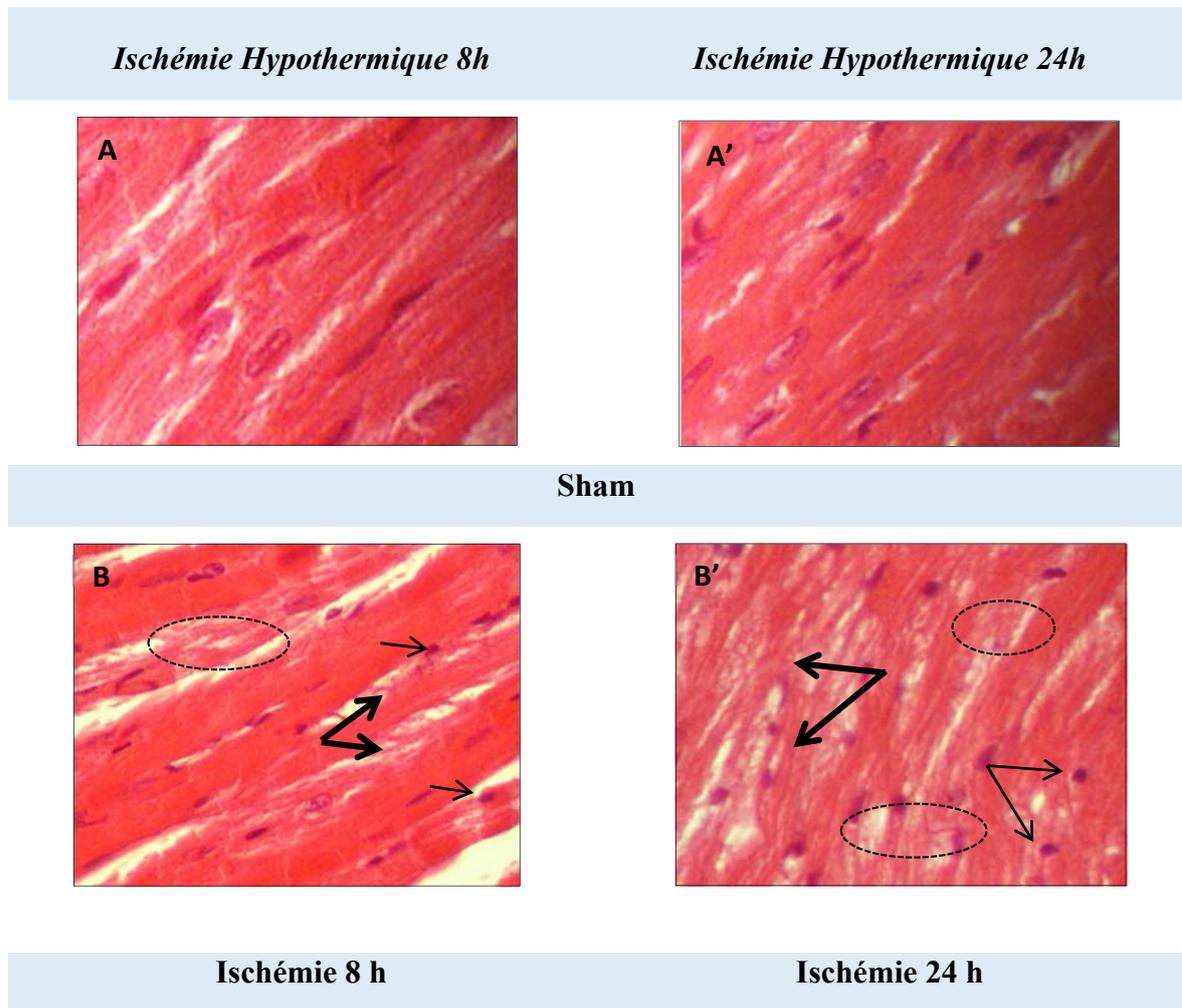
Une ischémie hypothermique prolongée (tableau 4B, B') a provoqué une lésion importante du tissu cardiaque caractérisée par une perte myofibrillaire (grande flèche), des cardiomyocytes nécrosés (cercle) avec des noyaux pycnotiques (flèche mince). Ces effets délétères de la préservation hypothermique semblent plus accentués chez le groupe d'ischémie de 24 heures par rapport à celui de 8 heures.

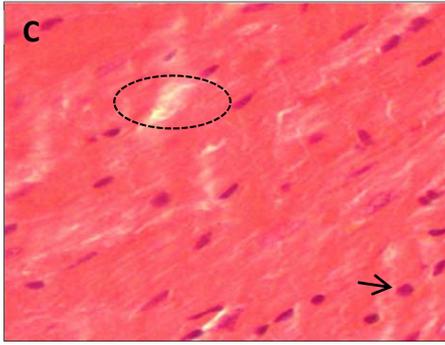
Le traitement à l'éthanol en tant que véhicule a révélé un meilleur aspect que celui d'un cœur ischémié avec une nécrose modérée (cercle) (tableau 4C, C').

La supplémentation de la propolis dans le milieu de préservation diminue remarquablement les lésions éminentes chez les groupes ischémiés et ce pour les deux temps de préservation (8 et 24 h). En effet, à 50 µg/mL de propolis supplémentée, les dommages histologiques affectant le tissu cardiaque suite à l'ischémie hypothermique ont été améliorés partiellement (tableau 4D, D'). À 150 et 250 µg/mL, la propolis a nettement réduit les altérations pathologiques induites par l'ischémie, les cœurs présentent ainsi une morphologie normale sans signe de nécrose focale (tableau 4E, E', F, F').

Tableau 4: Examen histologique du tissu cardiaque de souris soumis à une ischémie hypothermique de 8 et 24 h avec ou sans supplémentation en propolis.

Micrographies représentatives du tissu cardiaque de souris soumis à une ischémie hypothermique de 8 h (B) et de 24 h (B'), montrant la perte d'arrangement des fibres myocardiques (grande flèche) et de cardiomyocytes nécrotiques (cercle) avec des noyaux pycnotiques (flèche mince) par rapport au tissu normal (A') (coloration H & E 400×). Des coupes de tissu cardiaque des groupes éthanol (C) (C') ont présenté une nécrose modérée (cercle) (coloration H & E 400 ×). L'examen au microscope optique de tissus cardiaques exposés à une ischémie froide prolongée et traités à la propolis (50 (D, D'), 150 (E, E') et 250 (F, F') µm/mL) a révélé une morphologie cardiaque presque intacte sans aucune nécrose (coloration H & E 400 ×).

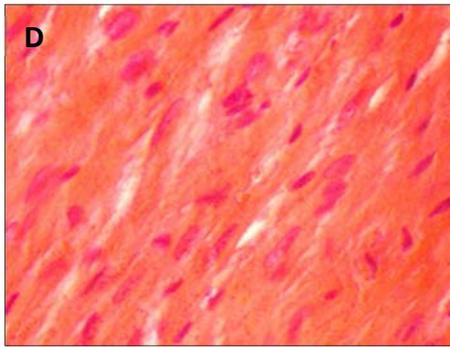




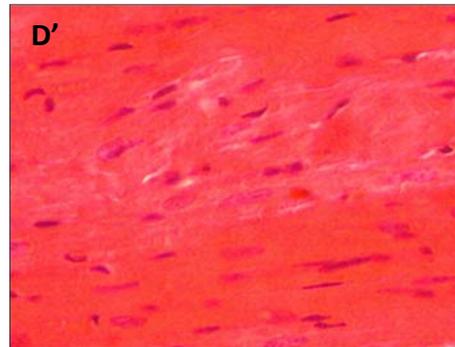
E



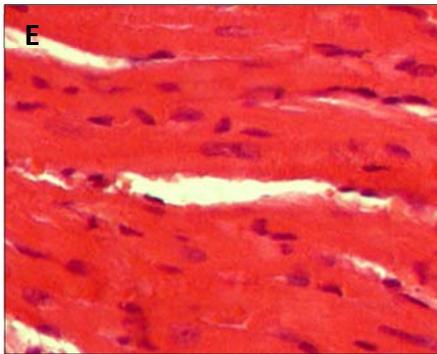
E



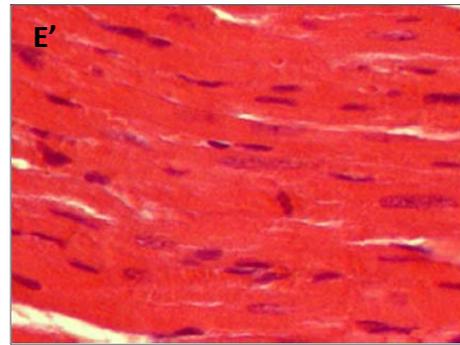
P1



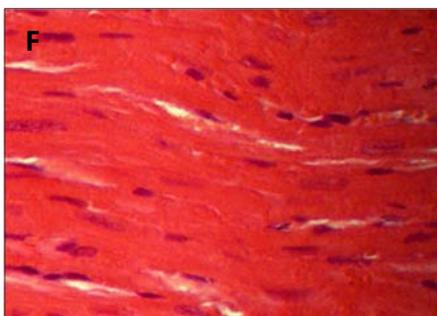
P1



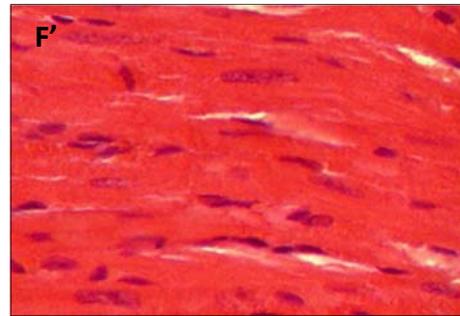
P2



P2



P3



P3

Discussion

IV. Discussion

L'I-R est un processus métabolique qui survient pendant la préservation du cœur suivie d'une transplantation. Le rétablissement des fonctions cardiaques lors de la phase de reperfusion dépend des conditions de préservation comprenant les composants nécessaires pour maintenir la viabilité cellulaire et l'hypothermie pour prolonger la période de conservation (Cobert et al., 2010). Par conséquent, toute intervention visant à réduire les dommages au cours de la phase ischémique atténuera considérablement la gravité des lésions de reperfusion qui en résultent. En effet, la supplémentation de la solution de préservation en agents antioxydants permet de rétablir la fonction normale du cœur après reperfusion chez les receveurs de greffe cardiaque (Testai et al., 2013). Cette méthode de protection par les antioxydants peut être bénéfique du moment que la production des radicaux libres est fondamentalement impliquée dans la pathogenèse de l'ischémie myocardique et celle de la reperfusion (Zhou et al., 2015).

En clinique, la plupart des solutions conçues pour préserver le cœur (solution de Celsior, solution de l'Université de Wisconsin), offrent des durées de préservation sûres en hypothermie de 4 à 6 heures. Cependant, plusieurs études expérimentales (Poston et al., 2004 ; Rudd et Dobson, 2011) ont poussé la limite de la durée de préservation à 8, 12, 18 et 24 heures en utilisant différentes solutions de préservation.

Dans ce deuxième volet d'étude, nous avons testé l'effet protecteur de la propolis algérienne en utilisant un deuxième modèle d'ischémie cardiaque. Cette ischémie s'est produite en conditions hypothermique et statique. La solution de préservation KH utilisée est basique et dépourvue d'antioxydants. Les deux temps de préservation hypothermique de 8 et de 24 heures ont été choisis pour maximiser les effets délétères sur le tissu cardiaque pour pouvoir mieux estimer le degré d'importance de la protection de la propolis. Nous avons considéré que si l'extrait de propolis avait un effet protecteur après une conservation prolongée, il aurait un effet protecteur cardiaque à des temps de préservation plus courts.

La production excessive des ERO au cours de l'I-R cardiaque a toujours été étroitement liée à la phase de reperfusion, mais des études ont révélé que cette suraccumulation de radicaux libres commence d'abord pendant la période d'ischémie (Paraidathathu et al., 1992 ; Paradies et al., 1999, 2004). En outre, il est bien établi que même dans les modèles d'ischémie hypothermique cardiaque, la production des ERO persiste malgré la diminution

du métabolisme basal dans les cardiomyocytes suite aux conditions hypothermiques (Paraidathathu et al., 1992).

Dans notre modèle d'ischémie hypothermique, le stress oxydant s'est produit pendant la période de préservation. Cela a été marqué par une augmentation significative des niveaux d'AOPP et de MDA. En effet, lors de la phase d'ischémie, les radicaux libres incontrôlés, tels que l'anion superoxyde, exclusivement produit en phase d'ischémie (Chang et al., 2007), attaquent les protéines cellulaires en oxydant leurs groupements thiols et en modifiant leurs fonctions. L'AOPP est un biomarqueur de stress oxydant qui est habituellement détecté dans le plasma des patients présentant une complication rénale (Li et al., 2007) et une athérosclérose (Liu et al., 2006). Cet essai a été adopté dans notre étude pour quantifier les dommages oxydatifs vis-à-vis des protéines des cardiomyocytes. De plus, les phospholipides membranaires représentent les cibles préférées des ERO. Dans notre étude, l'élévation observée du taux du MDA dans des cœurs soumis à 8 et à 24 heures d'ischémie hypothermique est la preuve d'une peroxydation lipidique importante. Nos résultats sont en accord avec ceux d'études réalisées sur le même modèle d'ischémie hypothermique mais pour une durée plus courte (5 heures) (Guler et al., 2011; Sahin et al., 2011).

Cependant, l'ajout de propolis dans le milieu de préservation a montré un effet positif sur l'oxydation des protéines et des lipides, ce qui est indiqué par le faible taux d'AOPP et de MDA. Cette observation peut s'expliquer par l'effet des composés phénoliques existants dans la propolis qui piègent les espèces oxydantes libres et empêchent l'oxydation des protéines et des lipides membranaires (Saija et al., 1995). Ces composés bioactifs connus pour leur solubilité lipidique peuvent également être insérés dans la membrane et interrompre la chaîne de cascade de peroxydation lipidique. La pinostrobine chalcone et la tectochrysin contenues dans la propolis sont porteuses de groupement méthoxy (O-méthyl) qui leur confère une lipophilie importante et la capacité d'interagir avec les membranes cellulaires (Saija et al., 1995). De nombreuses études ont été basées sur l'utilisation de flavonoïdes pour réduire le taux de peroxydation lipidique qui est un dommage cellulaire important au cours de l'I-R (Guler et al., 2011; Sahin et al., 2011).

Afin d'évaluer les conséquences de la peroxydation lipidique au niveau de la membrane des cardiomyocytes en phase d'ischémie hypothermiques ainsi que l'effet protecteur de la propolis, les marqueurs cardiaques ont été prélevés et évalués dans la solution de préservation. Le dosage des troponines cardiaques est considéré comme étant le marqueur

de référence pour détecter une lésion du myocarde en plus de l'évaluation des enzymes cardiaques LDH et CPK. En général, la libération des troponines se produit en deux phases. La première consiste en une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire, ce qui permet une libération des troponines libres ; et la seconde consiste en une nécrose de la cellule, ce qui induit une libération des troponines liées (Mair, 1999).

Un test préliminaire a été effectué où la solution de préservation a été prélevée et les marqueurs cardiaques ont été évalués à des temps allant de 30 minutes jusqu'à 24 heures. Nous avons constaté que la libération des enzymes cardiaques et de la troponine-I dépendaient du temps et que leurs taux ont augmenté en fonction du temps jusqu'à atteindre la valeur maximale après 24 heures de préservation à 4 °C.

D'après nos résultats, les différences entre le groupe témoin soumis à 30 minutes d'ischémie hypothermique et les groupes soumis à une ischémie hypothermique de 8 et de 24 heures sont très grandes, ce qui reflète l'importance de la lésion cardiaque causée par l'ischémie froide et sa relation de dépendance avec le temps. Dans les groupes supplémentés de propolis, la diminution importante de la libération des enzymes cardiaques (CPK et LDH) et de la troponine-I dans la solution de préservation confirme l'effet protecteur de la propolis. La propolis, surtout à la concentration de 250 µg/mL, prévient très significativement les dommages des cellules cardiaques. Cet effet cardioprotecteur frappant était dose-dépendant. Il confirme ainsi que l'effet cytoprotecteur de la propolis est corrélé à la quantité des flavonoïdes et d'antioxydants phénoliques existants dans l'extrait. Ces antioxydants naturels protègent l'intégrité des membranes cellulaires contre l'attaque des radicaux libres. Ils réduisent fortement la peroxydation et la perméabilité de la membrane des cardiomyocytes et empêche sa rupture prévenant ainsi la libération des enzymes cardiaques dans le milieu extracellulaire. Ces résultats concordent avec les données indiquant que les flavonoïdes purs ou les composés phénoliques extraits de plantes possèdent une cytoprotection efficace contre les dommages de l'I-R (Selvaraj et Pugalendi, 2010 ; Qiao et al., 2011).

Les variations des paramètres biochimiques mentionnées ci-dessus et ceux du taux de peroxydation lipidique représenté par le MDA sont en accord avec les résultats de l'étude histologique des cœurs soumis à une ischémie froide prolongée en présence ou en absence de propolis. En effet, comparé au tissu cardiaque ischémié qui présentait une perte d'arrangement myofibrillaire et une nécrose cellulaire, la propolis s'est montrée protectrice de l'intégrité cellulaire des cardiomyocytes. Cet effet protecteur du tissu cardiaque est dose

dépendant, le tissu cardiaque du groupe traité par la plus grande concentration de propolis présente une histoarchitecture cardiaque normale comparable à celui d'un tissu sain.

Par ailleurs, il est à noter que le type de mort cellulaire observé au niveau des coupes histologiques est la nécrose. La mort par apoptose n'est pas attendu car, cette dernière nécessite de l'énergie qui est en baisse en condition hypothermique, en plus elle n'a lieu que si la phase d'ischémie est suivie par une reperfusion normothermique (Oriyanhan et al., 2005). Ce qui n'est pas le cas dans cette partie expérimentale de notre étude.

Nos résultats corroborent avec ceux de Guler (Guler et al., 2011) et ceux de Sahin (Sahin et al., 2011) utilisant respectivement les proanthocyanidines, flavonoïdes extraits des graines de raisin et la taurine, un puissant agent antioxydant, administrés par voie orale, sur un modèle de préservation statique hypothermique où des cœurs de rats étaient préservés dans une solution isotonique (NaCl 0,9%) pendant 5 heures. Ces antioxydants naturels ont préservé l'histoarchitecture du tissu cardiaque et y ont prévenu l'apparition de noyaux pycnotique et de foyers nécrosés. Comme nos résultats l'ont montré, cette protection était étroitement liée à la réduction de la peroxydation lipidique indiquée par une diminution du taux de MDA cardiaque.

Nous avons également évalué le statut antioxydant cardiaque en mesurant les taux de glutathion réduit, l'activité de la glutathion-S-transférase ainsi que les activités de la superoxyde dismutase et de la catalase. Ces deux dernières agissent d'une façon complémentaire et sont considérées comme la première ligne de défense contre l'effet toxique des ERO en les métabolisant en sous-produits inoffensifs. Nous avons observé que l'ischémie froide durant 8 ou 24 heures provoquait une augmentation des activités de la SOD et de la CAT suggérant le piégeage des radicaux oxydants produit excessivement dans les cardiomyocytes ischémiés. Il est également probable que l'ischémie ait immédiatement déclenché l'activité de la superoxyde dismutase par le biais d'un mécanisme de mécano-transduction.

D'une autre part, cette augmentation est associée à une élévation de la peroxydation lipidique indiquée par le niveau élevé de MDA. Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux de Guler (Guler et al., 2011) et ceux de Sahin (Sahin et al., 2011) cités ci-dessus où une corrélation négative entre l'activité enzymatique de SOD et de la CAT et la teneur en MDA était établie. L'effet observé dans notre étude peut vraisemblablement être expliqué par

l'ampleur de la génération des ERO qui excèdent la capacité antioxydante de la cellule cardiaque ayant de faibles défenses antioxydantes (Bordoni et al., 2002). En outre, la teneur élevée du substrat lipidique dans le myocarde, comme les acides gras, peut servir davantage comme une cible à l'attaque oxydative par les ERO (Goldberg et al., 2012).

Dans une étude de Yeginsu et Ergin similaire à la notre mais réalisée sur le poumon de rat, une préservation prolongée a été effectuée dans une solution de dextrane à faible teneur en potassium à 4 °C pendant 6, 12, 24, 48 et 72 heures. Ses résultats ont révélé que dans la préservation pulmonaire ischémique, le stress oxydant commence pendant la phase initiale de conservation et dure jusqu'à 72 heures. L'activité de la superoxyde dismutase a augmenté pendant la période initiale de préservation. Cette augmentation est significative à la 12ème heure et reste élevée jusqu'à la 72ème heure et est expliquée par un mécanisme de mécano-transduction. L'activité de la catalase a progressivement augmenté au cours de toutes les périodes de conservation. Le niveau de malondialdéhyde a légèrement augmenté de la 6e à la 24e heure (Yeginsu et Ergin, 2009).

La propolis réduit l'activité de la SOD et par conséquent celle de la CAT et rétablit ainsi l'activité des deux enzymes à des valeurs normales, ce qui suggère un renforcement par la propolis de la défense antioxydante en piégeant les radicaux libres en particulier l'anion superoxyde, mimant ainsi la fonction de la SOD. Ceci est en ligne avec les résultats observés avec la pinocembrine, l'un des composants flavonoïdiques de la propolis, qui réduit l'augmentation compensatoire de l'activité SOD et du niveau de MDA (Lan et al., 2016).

Pour ce modèle d'ischémie hypothermique, nous avons également évalué le taux d'un autre antioxydant non enzymatique de première ligne de défense qui est le glutathion réduit. La teneur de ce tripeptide qui exerce des fonctions métaboliques et protectrices importantes est affecté par la préservation hypothermique. En effet, d'après nos résultats, l'ischémie froide a causé une déplétion significative du pool cellulaire du GSH réduit qui est une preuve de son importante consommation par les ERO car le GSH réduit agit directement en tant qu'antioxydant en piégeant les radicaux libres et en réduisant les peroxydes (Das et al., 1995). En plus, le GSH réduit protège les groupements thiol des protéines contre l'oxydation qui a été augmentée dans les cœurs ayant subi une ischémie froide et qui a été indiquée par le taux élevé de l'AOPP. Cette déplétion est essentiellement due à l'augmentation des processus cataboliques. D'une autre part, ce résultat peut être expliqué par une perte du GSH qui n'est pas compensée par son transport de la solution de préservation, qui est dépourvue

du GSH, vers le milieu intracellulaire ; ni par sa synthèse ou sa régénération, assurée par la GSH synthétase et réductase. Cette déplétion du GSH intracellulaire sensibilise les cellules à différentes formes de lésions oxydatives. Ceci peut avoir un rôle négatif pendant la transplantation. Certaines études ont montré que l'ajout de GSH à la solution de conservation ralentit le taux de consommation du GSH par les cellules et améliore également la qualité de conservation d'organes (Vreugdenhil et al., 1991 ; Rodríguez et al., 1995;). Il a été démontré également que l'hypothermie peut augmenter la perméabilité cellulaire au GSH. Ce phénomène n'est pas dû aux dommages de la membrane cellulaire mais l'accumulation du GSH se fait par diffusion (Rodríguez et al., 1998).

Par ailleurs, il est à remarquer d'après nos résultats que l'activité de la glutathion S-transférase a été augmentée suite à la préservation hypothermique, ce qui explique d'une part la consommation du GSH réduit dans les réactions de conjugaison avec les hydroperoxydes lipidiques et les aldéhydes cytotoxiques (Hayes et McLellan, 1999). Ces derniers sont essentiellement générés de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires et sont produits en grande quantité en phase d'ischémie froide comme il a été indiqué par le taux très élevé du MDA du lot ischémie. Il est clair que la GS-T ne représente pas la première ligne de défense contre les radicaux libres qui est assurée par la SOD, la catalase. Mais l'augmentation de son activité fait de la GS-T un deuxième moyen de défense contre les substances hautement toxiques générées par les ERO.

L'augmentation de l'activité réductase de la GS-T est concomitante à l'élévation de l'activité de la SOD et de la CAT, à la déplétion du GSH réduit et à l'augmentation du MDA cardiaque. Ceci ne fait que confirmer l'importante production des ERO produites durant cette phase d'ischémie hypothermique, impliquant ainsi la production excessive des aldéhydes cytotoxiques qui affectent l'intégrité de la membrane cellulaire. Cette défaillance est affirmée par la libération des enzymes cardiaques et par la nécrose observée au niveau du tissu cardiaque préservé à froid.

La supplémentation de la propolis dans la solution de préservation a permis une compensation du taux de GSH cardiaque, mais cette augmentation n'atteint pas la valeur normale du fait de sa faible synthèse et du manque de son apport exogène. Cette compensation du GSH est accompagnée d'un rétablissement de l'activité de la GS-T à une valeur normale. Cette observation n'est expliquée que par le fait que les substances polyphénoliques contenues dans la propolis ont piégé les radicaux libres préservant ainsi le

pool cellulaire de GSH réduit. Ces substances ont également inhibé la propagation de la peroxydation lipidique diminuant, par conséquent, les hydroperoxydes et les aldéhydes toxiques résultants ainsi que l'activité réductrice de la GS-T. Cette diminution d'activité enzymatique permet de prévenir la consommation du GSH réduit dans des réactions de conjugaison et le préserver à un taux presque normal.

Ces résultats sont en accord avec la réduction de l'activité de la SOD et de la CAT ainsi que la diminution du taux du MDA et de l'AOPP observées en présence de la propolis suggérant un renforcement de la défense antioxydante enzymatique et non enzymatique par la propolis conduisant à une préservation de l'intégrité membranaire et cellulaire. Ce résultat corrobore avec de nombreux travaux portant sur l'effet des flavonoïdes purs ou des polyphénols extraits du thé vert sur l'ischémie lors de la préservation d'organes et conservation de greffes tissulaires ou de cellules et ce en hypothermie et même en normothermie.

En effet, dans une étude de Ahlenstiel et al., des cellules épithéliales tubulaires du rein en culture conservées à 4°C pendant 20 heures dans la solution de l'Université du Wisconsin (UW) ou dans la solution de Collins (EC) auxquelles divers flavonoïdes ont été supplémentés. Après une période de réchauffement des cellules, les flavonoïdes ont montré un effet protecteur de l'intégrité structurelle et métabolique des cellules indiqué par une réduction significative de la libération de lactate déshydrogénase (LDH) et de la peroxydation lipidique (Ahlenstiel et al., 2006). Une autre étude a prouvé que des tissus aortiques de rat stockés dans une solution de préservation contenant les polyphénols extraits du thé vert à 4 °C pendant 24 h, peuvent rester viables pendant de longues périodes soit avant ou après la transplantation (Hyon et al., 2006). Il a été montré, par la même équipe, que ces polyphénols extraits du thé vert peuvent conserver plusieurs types de tissus, y compris les vaisseaux sanguins, le cartilage et la cornée pendant plusieurs mois en condition normothermique (Hyon, 2004).

Il a été remarqué, d'après nos résultats, que l'effet dose-dépendant de la propolis de propolis était évident en ce qui concerne les taux du MDA, du GSH et des marqueurs biochimiques cardiaques (LDH, CPK et Troponine-I) et, dans une certaine mesure, l'activité de la CAT et de la GS-T. Cependant, cet effet ne s'est pas manifesté pour l'activité des enzymes antioxydantes SOD, et le taux d'AOPP. Cela pourrait être dû à l'effet plateau de l'activité antioxydante. Nos résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Devi et al.,

ayant révélé cet effet plateau touchant l'activité de la SOD et un effet dose-réponse avec le MDA et l'activité de la CAT (Devi et al., 2005).

En observant les résultats des différents paramètres, nous remarquons que durant l'ischémie froide l'activité de la CAT a augmenté en fonction du temps (entre 8 et 24 heures). L'augmentation entre 8 et 24 heures des marqueurs cardiaques LDH, CPK et troponine-I ainsi que des lésions histologiques observés est encore plus accentuée. Pour le reste des paramètres, leurs changements dus à l'ischémie froide n'ont pas été affecté par la durée de préservation du cœur.

Par ailleurs, la fonction mitochondriale et la production des ERO sont des facteurs fondamentaux dans l'induction des lésions par l'I-R. Par conséquent, des tests plus avancés ont été réalisés sur des mitochondries isolées appartenant aux cœurs soumis à une préservation statique et hypothermique de 24 heures afin de comprendre l'effet de la préservation prolongée sur la fonction mitochondriale et les mécanismes possibles de protection mitochondriale assurés par la propolis.

Lorsque la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) était alimentée en glutamate-malate, aucune différence significative dans la production des ERO n'a été observée entre les groupes ischémiques et le groupe témoins. Cependant, les mitochondries respirant sur succinate, génèrent sept fois plus de H_2O_2 qu'en respirant sur le glutamate-malate. Cette génération était plus prononcée dans les mitochondries isolées de cœurs ischémiques. Ceci est en accord avec les données montrant que le niveau de succinate est augmenté lors d'un stress oxydant ou dans des conditions pathologiques associées à une lésion ischémique cardiaque (Lo Iacono et al., 2011 ; Chouchani et al., 2014).

Cette augmentation de la production de H_2O_2 est inhibée par l'addition de la roténone qui est due au transfert reverse d'électrons (RET) du complexe II au complexe I et qui est considéré comme la principale source de production de grandes quantités d' $O_2^{\bullet -}$ au niveau du complexe I (Madungwe et al., 2016).

La réduction de la production de H_2O_2 induite par la roténone est plus faible dans les mitochondries soumis à une ischémie froide par rapport aux mitochondries témoins. Ce résultat peut expliquer la vulnérabilité connue du complexe I à l'ischémie froide. Des études antérieures ont rapporté que les complexes I et III sont plus sensibles à l'ischémie

hypothermique que les complexes II et IV (Schneeberger et al., 2008). Il est également établi que le complexe III est une source importante de production des ERO après I-R (Pei et al., 2016). Le même résultat peut être observé dans notre modèle d'ischémie où le taux de production de H₂O₂ après ajout l'antimycine A, inhibiteur du complexe III, aux mitochondries respirant sur le succinate était plus élevé après préservation hypothermique. Cela peut être expliqué par la susceptibilité du complexe III à la conservation prolongée au froid qui est en corrélation avec la perte progressive de la fonction mitochondriale.

En outre, nos résultats ont démontré la capacité de la propolis à réduire la production mitochondriale du H₂O₂. En effet, quel que soit le substrat utilisé et en présence ou en absence d'inhibiteurs des complexes I et III, la propolis réduit le taux de production de H₂O₂. L'effet est plus prononcé avec la plus forte concentration de propolis. Différents mécanismes peuvent expliquer cet effet. Premièrement, la propolis peut agir en tant qu'antioxydant direct en éliminant les ERO produites par les complexes I et III, en limitant le transfert reverse d'électrons et, par conséquent, atténuer la génération des ERO par le RET. En outre, une interaction directe des flavonoïdes de la propolis pouvant fonctionner comme porteurs d'électrons dans la CRM d'une manière mimétique de l'ubiquinone et du cytochrome c ne peut être exclue (Sandoval-Acuña et al., 2012; Skemiene et al., 2015). Enfin, la propolis peut également protéger l'intégrité de la cardiolipine contre les attaques oxydatives, car ce phospholipide non saturé de la membrane mitochondriale interne est essentiel pour l'assemblage et l'efficacité des complexes respiratoires, mais il est extrêmement sensible à l'oxydation par les ERO produites pendant l'ischémie et la reperfusion (Lesnefsky et al., 2001b ; Paradies et al., 2004 ; Gadicherla et al., 2012).

Afin de mieux comprendre l'effet de la propolis sur l'intégrité de la chaîne respiratoire mitochondriale suite à une ischémie hypothermique prolongée et entre autre, éclairer encore plus le mécanisme d'action de la propolis sur la production des ERO, une analyse oxygraphique sur les mitochondries isolées de cœurs de souris ischémiés a été effectuée.

La vitesse de respiration dépend dans une large mesure du flux passif de protons à travers la membrane interne des mitochondries (Bernatoniene et al., 2014). Ainsi, l'état 2 ou 4 reflète la fuite de proton à travers la membrane interne mitochondriale. L'état 3 est particulièrement dépendant sur l'intégrité de la chaîne respiratoire mitochondriale et sur l'activité de l'ATP synthase et celle de l'adénine nucléotide translocase (Suchalatha et al., 2007).

Nos résultats indiquent que l'ischémie froide de 24 heures a diminué significativement la vitesse de respiration des mitochondries cardiaques au stade 3 accompagnée d'une réduction significative du taux de coefficient de respiration des mitochondries respirant sur le substrat du complexe I (G/M). Cette ischémie hypothermique a affecté négativement la vitesse de respiration au stade 2 ou 4, cependant, cet effet n'est pas significatif. Par conséquent, nos résultats suggèrent que l'ischémie froide a provoqué une diminution de l'activité de l'adénine translocase affectant en particulier l'état 3 et le CR (Suchalatha et al., 2007).

De nombreuses études ont montré que l'ischémie cardiaque altère la phosphorylation oxydative des mitochondries (Solaini et Harris, 2005). En effet, l'ischémie diminue le taux de respiration mitochondriale au stade 3, augmente la perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux protons ou ions au stade 2 (Piper et al., 1994), inhibe l'activité des complexes I, II, III de la CRM (Piper et al., 1985) et celle de l'adénine translocase (Halestrap, 2009) et l'ATP-synthase (Rouslin, 1983), réduit la quantité de protéines membranaires et de protéines situées dans l'espace intermembranaire, en particulier le cytochrome c (Piper et al., 1985).

Par ailleurs, nos résultats indiquent que la supplémentation de la solution de préservation par la propolis atténue la diminution de la vitesse de respiration au stade 3 et du CR au cours de l'ischémie froide. L'augmentation est significative à la plus faible concentration de propolis. En présence de CATR, inhibiteur de l'ADP/ATP translocase qui importe l'ADP du cytosol et exporte l'ATP de la matrice mitochondriale assurant ainsi la phosphorylation oxydative (Kunji et al., 2016), la propolis n'a pas affecté la vitesse de respiration mitochondriale. Ces résultats suggèrent une amélioration de la synthèse de l'ATP dans les mitochondries et une protection du système de phosphorylation des dommages ischémiques.

Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Bernatoniene et ses collaborateurs (Bernatoniene et al., 2011) travaillant sur un modèle d'ischémie cardiaque proche du notre mais en condition normothermique et pendant 45 minutes. Ils ont révélé que le traitement oral des rats avant prélèvement du cœur par l'extrait de *Ginkgo biloba* pendant 10 et 18 jours a réduit la diminution de la vitesse de respiration au stade 3 au cours de l'ischémie, et plus efficacement dans le cas d'une oxydation du substrat du complexe I.

Une autre étude de Suchalatha et ses collaborateurs a montré l'effet protecteur du prétraitement du rat par l'extrait alcoolique de *Terminalia chebula* dans un modèle expérimental de lésions myocardique induit par l'isoprotérénol. Cet effet est assuré par le maintien de toutes les variables de la respiration mitochondriale, à savoir respiration au stade 3 et 4, rapport ADP/O et synthèse d'ATP, ayant été diminués par l'isoprotérénol (Suchalatha et al., 2007).

Par ailleurs, aux deux concentrations les plus élevées de la propolis, la vitesse de respiration au stade 3 et le taux du CR diminuent par rapport à ceux observés à la plus petite concentration. En outre, la vitesse au stade 2 semble augmenter suite au traitement par la propolis par rapport au groupe ischémie, cette augmentation n'est pas dose-dépendante. Ces résultats révèlent un léger effet découplant de la propolis aux deux concentration élevées.

Des études ont montré que les flavonoïdes induisent un découplage partiel de la phosphorylation oxydative dans les mitochondries cardiaques, améliorant ainsi la respiration mitochondriale sans la compromettre de manière irréversible (Testai, 2015). Nos résultats sont en ligne avec ceux de Bernatoniene et al., qui a révélé dans une autre étude portée sur l'effet de l'extrait de *Leonurus cardiaca* et ses flavonoïdes sur la phosphorylation oxydative des mitochondries cardiaques que cet extrait à des concentrations plus faibles n'augmentait que le taux de respiration mitochondrial de stade 2. Cependant, à des concentrations plus élevées, il a également diminué les taux de respiration au stade 3 suggérant un effet découplant de l'extrait (Bernatoniene et al., 2014).

Concernant la respiration mitochondriale et la production des ERO, nos résultats ont montré que la propolis avait un léger effet découplant de la phosphorylation oxydative accompagné d'une diminution considérable de la production du H₂O₂ induit par l'ischémie froide.

Les études de Bernatoniene précédemment cités ont toutes montré que, dans des conditions normales ou après une ischémie globale, le traitement par les extrait de *Ginkgo biloba*, par *Crataegus monogyna* ou par *Leonurus cardiaca* induisait un découplage modéré et diminuait de manière significative la production de H₂O₂ (Bernatoniene et al., 2009, 2011, 2014). L'auteur a également prouvé que les polyphénols purs, entrant dans la composition de l'extrait de *Leonurus cardiaca* et testés distinctement, étaient partiellement responsables

de l'effet de découplage mais l'activité antioxydante de L'extrait *L. cardiaca* dépend fortement de l'interaction de ses composants phénoliques (Bernatoniene et al., 2014).

Il est maintenant évident qu'un léger découplage de la phosphorylation oxydative, correspondant à une augmentation ou une diminution de la consommation d'oxygène, entraîne une légère diminution du potentiel membranaire mitochondrial, abaissant ainsi la production excessive des ERO. Cela montre que la formation des ERO est fonction du potentiel membranaire plutôt que du taux de transport des électrons dans la chaîne respiratoire (Korshunov et al., 1997; Morin et al., 2001).

Par conséquent, il a été proposé qu'un découplage modéré peut représenter un mécanisme de défense contre le stress oxydant et au cours de l'I-R cardiaque (Qun Chen et al., 2007), empêchant l'augmentation soudaine du potentiel membranaire mais limitant également l'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries (Morin et al., 2001). Cette dernière est étroitement liée à l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale.

Ce PTPm est le facteur critique déterminant les lésions liées à la reperfusion cardiaque et dont l'ouverture provoque une libération de Ca^{2+} mitochondrial, l'inhibition de la synthèse de l'ATP, un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale et un gonflement mitochondrial avec libération de protéines pro-apoptotiques. L'inhibition de l'ouverture du PTPm représente le principe d'une cardioprotection efficace (Halestrap, 2004 ; Clarke et al., 2008 ; Morciano et al., 2015).

La capacité de rétention calcique mitochondriale requise pour induire l'ouverture des PTPm a été mesurée à l'aide du calcium fluorescent (*calcium-green*) sur des mitochondries isolées de cœurs ischémiés à 4 °C pendant 24 heures et respirant sur glutamate/malate (substrat du complexe I).

Nos résultats montrent que l'ischémie froide a diminué significativement la capacité des mitochondries à retenir le calcium avant une ouverture rapide du PTPm. Ce résultat suggère la vulnérabilité du PTPm en phase d'ischémie prolongée et l'augmentation de la susceptibilité de s'ouvrir après avoir reperfusé les mitochondries, car les conditions de réalisation du test de la CRC sont considérées comme une phase de reperfusion mais à une échelle mitochondriale.

Actuellement, il est évident que la sensibilité du PTPm est affectée durant la phase d'ischémie et l'est encore plus en période de reperfusion (Morciano et al., 2015). L'étude de Madungwe et al., a indiqué que l'application du glutamate/malate, comme substrat d'oxydation de la chaîne respiratoire des mitochondries ayant subi une ischémie cardiaque, augmente la sensibilité de l'ouverture du PTPm à la surcharge en calcium par rapport au succinate, substrat du complexe II (Madungwe et al., 2016). Utiliser le succinate comme substrat du complexe II dans notre étude aurait pu nous éclairer encore plus sur le comportement du PTPm suite à l'ischémie froide prolongée.

L'addition de la propolis au cours de l'ischémie froide a rétabli la capacité de la mitochondrie à retenir le calcium, l'ouverture du PTPm est alors retardée par rapport aux mitochondries isolées de cœur ischémiés mais elle n'est pas au même niveau que celui des mitochondries saines. Cet effet significativement positif est observé à la plus petite concentration de propolis (50µg/mL). À des concentrations plus élevées de propolis, l'ouverture du PTPm n'a pas été retardée significativement. Ce qui suggère que ce rétablissement à la petite concentration a été affecté par la diminution du potentiel membranaire mitochondriale causée par l'augmentation de l'effet découplant de la propolis aux concentrations élevées.

Il est vrai que le Ca^{2+} et les ERO sont considérées comme les deux activateurs clés de la transition de perméabilité dans les lésions de l'IR (Morciano et al., 2015). Mais il est important de préciser que, la diminution du potentiel membranaire mitochondrial due au découplage augmente la probabilité d'ouverture du PTPm en raison de sa sensibilité au voltage, ce pore peut donc s'ouvrir par dépolarisation de la membrane mitochondriale (Bernardi, 1992; Pardo Andreu et al., 2015). L'effet de la propolis sur le PTPm suite à une ischémie froide prolongée ne paraît pas être lié aux ERO mais semble probablement avoir un lien avec le potentiel membranaire mitochondrial affecté par l'effet découplant modéré de la propolis. Cette hypothèse pourrait être confirmée en mesurant le potentiel membranaire mitochondrial en condition d'ischémie hypothermique. Il serait également complémentaire de tester l'effet de la propolis sur la libération du Ca^{2+} par les mitochondries durant l'ischémie étant donné que certains flavonoïdes peuvent activer directement l'uniport de Ca^{2+} mitochondrial et moduler la concentration en calcium intramitochondriale perturbée dans des conditions hypoxiques (Montero et al., 2004).

Nos résultats sont en ligne avec les travaux de Liao et al., et de Lu et al., qui ont révélé que le flavone de la plante *Bauhinia championii* et que l'orientine, flavonoïde de la plante *Phyllostachys nigra*, appliqués sur le même modèle d'hypoxie-réoxygénation (6h/12h) sur des cardiomyocytes H9c2, avait un effet protecteur en inhibant l'ouverture du PTPm, l'effondrement du potentiel membranaire mitochondrial et en réduisant la production des ERO (Lu et al., 2011 ; Liao et al., 2016). L'étude de Yuan et al., a également montré que la tilianine, flavonoïde de *Dracocephalum moldavica* L, a montré son effet protecteur de l'intégrité mitochondriale sur un modèle *in vivo* d'ischémie cardiaque régionale suivie de reperfusion. Cet effet est caractérisé par la réduction de la production des ERO, l'inhibition de l'ouverture du PTPm, la préservation de l'homéostasie du Ca^{2+} (Yuan et al., 2017). Une autre étude réalisée par Woodman et ses collaborateurs, a révélé que le traitement au 3',4'-dihydroxyflavonol au cours de l'ischémie cardiaque juste avant la reperfusion a rétabli la capacité de la mitochondrie à retenir le calcium avant l'ouverture du PTPm. Ce traitement a également inversé l'augmentation de la production mitochondriale des ERO ainsi que l'inhibition de la respiration au stade 3 induite par l'I-R (Woodman et al., 2014).

Pour mettre le point sur l'effet de la propolis quant aux trois paramètres mitochondriaux évalués, nous pouvons dire qu'en plus de son action antioxydante directe sur les ERO, la propolis a eu un effet découplant modéré de la phosphorylation oxydative à sa concentration la plus basse, ce découplage augmentait légèrement en fonction de la concentration de la propolis. Cette augmentation s'accompagne d'une diminution du potentiel membranaire mitochondrial ce qui induit d'une part une augmentation de l'ouverture du PTPm liée à l'accroissement de la concentration de la propolis et une diminution la production des ERO d'une autre part.

Par ailleurs, dans notre étude, les effets de la propolis sur la phosphorylation oxydative et sur l'ouverture du PTPm ont été obtenus suite à l'oxydation du substrat du complexe I (G/M) par la mitochondrie. Nos résultats sont assez convaincants pour pouvoir conclure l'effet cardioprotecteur de la propolis à l'échelle mitochondriale. Cependant, l'activité des différents complexes de la CRM représente un facteur limitant en cas d'altération dans la chaîne mitochondriale, comme c'est le cas en ischémie cardiaque (Suchalatha et al., 2007). L'utilisation de plusieurs substrats de la CRM (succinate, palmitoyl-L-carnitine qui est le principal substrat respiratoire des mitochondries cardiaques) ainsi qu'en présence de ses inhibiteurs (roténone, antimycine A) semble être nécessaire afin de tester toutes les

hypothèses concernant l'action de la propolis sur chaque composant de la CRM et bien élucider le lien entre l'ouverture du PTPm et la production des ERO dans notre modèle d'ischémie hypothermique prolongée. En effet, l'étude de Madungwe et ses collaborateurs a démontré l'impact opposé des ERO générées par la stimulation des complexes I, II et III après I-R. Il a été indiqué que la production des ERO du complexe I favorise l'ouverture du PTPm, tandis que les ERO produites au niveau du complexe III induisent un retard de l'ouverture du PTPm et pourraient vraisemblablement conduire à une cardioprotection (Madungwe et al., 2016).

En résumé, nos résultats démontrent qu'en plus de la capacité antioxydante directe des constituant de la propolis qui est proportionnelle à sa concentration, l'extrait de la propolis à la dose de 50µg/mL dissocie partiellement l'oxydation mitochondriale de la phosphorylation tout en protégeant cette dernière des dommages ischémiques, elle rétabli la capacité de rétention calcique mitochondriale. Par conséquent, ces résultats impliquent que la propolis peut réduire les lésions mitochondriales induites par l'ischémie froide et prolongée du cœur.

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail s'est proposé d'étudier l'effet préventif des flavonoïdes contenus dans l'extrait éthanolique de la propolis au cours d'ischémie myocardique normo-et hypothermique.

Il ressort clairement de notre étude que l'ischémie cardiaque qu'elle soit normothermique ou hypothermique, induit de considérables lésions cellulaires, touchant essentiellement l'intégrité mitochondriale. Ces dommages se répercutent sur l'intégrité du tissu cardiaque et sont étroitement liés à la production des ERO. Ce qui confirme l'implication du stress oxydant dans la physiopathologie de l'ischémie et de la reperfusion.

D'après nos résultats, il est également évident que l'ischémie froide prolongée affecte négativement la mitochondrie en inhibant la respiration à l'état 3 par diminution de l'activité de l'adénine translocase et en diminuant le coefficient de respiration mitochondriale respirant sur le substrat du complexe I. L'ischémie a également augmenté la production mitochondriale des ERO, mesurée par la production de H₂O₂, dans toutes les conditions de stimulation ou d'inhibition des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'effet négatif de l'ischémie froide prolongée est ressenti aussi au niveau de la capacité mitochondriale de rétention calcique traduite par l'augmentation de l'ouverture du PTPm.

Notre étude atteste également que le stress oxydant prend naissance en phase d'ischémie et même en basse température, avant la phase de reperfusion qui est connue pour la génération excessive des ERO.

Nos résultats ont prouvé que l'extrait de la propolis Algérienne possède une bonne capacité antioxydante. Dans les deux contextes expérimentaux à savoir, ischémie froide prolongée sans reperfusion et ischémie courte suivie de reperfusion. La propolis s'est montrée protectrice du myocarde ischémique contre les dommages dus au stress oxydant et restaure le statut antioxydant enzymatique et non enzymatique. La propolis protège également l'intégrité tissulaire altérée par l'ischémie en réduisant la libération des marqueurs de la fonction cardiaque dans le milieu de perfusion ou de préservation et en protégeant le tissu cardiaque de la nécrose.

Grâce à sa propriété de découplage léger, la propolis améliore à faible concentration la synthèse de l'ATP dans les mitochondries et protège le système de phosphorylation des dommages ischémiques. Elle diminue également la susceptibilité d'ouverture du PTPm lors d'une surcharge calcique.

La propolis, réduit efficacement la production des ERO par les complexes I et III des mitochondries suite à une ischémie cardiaque prolongée. L'effet antioxydant direct de la propolis est évident mais l'implication du changement du potentiel membranaire suite au découplage modéré, assuré par la propolis, semble être une hypothèse assez argumentée pour expliquer la réduction de la production des ERO. Cependant des tests supplémentaires et complémentaires, tels que la mesure du potentiel membranaire mitochondrial et l'évaluation de la libération du calcium mitochondrial, confirmerait une telle hypothèse.

Ces effets bénéfiques sur la fonction mitochondriale cardiaque après une ischémie cardiaque froide et prolongée sont susceptibles de contribuer aux actions cardioprotectrices de la propolis. Cependant la composition phénolique de la propolis est contaminée par des composés inconnus qui peuvent agir négativement sur la CRM. D'où la nécessité de purifier les composés flavonoïdiques et les standardiser selon leurs teneurs dans l'extrait de propolis, ce qui représente une limite de notre étude.

L'utilisation de la propolis dans les deux modèles hypothermique et normothermique d'ischémie cardiaque atteste que la propolis est un antioxydant non sensible à la température. Cela encourage l'utilisation future de produits naturels flavonoïdes pour prolonger la période de préservation et améliorer les conditions de l'organe préservé pour une meilleure reprise de son fonctionnement lors de sa transplantation.

En outre, nous avons prouvé que la propolis peut protéger le cœur pendant une période de préservation prolongée, dépassant la limite de temps maximale adoptée en clinique, sans que nous ayons pu reperfusionner le greffon cardiaque (soit en le perfusant *ex vivo* ou en le transplantant *in vivo*). Ceci représente une autre limite de notre étude.

Dans la suite de ce travail, il reste à déterminer si ces effets de la propolis peuvent être réalisés *in vivo*. Il serait alors, important de tester l'effet du traitement à cours ou à long termes des animaux par la propolis avant d'induire *in vivo* une ischémie régionale, par occlusion de la LAD, suivie de reperfusion. Cette évaluation serait encore plus complète en

mesurant, en plus des paramètres du stress oxydant, les paramètres hémodynamiques cardiaques, la taille de l'infarctus au niveau du cœur reperfusé et la mise en évidence des facteurs proapoptotiques au niveau cytosolique qui sont des indicateurs de l'incidence de l'apoptose en période de reperfusion.

Il serait intéressant de vérifier si la cardioprotection assurée par la propolis est due à l'effet synergique de l'ensemble de ses flavonoïdes ou non, en testant l'effet anti-ischémique isolé de chaque flavonoïde pur faisant partie de la composition de la propolis.

L'évaluation de l'effet protecteur des flavonoïdes, en utilisant la solution de Celsior, spécifique à la préservation hypothermique du cœur, et en assurant une période de reperfusion normothermique suivant la phase d'ischémie froide serait plus proche aux conditions de conservation cliniques du greffon cardiaque.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- Abe, M., Takiguchi, Y., Ichimaru, S., Tsuchiya, K., Wada, K., 2008. Comparison of the protective effect of N-acetylcysteine by different treatments on rat myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Pharmacol. Sci.* 106, 571–577.
- Addabbo, F., Montagnani, M., Goligorsky, M.S., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Hypertension* 53, 885–892.
- Ahlenstiel, T., Burkhardt, G., Kohler, H., Kuhlmann, M.K., 2006. Improved Cold Preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions : *Transplantation* 81, 231–239.
- Ahmed, R., Tanvir, E.M., Hossen, Md.S., Afroz, R., Ahmmed, I., Rumpa, N.-E.-N., Paul, S., Gan, S.H., Sulaiman, S.A., Khalil, Md.I., 2017. Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017, 1–11.
- Ahn, M., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., Nakayama, T., 2007. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem.* 101, 1383–1392.
- Akhlaghi, M., Bandy, B., 2009. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 309–317.
- Aldakkak, M., Stowe, D.F., Heisner, J.S., Riess, M.L., Camara, A.K.S., 2012. Adding ROS quenchers to cold K⁺ cardioplegia reduces superoxide emission during 2-hour global cold cardiac ischemia. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 17, 93–101.
- Aloutabi, G.Tu., Gashlan, H., Moselhy, S.S., Al-malki, A.L., Khan, J.A., 2017. Inv vivo possible cardioprotection action of pomegranate juice granatum and propolis against myocardial infarction induced in rats. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 14, 138–146.
- Alqayim, M.A.J., 2015. Propolis cardioprotective role from the impact of aluminium chloride in female rabbits. *Bas.J.Vet.Res.* Vol.14,136–149.
- Alyane, M., Kebsa, L.B.W., Boussenane, H.N., Rouibah, H., Lahouel, M., 2008. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak. J. Pharm. Sci.* 21, 201–209.
- Aniya, Y., Anders, M.W., 1989. Activation of rat liver microsomal glutathione S-transferase by reduced oxygen species. *J. Biol. Chem.* 264, 1998–2002.

- Argaud, L., Ovize, M., Robert, D., 2006. La mitochondrie : une cible incontournable de la cardioprotection du myocarde ischémié. *Réanimation* 15, 109–116.
- Armstrong, J.S., Whiteman, M., 2007. Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria. *Methods in cell biology* 80, 355–377.
- Assaly, R., de Tassigny, A. d'Anglemont, Paradis, S., Jacquin, S., Berdeaux, A., Morin, D., 2012. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia–reoxygenation in adult cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 675, 6–14.

B

- Bagchi, D., Wetscher, G.J., Bagchi, M., Hinder, P.R., Perdakis, G., Stohs, S.J., Hinder, R.A., Das, D.K., 1997. Interrelationship between cellular calcium homeostasis and free radical generation in myocardial reperfusion injury. *Chem. Biol. Interact.* 104, 65–85.
- Baidi, Z., 2011. Conséquences de l'ischémie/reperfusion sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial. *Sciences agricoles. Université de Grenoble.* 134p.
- Bak, I., Lekli, I., Juhasz, B., Nagy, N., Varga, E., Varadi, J., Gesztelyi, R., Szabo, G., Szendrei, L., Bacskay, I., Vecsernyes, M., Antal, M., Fesus, L., Boucher, F., de Leiris, J., Tosaki, A., 2006. Cardioprotective mechanisms of *Prunus cerasus* (sour cherry) seed extract against ischemia-reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 291, H1329–H1336.
- Bankova, V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J. Ethnopharmacol.* 100, 114–117.
- Bankova, V., Christoy, R., Stoev, G., Popov, S., 1992. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 607, 150–153.
- Bankova, V.S., de Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3–15.
- Barbarić, M., Mišković, K., Bojić, M., Lončar, M.B., Smolčić-Bubalo, A., Debeljak, Ž., Medić-Šarić, M., 2011. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *J. Ethnopharmacol.* 135, 772–778.
- Bayraktar, A., Erbaş, D., Akarca Dizakar, S.Ö., Gökteş, T., Ömeroğlu, S., Öz Oyar, E., 2019. The Effect of hepcidin on cardiac ischemia-reperfusion injury. *J. Invest. Surg.* 0,1–9.
- Bazmandegan, G., Boroushaki, M.T., Shamsizadeh, A., Ayoobi, F., Hakimizadeh, E., Allahtavakoli, M., 2017. Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced

- oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomed. Pharmacother.* 85, 503–510.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Assay of superoxide dismutase. *Anal. Biochem* 44, 276–287.
- Becker, L., 2004. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc. Res.* 61, 461–470.
- Becker, L.B., vanden Hoek, T.L., Shao, Z.-H., Li, C.-Q., Schumacker, P.T., 1999. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 277, H2240–H2246.
- Belzer, F.O., Ashby, B.S., Dunphy, J.E., 1967. 24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys. *The Lancet* 290, 536–539.
- Benguedouar, L., Boussenane, H.N., Wided, K., Alyane, M., Rouibah, H., Lahouel, M., 2008. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian J. Exp. Biol.* 46, 112–119.
- Benhabbouche, S., Crola da silva, C., Abrial, M., Ferrera, R., 2011. Base des phénomènes d'ischémie reperfusion et de la protection myocardique. *Ann. Fr. Anesth. Réanimation* 30, S2–S16.
- Bernardi, P., 1999. Mitochondrial Transport of Cations: Channels, Exchangers, and Permeability Transition. *Physiol. Rev.* 79, 1127–1155.
- Bernardi, P., 1992. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J. Biol. Chem.* 267, 8834–8839.
- Bernardi, P., Di Lisa, F., 2015. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78, 100–106.
- Bernatoniene, J., Kopustinskiene, D., Jakstas, V., Majiene, D., Baniene, R., Kuršvietiene, L., Masteikova, R., Savickas, A., Toleikis, A., Trumbeckaite, S., 2014. The effect of *Leonurus cardiaca* Herb extract and some of its flavonoids on mitochondrial oxidative phosphorylation in the heart. *Planta Med.* 80, 525–532.
- Bernatoniene, J., Majiene, D., Peciura, R., Laukeviciene, A., Bernatoniene, R., Mekas, T., Kasauskas, A., Kopustinskiene, D., 2011. The effect of *Ginkgo biloba* extract on mitochondrial oxidative phosphorylation in the normal and ischemic rat heart. *Phytother. Res.* 25, 1054–1060.

- Bernatoniene, J., Trumbeckaite, S., Majiene, D., Baniene, R., Baliutyte, G., Savickas, A., Toleikis, A., 2009. The effect of crataegus fruit extract and some of its flavonoids on mitochondrial oxidative phosphorylation in the heart. *Phytother. Res.* 23, 1701–1707.
- Blom, J.N., Lu, X., Arnold, P., Feng, Q., 2016. Myocardial infarction in neonatal mice, a model of cardiac regeneration. *J. Vis. Exp.* 111, 1–12.
- Bordoni, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Giordano, E., Guarnieri, C., Caldarera, C.M., Biagi, P.L., 2002. Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *J. Nutr. Biochem.* 13, 103–111.
- Borutaite, V., 2003. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 357–366.
- Borutaite, V., Toleikis, A., Brown, G.C., 2013. In the eye of the storm: mitochondrial damage during heart and brain ischaemia. *FEBS J.* 280, 4999–5014.
- Boussenane, H.N., Wided, K., Kheira, B., Hassiba, R., Lamia, B., Rhouati, S., Alyane, M., Zellagui, A., Lahouel, M., 2009. Disruption of mitochondrial membrane potential by ferulenol and restoration by propolis extract: Antiapoptotic role of propolis. *Acta Biol. Hung.* 60, 385–398.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, 1976. *Anal Biochem* 7, 248–254.
- Brophy, J.M., Bogaty, P., 2004. Primary angioplasty and thrombolysis are both reasonable options in acute myocardial infarction. *Ann. Intern. Med.* 141, 292–297.
- Búfalo, M.C., Figueiredo, A.S., de Sousa, J.P.B., Candeias, J.M.G., Bastos, J.K., Sforcin, J.M., 2009. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1669–1680.
- Buja, L.M., 2005. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Pathol.* 14, 170–175.
- Buja, L.M., Vander Heide, R.S., 2016. Pathobiology of ischemic heart disease: Past, present and future. *Cardiovasc. Pathol.* 25, 214–220.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36, 347–363.

C

- Cameron, A.M., Cornejo, J.F.B., 2015. Organ preservation review: history of organ preservation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 20, 146–151.
- Capano, M., Crompton, M., 2006. Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem. J.* 395, 57–64.
- Carmody, R.J., Cotter, T.G., 2001. Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Rep.* 6, 77–90.
- Chang, P.N., Mao, J.C., Huang, S.H., Ning, L., Wang, Z.J., On, T., Duan, W., Zhu, Y.Z., 2006. Analysis of cardioprotective effects using purified *Salvia miltiorrhiza* extract on isolated rat hearts. *J. Pharmacol. Sci.* 101, 245–249.
- Chang, W.-T., Shao, Z.-H., Yin, J.-J., Mehendale, S., Wang, C.-Z., Qin, Y., Li, J., Chen, W.-J., Chien, C.-T., Becker, L.B., Vanden Hoek, T.L., Yuan, C.-S., 2007. Comparative effects of flavonoids on oxidant scavenging and ischemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 566, 58–66.
- Charniot, J.-C., Bonnefont-Rousselot, D., Albertini, J.-P., Dever, S., Vignat, N., Nataf, P., Pavie, A., Monsuez, J.-J., Delattre, J., Artigou, J.-Y., 2010. Oxidative stress implication after prolonged storage donor heart with blood versus crystalloid cardioplegia and reperfusion versus static storage. *J. Surg. Res.* 160, 308–314.
- Chen, C.-H., Budas, G.R., Churchill, E.N., Disatnik, M.-H., Hurley, T.D., Mochly-Rosen, D., 2008. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 321, 1493–1495.
- Chen, C.H., Gray, M.O., Mochly-Rosen, D., 1999. Cardioprotection from ischemia by a brief exposure to physiological levels of ethanol: role of epsilon protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12784–12789.
- Chen, Qun, Camara, A.K.S., Stowe, D.F., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J., 2007. Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 292, C137–C147.
- Chen, Q., Lesnefsky, E.J., 2006. Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. *Free Radic. Biol. Med.* 40, 976–982.
- Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., Lesnefsky, E.J., 2007. Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *AJP Cell Physiol.* 294, C460–C466.

- Chen, Y.-C., Shen, S.-C., Lee, W.-R., Hou, W.-C., Yang, L.-L., Lee, T.J.F., 2001. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.* 82, 537–548.
- Chen, Y.-R., Zweier, J.L., 2014. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circ. Res.* 114, 524–537.
- Chen, Z., Siu, B., Ho, Y.S., Vincent, R., Chua, C.C., Hamdy, R.C., Chua, B.H., 1998. Overexpression of MnSOD protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in transgenic mice. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 2281–2289.
- Chien, S., Zhang, F., Niu, W., Tseng, M.T., Gray, L., 2000. Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins, low-potassium dextran, and Krebs-Henseleit solutions for hypothermic lung preservation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 119, 921–930.
- Chimenti, S., Carlo, E., Masson, S., Bai, A., Latini, R., 2004. Myocardial infarction: animal models. *Methods Mol. Med.* 98, 217–226.
- Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Sci. Technol.* 39, 756–761.
- Chouchani, E.T., Pell, V.R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S.Y., Robb, E.L., Logan, A., Nadtochiy, S.M., Ord, E.N.J., Smith, A.C., Eyassu, F., Shirley, R., Hu, C.-H., Dare, A.J., James, A.M., Rogatti, S., Hartley, R.C., Eaton, S., Costa, A.S.H., Brookes, P.S., Davidson, S.M., Duchon, M.R., Saeb-Parsy, K., Shattock, M.J., Robinson, A.J., Work, L.M., Frezza, C., Krieg, T., Murphy, M.P., 2014. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431–435.
- Chung, S., Yao, H., Caito, S., Hwang, J., Arunachalam, G., Rahman, I., 2010. Regulation of SIRT1 in cellular functions: Role of polyphenols. *Arch. Biochem. Biophys.* 501, 79–90.
- Clairborne, A., 1985. *CRC Handbook of methods for oxygen radical research.*, First edition. ed. R.A. Greenwald, Boca Raton.
- Clarke, S.J., Khaliulin, I., Das, M., Parker, J.E., Heesom, K.J., Halestrap, A.P., 2008. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ. Res.* 102, 1082–1090.

- Cobert, M.L., Peltz, M., West, L.M., Jessen, M.E., 2010. Importance of organ preservation solution composition in reducing myocardial edema during machine perfusion for heart transplantation. *Transplant. Proc.* 42, 1591–1594.
- Collins, M.J., Moainie, S.L., Griffith, B.P., Poston, R.S., 2008. Preserving and evaluating hearts with ex vivo machine perfusion: an avenue to improve early graft performance and expand the donor pool. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 34, 318–325.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V., 1998. Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61, 71–76.
- Cour, M., Argaud, L., 2010. Ischémie-reperfusion et protection cellulaire. *Réanimation* 19, 185–190.
- Cour, M., Loufouat, J., Paillard, M., Augeul, L., Goudable, J., Ovize, M., Argaud, L., 2011. Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur. Heart J.* 32, 226–235.
- Cuevas-Durán, R., Medrano-Rodríguez, J., Sánchez-Aguilar, M., Soria-Castro, E., Rubio-Ruiz, M., Del Valle-Mondragón, L., Sánchez-Mendoza, A., Torres-Narvaéz, J., Pastelín-Hernández, G., Ibarra-Lara, L., 2017. Extracts of *Crataegus oxyacantha* and *Rosmarinus officinalis* attenuate ischemic myocardial damage by decreasing oxidative stress and regulating the production of cardiac vasoactive agents. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2412.

D

- da Costa, M.F.B., Libório, A.B., Teles, F., Martins, C. da S., Soares, P.M.G., Meneses, G.C., Rodrigues, F.A. de P., Leal, L.K.A.M., Miron, D., Silva, A.H., Martins, A.M.C., 2015. Red propolis ameliorates ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine* 22, 787–795.
- Daleprane, J.B., Abdalla, D.S., 2013. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, 1–8.
- Daleprane, J.B., da Silva Freitas, V., Pacheco, A., Rudnicki, M., Faine, L.A., Dörr, F.A., Ikegaki, M., Salazar, L.A., Ong, T.P., Abdalla, D.S.P., 2012. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J. Nutr. Biochem.* 23, 557–566.

- Dare, A.J., Logan, A., Prime, T.A., Rogatti, S., Goddard, M., Bolton, E.M., Bradley, J.A., Pettigrew, G.J., Murphy, M.P., Saeb-Parsy, K., 2015. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ decreases ischemia-reperfusion injury in a murine syngeneic heart transplant model. *J. Heart Lung Transplant.* 34, 1471–1480.
- Das, D.K., Maulik, N., Moraru, I.I., 1995. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27, 181–193.
- de Groot, M.J., Coumans, W.A., Willemsen, P.H., van der Vusse, G.J., 1993. Substrate-induced changes in the lipid content of ischemic and reperfused myocardium. Its relation to hemodynamic recovery. *Circ. Res.* 72, 176–186.
- Devi, R., Banerjee, S.K., Sood, S., Dinda, A.K., Maulik, S.K., 2005. Extract from *Clerodendron colebrookianum* Walp protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic–reperfusion injury (IRI). *Life Sci.* 77, 2999–3009.
- Dhalla, N., 2000. Status of myocardial antioxidants in ischemia–reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 47, 446–456.
- Dilisa, F., Bernardi, P., 2006. Mitochondria and ischemia–reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. *Cardiovasc. Res.* 70, 191–199.
- Dong, L., Fan, Y., Shao, X., Chen, Z., 2011. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* 49, 3211–3216.
- Dorta, D.J., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Rodrigues, T., Prado, I.M.R., Helena, A.F.C., Uyemura, S.A., Santos, A.C., Curti, C., 2005. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem. Biol. Interact.* 152, 67–78.
- Douglas, B., Sawyer, M., 2011. Oxidative stress in heart failure: what are we missing? *Am. J. Med. Sci.* 342, 120–124.

E

- Ebel, D., Schlack, W., Comfeère, T., Preckel, B., Thämer, V., 1999. Effect of propofol on reperfusion injury after regional ischaemia in the isolated rat heart. *Br. J. Anaesth.* 83, 903–908.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.

F

- Falk, J.A., Aune, S.E., Kutala, V.K., Kuppusamy, P., Angelos, M.G., 2007. Inhibition of peroxynitrite precursors, NO and O₂, at the onset of reperfusion improves myocardial recovery. *Resuscitation* 74, 508–515.

- Ferrera, R., Benhabbouche, S., Bopassa, J.C., Li, B., Ovize, M., 2009. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 327–331.
- Fliss, H., Gattinger, D., 1996. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ. Res.* 79, 949–956.
- Florian, T., Necas, J., Bartosikova, L., Klusakova, J., Suchy, V., Naggara, E.B.E., Janostikova, E., Bartosik, T., 2006. Effects of prenylated isoflavones osajin and pomiferin in premedication on heart ischemia-reperfusion. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czechoslov.* 150, 93–100.
- Fornas, D., 2001. Solution de preservation d'organe : descriptif, statut réglementaire et enregistrement en europe. *Pharmacie. Université Claude Bernard – Lyon I.* 137p.
- Freitas, S.F., Shinohara, L., Sforcin, J.M., Guimarães, S., 2006. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 13, 170–175.
- G**
- Gadicherla, A.K., Stowe, D.F., Antholine, W.E., Yang, M., Camara, A.K.S., 2012. Damage to mitochondrial complex I during cardiac ischemia reperfusion injury is reduced indirectly by anti-anginal drug ranolazine. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 419–429.
- Galagudza, M., Blokhin, I., Shmonin, A., Mischenko, K., 2008. Reduction of myocardial ischemia-reperfusion injury with pre- and postconditioning: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cardiovasc. Hematol. Disord.-Drug Targets* 8, 47–65.
- Gao, E., Lei, Y.H., Shang, X., Huang, Z.M., Zuo, L., Boucher, M., Fan, Q., Chuprun, J.K., Ma, X.L., Koch, W.J., 2010. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse. *Circ. Res.* 107, 1445–1453.
- Gao, L., Hicks, M., MacDonald, P.S., 2005. Improved preservation of the rat heart with celsior solution supplemented with cariporide plus glyceryl trinitrate. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5, 1820–1826.
- Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie* 3, 162–169.
- Goldberg, I.J., Trent, C.M., Schulze, P.C., 2012. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab.* 15, 805–812.
- Granger, D.N., Rutili, G., McCord, J.M., 1981. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81, 22–29.
- Griffiths, E.J., Halestrap, A.P., 1995. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem. J.* 307, 93–98.

- Griffiths, E.J., Halestrap, A.P., 1993. Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25, 1461–1469.
- Grothusen, C., Friedrich, C., Attmann, T., Meinert, J., Ohnewald, E., Ulbricht, U., Huenges, K., Haneya, A., Frank, D., Graesner, J.-T., Schoettler, J., Cremer, J., 2017. Coronary artery bypass surgery within 48 hours after cardiac arrest due to acute myocardial infarction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 52, 297–302.
- Gu, K., Kin, S., Saitoh, Y., Nosaka, S., Sasaki, T., Yamauchi, M., Nakayama, K., 1996. HTK solution is more effective than UW solution for cardiac preservation. *Transplant. Proc.* 28, 1906–1907.
- Guler, A., Sahin, M.A., Yucel, O., Yokusoglu, M., Gamsizkan, M., Ozal, E., Demirkilic, U., Arslan, M., 2011. Proanthocyanidin prevents myocardial ischemic injury in adult rats. *Med. Sci. Monit.* 17, BR326–BR331.
- Gustafsson, A.B., Gottlieb, R.A., 2007. Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc. Res.* 77, 334–343.

H

- Ha, S.K., Lee, P., Park, J.A., Oh, H.R., Lee, S.Y., Park, J.-H., Lee, E.H., Ryu, J.H., Lee, K.R., Kim, S.Y., 2008. Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model. *Neurochem. Int.* 52, 878–886.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Halestrap, A., 2004. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion: a target for cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 61, 372–385.
- Halestrap, A.P., 2009. Mitochondria and reperfusion injury of the heart: a holey death but not beyond salvation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 113–121.
- Han, S.-Y., Li, H.-X., Ma, X., Zhang, K., Ma, Z.-Z., Tu, P.-F., 2009. Protective effects of purified safflower extract on myocardial ischemia in vivo and in vitro. *Phytomedicine* 16, 694–702.
- Haramaki, N., Stewart, D.B., Aggarwal, S., Ikeda, H., Reznick, A.Z., Packer, L., 1998. Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 329–339.
- Hauet, T., Eugene, M., 2008. A new approach in organ preservation: potential role of new polymers. *Kidney Int.* 74, 998–1003.

- Hayes, J.D., McLellan, L.I., 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.
- Holleyman, C.R., Larson, D.F., 2001. Apoptosis in the ischemic reperfused myocardium. *Perfusion* 16, 491–502.
- Hwa, J.S., Jin, Y.C., Lee, Y.S., Ko, Y.S., Kim, Y.M., Shi, L.Y., Kim, H.J., Lee, J.H., Ngoc, T.M., Bae, K.H., Kim, Y.S., Chang, K.C., 2012. 2-Methoxycinnamaldehyde from *Cinnamomum cassia* reduces rat myocardial ischemia and reperfusion injury in vivo due to HO-1 induction. *J. Ethnopharmacol.* 139, 605–615.
- Hyon, S.H., 2004. A non-frozen living tissue bank for allotransplantation using green tea polyphenols. *Yonsei Med. J.* 45, 1025.
- Hyon, S.-H., Kim, D.-H., Cui, W., Matsumura, K., Kim, J.-Y., Tsutsumi, S., 2006. Preservation of rat aortic tissue transplant with green tea polyphenols. *Cell Transplant.* 15, 881–883.
- I**
- Iwai, T., Tanonaka, K., Koshimizu, M., Takeo, S., 2000. Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischaemia in the rat heart. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1219–1227.
- J**
- Jahania, M.S., Sanchez, J.A., Narayan, P., Lasley, R.D., Mentzer, R.M., 1999. Heart preservation for transplantation: principles and strategies. *Ann. Thorac. Surg.* 68, 1983–1987.
- Jamieson, R.W., Friend, P.J., 2008. Organ reperfusion and preservation. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 221–235.
- Jeevanandam, V., 2010. Improving donor organ function—cold to warm preservation. *World J. Surg.* 34, 628–631.
- Jiang, J., Yuan, X., Wang, T., Chen, H., Zhao, H., Yan, X., Wang, Z., Sun, X., Zheng, Q., 2014. Antioxidative and cardioprotective effects of total flavonoids extracted from *Dracocephalum moldavica* L. against acute ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in isolated rat heart. *Cardiovasc. Toxicol.* 14, 74–82.
- Jing, L., Yao, L., Zhao, M., Peng, L., Liu, M., 2018. Organ preservation: from the past to the future. *Acta Pharmacol. Sin.* 39, 845–857.

K

- Kajihara, N., Morita, S., Tanoue, Y., Boku, N., Eto, M., Nishida, T., Tominaga, R., 2006. The UW solution has greater potential for longer preservation periods than the Celsior solution: comparative study for ventricular and coronary endothelial function after 24-h heart preservation. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 29, 784–789.
- Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W.A., Sonnenblick, E.H., Krajewski, S., Reed, J.C., Olivetti, G., Anversa, P., 1996. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 74, 86–107.
- Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M., Korthuis, R.J., 2012. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury, in: *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 298, 229–317.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinis, I., Karathanos, V.T., 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem.* 116, 452–461.
- Keener, J.P., 2003. Model for the Onset of Fibrillation following coronary artery occlusion. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 14, 1225–1232.
- Kevelaitis, E., Oubénaissa, A., Mouas, C., Peynet, J., Menasché, P., 2001. Ischemic preconditioning with opening of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels or Na⁺/H⁺ exchange inhibition : Which is the best protective strategy for heart transplants ? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 121, 155–162.
- Kida, M., Fujiwara, H., Ishida, M., Kawai, C., Ohura, M., Miura, I., Yabuuchi, Y., 1991. Ischemic preconditioning preserves creatine phosphate and intracellular pH. *Circulation* 84, 2495–2503.
- Koechlin-Ramonatxo, C., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr. Clin. Métabolisme* 20, 165–177.
- Kohen, R., Nyska, A., 2002. Invited review: Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620–650.
- Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., Salih, B., 2002. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chem.* 78, 213–217.

- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Groot, A. de, Evstatieva, L.N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* 13, 8–17.
- Korge, P., John, S.A., Calmettes, G., Weiss, J.N., 2017. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex II. *J. Biol. Chem.* 292, 9896–9905.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15–18.
- Kroese, L.J., Scheffer, P.G., 2014. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr. Atheroscler. Rep.* 16, 452.
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Sci. World J.* 2013, 1–16.
- Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., Nakayama, T., 2004. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa, Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 260–262.
- Kunji, E.R.S., Aleksandrova, A., King, M.S., Majd, H., Ashton, V.L., Cerson, E., Springett, R., Kibalchenko, M., Tavoulari, S., Crichton, P.G., Ruprecht, J.J., 2016. The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2379–2393.
- Kurian, G.A., Suryanarayanan, S., Raman, A., Padikkala, J., 2010. Antioxidant effects of ethyl acetate extract of *Desmodium gangeticum* root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts. *Chin. Med.* 5, 1–7.

L

- Lagoa, R., Graziani, I., Lopez-Sanchez, C., Garcia-Martinez, V., Gutierrez-Merino, C., 2011. Complex I and cytochrome c are molecular targets of flavonoids that inhibit hydrogen peroxide production by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 1562–1572.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J.P., 2004. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathol. Biol.* 52, 314–322.

- Lahouel, M., Boutabet, K., Kebsa, W., Alyane, M., 2011. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian J. Nephrol.* 21, 101–106.
- Lambert, A.J., Brand, M.D., 2004. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.* 382, 511–517.
- Lan, X., Wang, W., Li, Q., Wang, J., 2016. The natural flavonoid pinocembrin: molecular targets and potential therapeutic applications. *Mol. Neurobiol.* 53, 1794–1801.
- Laskar, R.A., Sk, I., Roy, N., Begum, N.A., 2010. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem.* 122, 233–237.
- Lassnigg, A., Punz, A., Barker, R., Keznickl, P., Manhart, N., Roth, E., Hiesmayr, M., 2003. Influence of intravenous vitamin E supplementation in cardiac surgery on oxidative stress: a double-blinded, randomized, controlled study. *Br. J. Anaesth.* 90, 148–154.
- Lauzier, B., Sicard, P., Bouchot, O., Delemasure, S., Menetrier, F., Moreau, D., Vergely, C., Rochette, L., 2007. After four hours of cold ischemia and cardioplegic protocol, the heart can still be rescued with postconditioning: *Transplantation* 84, 1474–1482.
- Lebeau, J., Nevriere, R., Cotelle, N., 2001. Beneficial effects of different flavonoids, on functional recovery after ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 23–27.
- Lee, Y.-T., Don, M.-J., Hung, P.-S., Shen, Y.-C., Lo, Y.-S., Chang, K.-W., Chen, C.-F., Ho, L.-K., 2005. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer Lett.* 223, 19–25.
- Lesnefsky, E.J., Chen, Q., Slabe, T.J., Stoll, M.S.K., Minkler, P.E., Hassan, M.O., Tandler, B., Hoppel, C.L., 2004. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 287, H258–H267.
- Lesnefsky, E.J., Chen, Q., Tandler, B., Hoppel, C.L., 2017. Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia-reperfusion: implications for novel therapies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 57, 535–565.
- Lesnefsky, E.J., Hoppel, C.L., 2008. Cardiolipin as an oxidative target in cardiac mitochondria in the aged rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1020–1027.
- Lesnefsky, E.J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J., Hoppel, C.L., 2001a. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia–reperfusion, aging, and heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1065–1089.

- Lesnefsky, E.J., Slabe, T.J., Stoll, M.S.K., Minkler, P.E., Hoppel, C.L., 2001b. Myocardial ischemia selectively depletes cardiolipin in rabbit heart subsarcolemmal mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H2770–H2778.
- Lesnefsky, E.J., Tandler, B., Ye, J., Slabe, T.J., Turkaly, J., Hoppel, C.L., 1997. Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 273, H1544–H1554.
- Li, H.Y., Hou, F.F., Zhang, X., Chen, P.Y., Liu, S.X., Feng, J.X., Liu, Z.Q., Shan, Y.X., Wang, G.B., Zhou, Z.M., Tian, J.W., Xie, D., 2007. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 528–538.
- Liao, P., Sun, G., Zhang, C., Wang, M., Sun, Y., Zhou, Y., Sun, X., Jian, J., 2016. Bauhinia championii flavone attenuates hypoxia-reoxygenation induced apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by improving mitochondrial dysfunction. *Molecules* 21, 1469.
- Lin, J., Rexrode, K.M., Hu, F., Albert, C.M., Chae, C.U., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E., 2007. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am. J. Epidemiol.* 165, 1305–1313.
- Liu, R., Gao, M., Yang, Z.-H., Du, G.-H., 2008. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia–reperfusion both in vivo and in vitro. *Brain Res.* 1216, 104–115.
- Liu, S.X., Hou, F.F., Guo, Z.J., Nagai, R., Zhang, W.R., Liu, Z.Q., Zhou, Z.M., Zhou, M., Xie, D., Wang, G.B., Zhang, X., 2006. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1156–1162.
- Lo Iacono, L., Boczkowski, J., Zini, R., Salouage, I., Berdeaux, A., Motterlini, R., Morin, D., 2011. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) uncouples mitochondrial respiration and modulates the production of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1556–1564.
- Logue, S., Gustafsson, A., Samali, A., Gottlieb, R., 2005. Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 21–33.
- Lotfy, M., 2006. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7, 22–31.
- Lotito, S.B., Actis-Goretta, L., Renart, M.L., Caligiuri, M., Rein, D., Schmitz, H.H., Steinberg, F.M., Keen, C.L., Fraga, C.G., 2000. Influence of oligomer chain length

- on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 945–951.
- Lowalekar, S.K., Cao, H., Lu, X.-G., Treanor, P.R., Thatte, H.S., 2014. Sub-normothermic preservation of donor hearts for transplantation using a novel solution, Somah: a comparative pre-clinical study. *J. Heart Lung Transplant.* 33, 963–970.
- Lu, N., Sun, Y., Zheng, X., 2011. Orientin-induced cardioprotection against reperfusion is associated with attenuation of mitochondrial permeability transition. *Planta Med.* 77, 984–991.
- Lungkaphin, A., Pongchaidecha, A., Palee, S., Arjinajarn, P., Pompimon, W., Chattipakorn, N., 2015. Pinocembrin reduces cardiac arrhythmia and infarct size in rats subjected to acute myocardial ischemia/reperfusion. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 40, 1031–1037.
- M**
- Madungwe, N.B., Zilberstein, N.F., Feng, Y., Bopassa, J.C., 2016. Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 6, 93–108.
- Mair, J., 1999. Tissue release of cardiac markers : from physiology to clinical applications. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37, 1077–1084.
- Malesev, D., Kuntic, V., 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *J. Serbian Chem. Soc.* 72, 921–939.
- Marchetti, P., 2005. L'apoptose : bases fondamentales et applications médicales. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 33, 632–641.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R., 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéiologie* 51, 304–315.
- Matsui, T., Tao, J., del Monte, F., Lee, K.-H., Li, L., Picard, M., Force, T.L., Franke, T.F., Hajjar, R.J., Rosenzweig, A., 2001. Akt activation preserves cardiac function and prevents injury after transient cardiac ischemia in vivo. *Circulation* 104, 330–335.
- McFalls, E.O., Liem, D., Schoonderwoerd, K., Lamers, J., Sluiter, W., Duncker, D., 2003. Mitochondrial function: the heart of myocardial preservation. *J. Lab. Clin. Med.* 142, 141–148.

- Menasché, P., Pradier, F., Peynet, J., Grousset, C., Mouas, C., Bloch, G., Piwnica, A., 1991. Limitation of free radical injury by reduced glutathione: an effective means of improving the recovery of heart transplants. *Transplant. Proc.* 23, 2440–2442.
- Menasché, P., Termignon, J.L., Pradier, F., Grousset, C., Mouas, C., Alberici, G., Weiss, M., Piwnica, A., Bloch, G., 1994. Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* 8, 207–213.
- Minasian, S.M., Galagudza, M.M., Dmitriev, Y.V., Karpov, A.A., Vlasov, T.D., 2015. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 20, 510–519.
- Mishra, B., Priyadarsini, K.I., Kumar, M.S., Unnikrishnan, M.K., Mohan, H., 2003. Effect of O-glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 2677–2685.
- Mochizuki, S., Jiang, C., 1998. Na⁺/Ca⁺⁺ exchanger and myocardial ischemia/reperfusion. *Jpn. Heart J.* 39, 707–714.
- Mohanty, J.G., Jaffe, J.S., Schulman, E.S., Raible, D.G., 1997. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J. Immunol. Methods* 202, 133–141.
- Monassier, J.P., 2008. Reperfusion injury in acute myocardial infarction. From bench to cath lab. Part I: Basic considerations. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 101, 491–500.
- Montero, M., Lobatón, C.D., Hernández-Sanmiguel, E., Santodomingo, J., Vay, L., Moreno, A., Alvarez, J., 2004. Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant flavonoids. *Biochem. J.* 384, 19–24.
- Morciano, G., Giorgi, C., Bonora, M., Punzetti, S., Pavasini, R., Wieckowski, M.R., Campo, G., Pinton, P., 2015. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78, 142–153.
- Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L., 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3482–3485.
- Morin, D., Assaly, R., Paradis, S., Berdeaux, A., 2009. Inhibition of Mitochondrial Membrane Permeability as a Putative Pharmacological Target for Cardioprotection. *Curr. Med. Chem.* 16, 4382–4398.
- Morin, D., Hauet, T., Spedding, M., Tillement, J.-P., 2001. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49, 151–174.

- Morin, D., Zini, R., Ligeret, H., Neckameyer, W., Labidalle, S., Tillement, J.-P., 2003. Dual effect of ebselen on mitochondrial permeability transition. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1643–1651.
- Moron, M., Depierre, J., Mannervik, B., 1979. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver. *Biochim. Biophys. Acta* 582, 67–78.
- Mühlbacher, F., Langer, F., Mittermayer, C., 1999. Preservation solutions for transplantation. *Transplant. Proc.* 31, 2069–2070.
- Murphy, E., Steenbergen, C., 2011. What makes the mitochondria a killer? Can we condition them to be less destructive? *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1302–1308.
- Murphy, M.P., 2016. Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1219–1226.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A., 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74, 1124–1136.
- N*
- Nagata, H., Takekoshi, S., Takagi, T., Honma, T., Watanabe, K., 1999. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 24, 1–11.
- Nazareth, W., 1991. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 23, 1351–1354.
- Neviere, R., 2008. Physiopathologie mitochondriale et syndrome septique. *Réanimation* 17, 185–191.
- Noeman, S.A., Hamooda, H.E., Baalash, A.A., 2011. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. *Diabetol. Metab. Syndr.* 3, 1–8.
- Nohl, H., Jordan, W., 1980. The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur. J. Biochem.* 111, 203–210.
- Nygren, A., Baczko, I., Giles, W.R., 2006. Measurements of electrophysiological effects of components of acute ischemia in Langendorff-perfused rat hearts using voltage-sensitive dye mapping. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 17, S113–S123.

O

- Obame, F.N., Plin-Mercier, C., Assaly, R., Zini, R., Dubois-Rande, J.L., Berdeaux, A., Morin, D., 2008. Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase kinase 3 , SB216763 [3-(2,4-dichlorophenyl)-4(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 252–258.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Oriyanhan, W., Yamazaki, K., Miwa, S., Takaba, K., Ikeda, T., Komeda, M., 2005. Taurine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis in prolonged hypothermic rat heart preservation. *Heart Vessels* 20, 278–285.
- Orsatti, C.L., Missima, F., Pagliarone, A.C., Sforcin, J.M., 2010. Th1/Th2 cytokines' expression and production by propolis-treated mice. *J. Ethnopharmacol.* 129, 314–318.
- Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., 2002. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1259–1263.

P

- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Federici, A., Ruggiero, F.M., 2004. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ. Res.* 94, 53–59.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Di Venosa, N., Serena, D., Ruggiero, F.M., 1999. Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 42–50.
- Paraidathathu, T., de Groot, H., Kehrer, J.P., 1992. Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 289–297.
- Pardo Andreu, G.L., Reis, F.H.Z., Dalalio, F.M., Nuñez Figueredo, Y., Cuesta Rubio, O., Uyemura, S.A., Curti, C., Alberici, L.C., 2015. The cytotoxic effects of brown Cuban propolis depend on the nemorosone content and may be mediated by mitochondrial uncoupling. *Chem. Biol. Interact.* 228, 28–34.

- Park, C.-O., Xiao, X.-H., Allen, D.G., 1999. Changes in intracellular Na⁺ and pH in rat heart during ischemia: role of Na⁺/H⁺ exchanger. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 276, H1581–H1590.
- Park, T.-S., Yamashita, H., Blaner, W.S., Goldberg, I.J., 2007. Lipids in the heart: a source of fuel and a source of toxins: *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 277–282.
- Parsons, R.F., Guarrera, J.V., 2014. Preservation solutions for static cold storage of abdominal allografts: which is best? *Curr. Opin. Organ Transplant.* 19, 100–107.
- Pasdois, P., Beauvoit, B., Tariosse, L., Vinassa, B., Bonoron-Adèle, S., Santos, P.D., 2006. MitoK ATP -dependent changes in mitochondrial volume and in complex II activity during ischemic and pharmacological preconditioning of langendorff-perfused rat heart. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 101–112.
- Paulis, D.D., 2011. Régulation des fonctions mitochondriales dans la cardioprotection : spécificité du rat. *Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I.* 235p.
- Pei, H., Yang, Yi, Zhao, H., Li, X., Yang, D., Li, D., Yang, Yongjian, 2016. The role of mitochondrial functional proteins in ROS production in ischemic heart diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–8.
- Pell, V.R., Chouchani, E.T., Murphy, M.P., Brookes, P.S., Krieg, T., 2016. Moving forwards by blocking back-flow: the yin and yang of MI therapy. *Circ. Res.* 118, 898–906.
- Perrelli, M.-G., Pagliaro, P., Penna, C., 2011. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J. Cardiol.* 3, 186–200.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Di Venosa, N., Paradies, G., 2003. Decreased complex III activity in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion: role of reactive oxygen species and cardiolipin. *FASEB J.* 17, 714–716.
- Philipp, S., Cohen, M.V., Downey, J.M., 2005. Animal models for the study of myocardial protection against ischemia. *Drug Discov. Today Dis. Models* 2, 219–225.
- Piper, H.M., Noll, T., Siegmund, B., 1994. Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial cell. *Cardiovasc. Res.* 28, 1–15.
- Piper, H.M., Sezer, O., Schleyer, M., Schwartz, P., Hütter, J.F., Spieckermann, P.G., 1985. Development of ischemia-induced damage in defined mitochondrial subpopulations. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17, 885–896.
- Poston, R.S., Gu, J., Prastein, D., Gage, F., Hoffman, J.W., Kwon, M., Azimzadeh, A., Pierson, R.N., Griffith, B.P., 2004. Optimizing donor heart outcome after prolonged

storage with endothelial function analysis and continuous perfusion. *Ann. Thorac. Surg.* 78, 1362–1370.

Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523.

Q

Qiao, Z., Ma, J., Liu, H., 2011. Evaluation of the antioxidant potential of salvia miltiorrhiza ethanol extract in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Molecules* 16, 10002–10012.

Qin, C.X., Williams, S.J., Woodman, O.L., 2011. Antioxidant activity contributes to flavonol cardioprotection during reperfusion of rat hearts. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1437–1444.

Quinlan, C.L., Orr, A.L., Perevoshchikova, I.V., Treberg, J.R., Ackrell, B.A., Brand, M.D., 2012. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J. Biol. Chem.* 287, 27255–27264.

R

Rice-Evans, C., 2004. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 827–828.

Robin, M.-A., 2005. Implications physiopathologiques des cytochromes P450. *Hépatogastro* 12, 241–249.

Rodrigo, R., Prieto, J.C., Castillo, R., 2013. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus *n* –3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clin. Sci.* 124, 1–15.

Rodríguez, J.V., Mamprin, M.E., Guibert, E.E., Labadié, G., 1995. Protective effect of glutathione (GSH) over glutathione monoethyl-ester (GSH-E) on cold preservation of isolated rat liver cells. *Cell Transplant.* 4, 245–251.

Rodríguez, J.V., Mamprin, M.E., Mediavilla, M.G., Guibert, E.E., 1998. Glutathione movements during cold preservation of rat hepatocytes. *Cryobiology* 36, 236–244.

Rouslin, W., 1983. Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 244, H743–H748.

Rudd, D.M., Dobson, G.P., 2011. Eight hours of cold static storage with adenosine and lidocaine (Adenocaine) heart preservation solutions: toward therapeutic suspended animation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 142, 1552–1561.

S

- Saad, M.A., Abdel Salam, R.M., Kenawy, S.A., Attia, A.S., 2015. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion. *Pharmacol. Rep.* 67, 115–122.
- Sadek, H.A., Szweda, P.A., Szweda, L.I., 2004. Modulation of mitochondrial complex I activity by reversible Ca^{2+} and NADH mediated superoxide anion dependent inhibition. *Biochemistry* 43, 8494–8502.
- Sahin, M.A., Yucel, O., Guler, A., Doganci, S., Jahollari, A., Cingoz, F., Arslan, S., Gamsizkan, M., Yaman, H., Demirkilic, U., 2011. Is there any cardioprotective role of Taurine during cold ischemic period following global myocardial ischemia? *J. Cardiothorac. Surg.* 6, 1–7.
- Saija, A., Scalese, M., Lanza, M., Marzullo, D., Bonina, F., Castelli, F., 1995. Flavonoids as antioxidant agents: Importance of their interaction with biomembranes. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 481–486.
- Sam, F., Kerstetter, D.L., Pimental, D.R., Mulukutla, S., Tabae, A., Bristow, M.R., Colucci, W.S., Sawyer, D.B., 2005. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J. Card. Fail.* 11, 473–480.
- Sandoval-Acuña, C., Ferreira, J., Speisky, H., 2014. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Arch. Biochem. Biophys.* 559, 75–90.
- Sandoval-Acuña, C., Lopez-Alarcón, C., Aliaga, M.E., Speisky, H., 2012. Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action. *Chem. Biol. Interact.* 199, 18–28.
- Schewe, T., 1995. Molecular actions of Ebselen-an antiinflammatory antioxidant. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 26, 1153–1169.
- Schipper, D.A., Marsh, K.M., Ferng, A.S., Duncker, D.J., Laman, J.D., Khalpey, Z., 2016. The critical role of bioenergetics in donor cardiac allograft preservation. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 9, 176–183.
- Schneeberger, S., Kuznetsov, A.V., Seiler, R., Renz, O., Meusburger, H., Mark, W., Brandacher, G., Margreiter, R., Gnaiger, E., 2008. Mitochondrial ischemia-reperfusion injury of the transplanted rat heart : improved protection by preservation versus cardioplegic solutions. *Shock* 30, 365–371.

- Scolletta, S., Biagioli, B., 2010. Energetic myocardial metabolism and oxidative stress: Let's make them our friends in the fight against heart failure. *Biomed. Pharmacother.* 64, 203–207.
- Selvaraj, P., Pugalendi, K.V., 2010. Hesperidin, a flavanone glycoside, on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental myocardial ischemic rats. *Redox Rep.* 15, 217–223.
- Sforcin, J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 113, 1–14.
- Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253–260.
- Sforcin, J.M., Fernandes, A., Lopes, C.A., Bankova, V., Funari, S.R., 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 73, 243–249.
- Sforcin, J.M., Fernandes Júnior, A., Lopes, C.A.M., Funari, S.R.C., Bankova, V., 2001. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J. Venom. Anim. Toxins* 7, 139–144.
- Shan, X.Q., Aw, T.Y., Jones, D.P., 1990. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.* 47, 61–71.
- Shanmuganathan, S., Hausenloy, D.J., Duchon, M.R., Yellon, D.M., 2005. Mitochondrial permeability transition pore as a target for cardioprotection in the human heart. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 289, H237–H242.
- Sheu, S.-S., Nauduri, D., Anders, M.W., 2006. Targeting antioxidants to mitochondria: A new therapeutic direction. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 256–265.
- Shi, M., He, W., Liu, Y., Li, X., Yang, S., Xu, Q., 2013. Protective effect of total phenylethanoid glycosides from *Monochasma savatieri* Franch on myocardial ischemia injury. *Phytomedicine* 20, 1251–1255.
- Shi, S., Xue, F., 2016. Current antioxidant treatments in organ transplantation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–9.
- Shimazawa, M., Chikamatsu, S., Morimoto, N., Mishima, S., Nagai, H., Hara, H., 2005. Neuroprotection by Brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2, 201–207.
- Shlafer, M., Kane, P.F., Kirsh, M.M., 1982. Effects of dimethyl sulfoxide on the globally ischemic heart: Possible general relevance to hypothermic organ preservation. *Cryobiology* 19, 61–69.

- Simão, F., Matté, A., Breier, A.C., Kreutz, F., Trindade, V.M.T., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2013. Resveratrol prevents global cerebral ischemia-induced decrease in lipid content. *Neurol. Res.* 35, 59–64.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299, 152–178.
- Skemiene, K., Liobikas, J., Borutaite, V., 2015. Anthocyanins as substrates for mitochondrial complex I - protective effect against heart ischemic injury. *FEBS J.* 282, 963–971.
- Solaini, G., Harris, D.A., 2005. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem. J.* 390, 377–394.
- Southard, J.H., Belzer, F.O., 1995. Organ preservation. *Annu. Rev. Med.* 46, 235–247.
- Staat, P., Rioufol, G., Piot, C., Cottin, Y., Cung, T.T., L’Huillier, I., Aupetit, J.-F., Bonnefoy, E., Finet, G., André-Fouët, X., Ovize, M., 2005. Postconditioning the human heart. *Circulation* 112, 2143–2148.
- Strobel, N.A., Fassett, R.G., Marsh, S.A., Coombes, J.S., 2011. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int. J. Cardiol.* 147, 191–201.
- Suchalatha, S., Srinivasan, P., Devi, C.S.S., 2007. Effect of *T. chebula* on mitochondrial alterations in experimental myocardial injury. *Chem. Biol. Interact.* 169, 145–153.
- Sudheesh, N.P., Ajith, T.A., Ramnath, V., Janardhanan, K.K., 2010. Therapeutic potential of *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst. against the declined antioxidant status in the mitochondria of post-mitotic tissues of aged mice. *Clin. Nutr.* 29, 406–412.
- Suleiman, M., Halestrap, A.P., Griffiths, E.J., 2001. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol. Ther.* 89, 29–46.
- Suszynski, T.M., Rizzari, M.D., Scott, W.E., Tempelman, L.A., Taylor, M.J., Papas, K.K., 2012. Persufflation (or gaseous oxygen perfusion) as a method of organ preservation. *Cryobiology* 64, 125–143.
- Szewczyk, A., 2002. Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol. Rev.* 54, 101–127.

T

- Tan-no, K., Nakajima, T., Shoji, T., Nakagawasai, O., Niiijima, F., Ishikawa, M., Endo, Y., Sato, T., Satoh, S., Tadano, T., 2006. Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced mouse paw edema. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 96–99.

- Testai, L., 2015. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardioprotection. *Life Sci.* 135, 68–76.
- Testai, L., Martelli, A., Cristofaro, M., Breschi, M.C., Calderone, V., 2013. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts: Cardioprotective effects of flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 750–756.
- Testai, L., Rapposelli, S., Martelli, A., Breschi, M.C., Calderone, V., 2015. Mitochondrial potassium channels as pharmacological target for cardioprotective drugs. *Med. Res. Rev.* 35, 520–553.
- Tillou, X., Thuret, R., Doerfler, A., 2014. Ischemia/Reperfusion during normothermic perfusion. *Prog. En Urol.* 24, S51–S55.
- Trachtenberg, B.H., Hare, J.M., 2009. Biomarkers of Oxidative Stress in Heart Failure. *Heart Fail. Clin.* 5, 561–577.
- Trumbeckaite, S., Bernatoniene, J., Majiene, D., Jakštas, V., Savickas, A., Toleikis, A., 2006. The effect of flavonoids on rat heart mitochondrial function. *Biomed. Pharmacother.* 60, 245–248.
- Tsutsui, H., 2006. Mitochondrial oxidative stress and heart failure. *Intern. Med.* 45, 809–813.

V

- Vanden Hoek, T.L., Li, C., Shao, Z., Schumacker, P.T., Becker, L.B., 1997. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 2571–2583.
- Venardos, K., Harrison, G., Headrick, J., Perkins, A., 2004. Selenium supplementation and ischemia–reperfusion injury in rats. *Redox Rep.* 9, 317–320.
- Vreugdenhil, P.K., Belzer, F.O., Southard, J.H., 1991. Effect of cold storage on tissue and cellular glutathione. *Cryobiology* 28, 143–149.

W

- Wagner, F.M., 2011. Donor heart preservation and perfusion. *Appl. Cardiopulm. Pathophysiol.* 15, 198–206.
- Wang, K., Hu, L., Jin, X.-L., Ma, Q.-X., Marcucci, M.C., Netto, A.A.L., Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya, Huang, S., Ren, W.-K., Conlon, M.A., Topping, D.L., Hu, F.-L., 2015. Polyphenol-rich propolis extracts from China and Brazil exert anti-

- inflammatory effects by modulating ubiquitination of TRAF6 during the activation of NF- κ B. *J. Funct. Foods* 19, 464–478.
- Weiss, J.N., Korge, P., Honda, H.M., Ping, P., 2003. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ. Res.* 93, 292–301.
- White, C.W., Messer, S.J., Large, S.R., Conway, J., Kim, D.H., Kutsogiannis, D.J., Nagendran, J., Freed, D.H., 2018. Transplantation of hearts donated after circulatory death. *Front. Cardiovasc. Med.* 5, 8.
- Wiedemann, D., Schachner, T., Bonaros, N., Dorn, M., Andreas, M., Kocher, A., Kuznetsov, A., 2013. Impact of cold ischemia on mitochondrial function in porcine hearts and blood vessels. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 22042–22051.
- Wilhelm, M.J., Pratschke, J., Laskowski, I., Tilney, N.L., 2003. Ischemia and reperfusion injury. *Transplant. Rev.* 17, 140–157.
- Williams, H., King, N., Griffiths, E.J., Suleiman, M.-S., 2001. Glutamate-loading stimulates metabolic flux and improves cell recovery following chemical hypoxia in isolated cardiomyocyte. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 2109–2119.
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Zingraff, J., Jungers, P., Descamps-Latscha, B., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 49, 1304–1313.
- Woo, Y.J., Zhang, J.C., Vijayasarathy, C., Zwacka, R.M., Englehardt, J.F., Gardner, T.J., Sweeney, H.L., 1998. Recombinant adenovirus-mediated cardiac gene transfer of superoxide dismutase and catalase attenuates postischemic contractile dysfunction. *Circulation* 98, II255-260.
- Woodman, O.L., Long, R., Pons, S., Eychenne, N., Berdeaux, A., Morin, D., 2014. The cardioprotectant 3',4'-dihydroxyflavonol inhibits opening of the mitochondrial permeability transition pore after myocardial ischemia and reperfusion in rats. *Pharmacol. Res.* 81, 26–33.
- Y**
- Yang, Q., He, G.-W., 2005. Effect of Cardioplegic and organ preservation solutions and their components on coronary endothelium-derived relaxing factors. *Ann. Thorac. Surg.* 80, 757–767.
- Yao, Y., Chen, L., Xiao, J., Wang, C., Jiang, W., Zhang, R., Hao, J., 2014. Chrysin protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice through attenuation of oxidative stress and inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 20913–20926.

- Yeginsu, A., Ergin, M., 2009. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in cold ischemic lung preservation. *Exp. Clin. Transplant.* 7, 94–98.
- Yin, Y., Guan, Y., Duan, J., Wei, G., Zhu, Y., Quan, W., Guo, C., Zhou, D., Wang, Y., Xi, M., Wen, A., 2013. Cardioprotective effect of Danshensu against myocardial ischemia/reperfusion injury and inhibits apoptosis of H9c2 cardiomyocytes via Akt and ERK1/2 phosphorylation. *Eur. J. Pharmacol.* 699, 219–226.
- Ytrehus, K., 2006. Models of myocardial ischemia. *Drug Discov. Today Dis. Models* 3, 263–271.
- Yuan, X., Theruvath, A.J., Ge, X., Floerchinger, B., Jurisch, A., García-Cardena, G., Tullius, S.G., 2010. Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. *Transpl. Int.* 23, 561–570.
- Yuan, Y., Cao, W., Hong, Y., Guo, X., Wang, Yanfang, Wang, Yangyang, Wang, X., Hu, P., 2017. Tiliainin pretreatment prevents myocardial ischemia-reperfusion injury via preservation of mitochondrial function in rat heart. *Phytomedicine* 34, 106–114.
- Z**
- Zhang, S., Du, J., Jin, H., Li, W., Liang, Y., Geng, B., Li, S., Zhang, C., Tang, C., 2009. Endogenous sulfur dioxide aggravates myocardial injury in isolated rat heart with ischemia and reperfusion: *Transplantation* 87, 517–524.
- Zhang, S., Yang, J.H., Yu, F., Zhao, J., Jiang, P., Chang, L., Tang, C., Xu, J., 2006. Protective role of 3-Nitro-N-methyl-salicylamide on isolated rat heart during 4 hours of cold storage and reperfusion. *Transplant. Proc.* 38, 1247–1252.
- Zhao, Y., Zhao, B., 2010. Protective effect of natural antioxidants on heart against ischemia-reperfusion damage. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11, 868–874.
- Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A., Vinten-Johansen, J., 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 285, H579–H588.
- Zheng, J., Ramirez, V.D., 2000. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1115–1123.
- Zhou, H., Zhang, L., Zheng, M., Wang, L., Chen, Y., Shen, Y.-L., 2014. Improved myocardial function with supplement of Levosimendan to Celsior solution: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 64, 256–265.
- Zhou, T., Chuang, C.-C., Zuo, L., 2015. Molecular characterization of reactive oxygen species in myocardial ischemia-reperfusion injury. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–9.

- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A.A., Tillement, J.P., 1999. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp. Clin. Res.* 25, 87–97.
- Zucchi, R., Ghelardoni, S., Evangelista, S., 2007. Biochemical basis of ischemic heart injury and of cardioprotective interventions. *Curr. Med. Chem.* 14, 1619–1637.
- Zweier, J., Talukder, M., 2006. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 70, 181–190.
- Zweier, J.L., Flaherty, J.T., Weisfeldt, M.L., 1987. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 1404–1407.

Annexes

Annexes

Principaux composants chimiques de la propolis algérienne.

L'analyse des flavonoïdes et des acides phénoliques a été effectuée par chromatographie en phase liquide à haute performance à phase inversée équipée d'un détecteur à barrette de diiode (RP-HPLC-DAD) (Lahouel et al., 2011).

Composés	%
Acides Aliphatiques (acide 9,12-Octadecadiénoïque (Z/Z) ; acide 2-Propénoïque, 3-(4-hydroxyphényl) ; acide 4-(méthylamino)butyrique)	10.60
Acides Aromatiques (acide benzène, alpha-(hydroxyméthyl)-acétique, (+/-) ; acide p-Hydroxycinnamique ; acide 5-O-méthyl-d-gluconique diméthylamide)	22.04
Esters (acide p-Hydroxycinnamique, éthylester ; acide ,2-phényl ester Hexanoïque ; acide Hexadécanoïque, 15-méthyl-,méthylester ; acide 6-Octadécanoïque, méthylester)	11.14
Flavonoïdes (Pinostrobine chalcone ; Pinocembrine ; Tectochrysine)	5.92
Sesquiterpènes (1.4-Méthanoazulen-7(1H)-one,octahydro-4,8,8,9-tétraméthyle)	2.96
Autres (1-Octadécanol ; Benzène, 3-cyclohexane-1-yle ; Cyclopropane,1,1,2-triméthyl-3-(2-méthyl-1-propényl) ; 3-[4-Cyano-1,2,3,4-tétrahydronaphthyle] propanenitrile ; Cyclopentadécanone, 2-hydroxy)	47.31

Composition chimique de la solution de Krebs-Henseleit

<i>Composés</i>	<i>Concentration</i>	
	<i>mmole/l</i>	<i>g/l</i>
<i>Eau distillée (L)</i>		<i>1.00</i>
<i>NaCl</i>	<i>118</i>	<i>6.892</i>
<i>KCl</i>	<i>4.7</i>	<i>0.348</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>1.2</i>	<i>0.16</i>
<i>MgSO₄</i>	<i>1.2</i>	<i>0.144</i>
<i>CaCl₂</i>	<i>1.8</i>	<i>0.196</i>
<i>NaHCO₃</i>	<i>25</i>	<i>2.1</i>
<i>Glucose</i>	<i>11</i>	<i>1.982</i>
<i>pH 7.4</i>		