



## Effet préventif de l'extrait éthanolique des cladodes de cactus (*Opuntia ficus-indica*) sur les dommages oxydatifs rénaux induits par le méthotrexate chez des rats Wistar.

Amira Akacha<sup>1</sup>, Riadh Badraoui<sup>2</sup>, Tarek Rebai<sup>3</sup> and Lazhar Zourgui

<sup>1</sup>Laboratoire de Neurophysiologie Fonctionnelle et Pathologie, Faculté des Sciences de Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunis, Tunisie

<sup>2</sup>Unité d'Histologie – Cytologie, Faculté de Médecine de Tunis, Université de Tunis, Tunisie

<sup>3</sup>Laboratoire d'histo-embryologie and cytogenétique, Faculté de médecine de Sfax, Université de Sfax, Tunisie.

<sup>4</sup>Institut Supérieur de Biologie Appliquée de Médénine (ISBAM), Université de Gabès, Tunisie

### Résumé

Cette étude visait à évaluer les effets protecteurs d'un extrait de cactus contre la néphrotoxicité induite par le méthotrexate (MTX) et les perturbations oxydatives chez un modèle expérimental de rat. Les rats ont été répartis en quatre groupes : un groupe contrôle, un groupe traité par MTX seul, un groupe traité par extrait de cactus seul et un groupe traité par MTX et extrait de cactus. La fonction rénale a été évaluée par le dosage de biomarqueurs du stress oxydatif. Un examen histopathologique du tissu rénal a été réalisé. L'administration de MTX a induit une néphrotoxicité significative, mise en évidence par une élévation des biomarqueurs du stress oxydatif. L'analyse histopathologique a confirmé une réduction des lésions rénales dans le groupe traité par l'extrait de cactus. L'extrait de cactus présente des effets rénoprotecteurs significatifs contre la toxicité induite par le méthotrexate, préservant la fonction rénale. Ces résultats confirment son potentiel en tant que traitement adjuvant pour atténuer les complications rénales chez les patients sous traitement par méthotrexate.

**Mots clés :** *Opuntia ficus-indica*, méthotrexate, stress oxydant, néphrotoxicité

## Preventive effect of ethanolic extract of cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes on methotrexate-induced oxidative damage of the kidney in Wistar rats.

### Abstract

This study aimed to evaluate the protective effects of a cactus extract against methotrexate (MTX)-induced nephrotoxicity and oxidative disturbances in an experimental rat model. The rats were divided into four groups: a control group, a group treated with MTX alone, a group treated with cactus extract alone, and a group treated with both MTX and cactus extract. Renal function was assessed by measuring oxidative stress biomarkers. A histopathological examination of the kidney tissue was performed. The administration of MTX induced significant nephrotoxicity, demonstrated by an increase in oxidative stress biomarkers. Histopathological analysis confirmed a reduction in kidney lesions in the group treated with the cactus extract. The cactus extract has significant renoprotective effects against methotrexate-induced toxicity, preserving kidney function. These results confirm its potential as an adjuvant treatment to mitigate renal complications in patients undergoing methotrexate therapy.

**Key Words:** *Opuntia ficus-indica*, methotrexate, oxidative stress, nephrotoxicity

<sup>1</sup> Corresponding author: [amiraakacha20@gmail.com](mailto:amiraakacha20@gmail.com)

## I. INTRODUCTION

Le méthotrexate (MTX) représente une pierre angulaire dans les protocoles chimiothérapeutiques et immunosuppresseurs. Il est largement utilisé dans la prise en charge des tumeurs malignes et de diverses affections non néoplasiques, notamment le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et certaines maladies infectieuses [1]. Malgré son efficacité clinique bien établie, l'application thérapeutique du MTX est considérablement limitée par sa néphrotoxicité dose-dépendante. Cet effet indésirable résulte de multiples mécanismes, impliquant principalement une cristallisation intratubulaire et des lésions directes de l'épithélium tubulaire, conduisant souvent à une insuffisance rénale aiguë et perturbant les fonctions rénales critiques [2]. La reconnaissance croissante des lésions rénales induites par le MTX a stimulé la recherche sur les adjuvants protecteurs susceptibles d'atténuer ces effets néfastes tout en préservant ses bénéfices thérapeutiques.

Le potentiel néphrotoxique du MTX représente un défi clinique important, particulièrement dans les protocoles à fortes doses où sa précipitation dans les tubules rénaux peut provoquer une obstruction mécanique et des lésions cellulaires directes. De plus, il a été démontré que le MTX induit un stress oxydatif via la génération d'espèces réactives de l'oxygène, entraînant une peroxydation lipidique et une apoptose cellulaire dans les tissus rénaux [3]. Ces mécanismes contribuent collectivement à une altération du débit de filtration glomérulaire, une réduction du flux sanguin rénal et, in fine, à une insuffisance rénale aiguë. L'identification de stratégies néphroprotectrices efficaces représente donc un besoin clinique urgent en oncologie et en rhumatologie.

Parallèlement aux développements pharmaceutiques, on observe un regain d'intérêt scientifique pour les produits naturels et les aliments fonctionnels pour leurs rôles potentiels dans la prévention des maladies et la promotion de la santé. La tendance mondiale vers les thérapeutiques naturelles est motivée par leur sécurité perçue, leur rentabilité et leur approche multi-cibles de la prise en charge des maladies. Parmi ceux-ci, *Opuntia ficus-indica*, un membre de la famille des Cactacées, s'est imposé comme un candidat particulièrement prometteur. Cette espèce végétale, indigène des régions arides et semi-arides, possède une riche histoire d'utilisation ethnobotanique parmi les populations amérindiennes et mexicaines, servant à la fois de nourriture de base et de médecine traditionnelle pour diverses affections [4].

Le potentiel thérapeutique d'*O. ficus-indica* est étayé par sa composition phytochimique diversifiée, incluant des composés bioactifs tels que les bêta-lainés, les caroténoïdes, l'acide ascorbique et des dérivés flavonoïdes, qui contribuent tous à ses propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires significatives [5]. Les bêta-lainés, en particulier, ont démontré une activité remarquable de piégeage des radicaux libres et des effets anti-inflammatoires dans divers modèles expérimentaux. L'action synergique de ces phyto-constituants confère à *O. ficus-indica* un mécanisme d'action multifacette qui pourrait être particulièrement pertinent pour diminuer les lésions organiques induites par les médicaments. La recherche scientifique contemporaine a validé plusieurs applications traditionnelles d'*O. ficus-indica*, en se concentrant particulièrement sur ses cladodes qui ont démontré une efficacité potentielle dans la prise en charge des troubles métaboliques, y compris l'hyperglycémie, le diabète et ses complications [6]. Les cladodes consommés comme légumes frais et incorporés dans diverses préparations culinaires [7], contiennent un mélange complexe de composés bioactifs pouvant conférer des effets protecteurs contre les lésions organiques via de multiples voies, incluant la réduction du stress oxydatif et la modulation de l'inflammation. Des études récentes ont en outre élucidé le rôle des composés du cactus dans la modulation des voies apoptotiques et le renforcement des mécanismes de défense antioxydants cellulaires.

La justification de l'étude d'*O. ficus-indica* en tant qu'agent néphroprotecteur potentiel contre les lésions rénales induites par le MTX découle de plusieurs considérations. Premièrement, les propriétés antioxydantes avérées des composés du cactus pourraient directement contrer le stress oxydatif induit par le MTX dans les tissus rénaux. Deuxièmement, son activité anti-inflammatoire pourrait atténuer la cascade inflammatoire initiée par le MTX dans le parenchyme rénal. Troisièmement, des études antérieures ont démontré les effets protecteurs d'extraits de cactus contre la néphrotoxicité induite par d'autres agents chimiothérapeutiques, comme le cisplatine [8] suggérant une applicabilité plus large dans les lésions rénales induites par la chimiothérapie.

Compte tenu du profil néphrotoxique avéré du MTX et des propriétés bioactives documentées d'*O. ficus-indica*, cette étude vise à investiguer systématiquement les effets réno-protecteurs potentiels de l'extrait de cactus contre les lésions rénales induites par le MTX en utilisant une approche expérimentale complète. Nous émettons l'hypothèse que les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires inhérentes à *O. ficus-indica* pourraient atténuer la néphrotoxicité médiée par le MTX via la préservation de la fonction rénale et de l'intégrité histo-architecturale. Spécifiquement, cette recherche évaluera les effets modulateurs de l'extrait de cactus sur les altérations induites par le MTX concernant, les paramètres de stress oxydatif, les marqueurs inflammatoires et les changements histopathologiques dans le tissu rénal.

Cette recherche vise à contribuer au paradigme en développement de l'oncologie intégrative en explorant les adjuvants dérivés de produits naturels qui pourraient améliorer le profil de sécurité des agents chimiothérapeutiques conventionnels. Les résultats pourraient avoir des implications significatives pour la pratique clinique, offrant potentiellement une nouvelle stratégie pour prévenir ou atténuer la néphrotoxicité induite par le MTX, améliorant ainsi les résultats pour les patients et leur qualité de vie pendant la chimiothérapie. De plus, cette étude vise à fournir une validation scientifique pour l'usage traditionnel d'*O. ficus-indica* dans la prise en charge de diverses affections, comblant ainsi le fossé entre les savoirs traditionnels et la médecine fondée sur les preuves.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1. Produits chimiques

Le méthotrexate, l'acide thiobarbiturique (TBA), l'acide trichloroacétique (TCA) et le butyl-hydroxytoluène (BHT) ont été fournis par Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, États-Unis). La 2,4-dinitro-phénylhydrazine (2,4-DNPH) et la guanidine ont été acquises auprès de Prolabo (France). Tous les autres réactifs et produits chimiques utilisés étaient de qualité analytique.

### 2.2. Préparation de l'extrait de cladodes de cactus

Des cladodes jeunes (2-3 semaines) d'*Opuntia ficus-indica* ont été récoltés dans la région de Sfax, Tunisie orientale (coordonnées GPS : 34°44'32.3"N 10°31'50.0"E). Après lavage et découpage, les cladodes ont été séchés à l'air ambiant. La poudre obtenue a ensuite été soumise à une extraction par l'éthanol pur, suivie d'une double filtration sur papier Whatman (GF/A, 110 mm). L'extrait éthanolique a été concentré à l'évaporateur rotatif sous vide à 25 °C, puis stocké à 4 °C en attendant son utilisation.

### 2.3. Protocole expérimental et traitement des animaux

L'étude a été conduite sur des rats Wistar mâles adultes (poids moyen de 220 g) provenant de l'animalerie SEXAL (St. Doulchard, France), avec l'approbation du Comité National d'Éthique Médicale (CNEM, Institut Pasteur de Tunis). Après une semaine d'acclimatation dans des conditions standardisées (cycle lumière/obscurité, température et humidité contrôlées), avec un accès libre à l'eau et à la nourriture, les rats ont été répartis aléatoirement en quatre groupes (n=6/groupe) :

Groupe Témoin (CTRL) : a reçu une injection quotidienne de solution saline physiologique pendant 10 jours.

Groupe Cactus : a reçu une injection quotidienne d'extrait éthanolique de cactus (400 mg/kg au total) pendant 10 jours.

Groupe MTX : a reçu une injection unique de méthotrexate (20 mg/kg) le 8ème jour.

Groupe MTX + Cactus : a reçu une injection unique de MTX le 8ème jour, associée à un traitement quotidien par l'extrait de cactus pendant 10 jours.

Toutes les substances (MTX, extrait de cactus et solution saline) ont été administrées par voie intrapéritonéale en un volume de 50 mL. Les doses et la durée du traitement ont été sélectionnées sur la base de données bibliographiques antérieures [9]. Au terme des 10 jours de traitement, les animaux ont été

sacrifiés par décapitation sous anesthésie générale. Le sang a été prélevé pour analyse biochimique. Les reins ont été destinés aux analyses biochimiques et histologiques.

#### 2.4. Préparation des extraits testiculaires

Les reins ont été préparés pour les analyses histologiques et biochimiques selon un protocole standardisé. Chaque échantillon a été homogénéisé dans du Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) puis centrifugé à 4°C pendant 30 minutes à 4000 tr/min. Les surnageants, recueillis après centrifugation, ont été conservés à -20°C pour le dosage ultérieur des paramètres de stress oxydatif.

#### 2.5. Dosage de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été évaluée par la mesure des taux de malondialdéhyde (MDA) selon la méthode de Buege et Aust (1987) [10]. Le principe repose sur la formation d'un complexe coloré entre le MDA et l'acide thiobarbiturique, dont l'intensité est mesurée par spectrophotométrie à 530 nm. Les concentrations de MDA ont été calculées en utilisant un coefficient d'extinction molaire de  $1,56 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.6. Dosage des protéines carbonylées

Le taux de protéines carbonylées a été déterminé selon le protocole basé sur la réaction des groupements carbonyles avec le DNPH. L'absorbance des dérivés hydrazones formés a été mesurée à 370 nm, avec un coefficient d'extinction molaire de  $22,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour le calcul des concentrations.

#### 2.7. Mesure de l'activité catalase

L'activité catalase a été déterminée en suivant la disparition du peroxyde d'hydrogène à 240 nm, selon la méthode standard. L'activité enzymatique a été exprimée en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  décomposé par minute et par mg de protéines, utilisant un coefficient d'extinction de  $0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.8. Mesure de l'activité glutathion peroxydase

L'activité GPx a été mesurée selon la méthode au guaiacol, suivant l'augmentation d'absorbance à 470 nm. L'activité enzymatique a été calculée en utilisant un coefficient d'extinction molaire de  $26,2 \text{ mM}^{-1}$  et exprimée en nmol de substrat transformé par minute.

#### 2.9. Mesure de l'activité superoxyde dismutase

L'activité SOD a été déterminée selon la méthode de Durak [11], basée sur l'inhibition de la réduction du NBT. Une unité d'activité SOD correspond à la quantité d'enzyme inhibant 50% de la réduction du NBT.

#### 2.10. Analyse histopathologique

Pour chaque rat, des échantillons de tissu rénal ont été fixés dans du formol à 10%, puis inclus en paraffine. Des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome standard et colorées à l'hématoxyline-éosine (H-E). L'examen microscopique des lames a été réalisé en simple aveugle sous microscope optique Leica, permettant une évaluation objective des altérations tissulaires.

#### 2.11. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type pour six déterminations indépendantes. Les différences entre les groupes ont été évaluées par analyse de variance (ANOVA) unidirectionnelle, suivie du test post hoc de Newman-Keuls. Le seuil de significativité statistique a été fixé à  $p < 0,05$  pour toutes les analyses.

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. Évaluation du statut de stress oxydatif

##### 3.1.1. Dosage du malondialdéhyde : peroxydation lipidique

Le taux de malondialdéhyde (MDA) a été mesuré dans les homogénats de testicules comme marqueur de la peroxydation lipidique. Les résultats montrent une augmentation statistiquement significative des taux de MDA dans le groupe traité au MTX comparé au groupe témoin. Cependant, le traitement avec l'extrait de cactus a prévenu cette élévation, ramenant les valeurs de MDA à des niveaux similaires à ceux du groupe témoin.

##### 3.1.2. Dosage des protéines carbonylées : oxydation protéique

Les résultats de l'oxydation protéique suivent la même tendance que ceux du MDA. Les niveaux de protéines carbonylées (PC) sont significativement plus élevés ( $p < 0,05$ ) dans le groupe MTX que dans le groupe témoin. Le traitement combiné avec le cactus (MTX + cactus) a significativement empêché cette augmentation. Le traitement avec le cactus seul n'a induit aucune modification significative par rapport au groupe témoin.

##### 3.1.3. taux des marqueurs du stress oxydatif (catalase, GPx, SOD et PC)

le tableau I présente les effets du MTX et de l'extrait de cladodes sur les activités de la catalase (CAT), de la GPx, la SOD et des protéines carbonylées. Le MTX a induit une diminution marquée de l'activité de la catalase dans les reins. Le traitement avec l'extrait de cactus a permis une amélioration significative de l'activité catalase comparé au groupe traité au MTX seul ( $p < 0,05$ ).

L'activité totale de la GPx a diminué dans le groupe MTX par rapport aux témoins, mais s'est normalisée avec le traitement au cactus ( $p < 0,05$ ).

De plus, l'administration de MTX a causé une diminution significative de l'activité de la SOD. La combinaison avec l'extrait de cactus a permis une augmentation significative de l'activité antioxydante de la SOD ( $p < 0,05$ ). Le taux des protéines carbonylées (PC) a montré une élévation suite à l'administration du MTX, alors que son administration associée au cactus a permis sa diminution.

#### 3.2. Résultats histopathologiques :

L'analyse histologique des coupes de tissu rénal a révélé des altérations morphologiques distinctes entre les groupes expérimentaux. Le groupe témoin présentait un parenchyme rénal normal, caractérisé par des glomérules et des tubules bien structurés, sans signe pathologique.

En revanche, les rats traités au méthotrexate (MTX) ont développé des lésions rénales sévères, incluant une vacuolisation marquée des cellules épithéliales des tubules proximaux, une dilatation tubulaire importante et un décollement de l'épithélium tubulaire ainsi que des foyers d'infiltration leucocytaire à prédominance de polynucléaires neutrophiles. La présence de ces infiltrats inflammatoires atteste d'un processus inflammatoire actif induit par le MTX.

De manière significative, le groupe traité avec l'extrait de cactus a présenté une architecture rénale comparable au groupe témoin, sans altérations histopathologiques notables. Cette observation démontre que l'administration du cactus a exercé un effet protecteur remarquable, prévenant efficacement les lésions rénales normalement induites par le MTX. (figure 1)

### 4. DISCUSSION

Dans notre étude, l'administration du méthotrexate aux rats a provoqué une néphrotoxicité. Ces résultats sont similaires à ceux publiés par des études antérieures [12]. Potentiellement la toxicité du méthotrexate peut survenir suite à la fois d'un traitement à forte et faible dose. Une néphrotoxicité significative est associée à des doses élevées de MTX ce qui peut avoir des effets préjudiciables sur la fonction rénale par l'intermédiaire de deux mécanismes. Tout d'abord, MTX précipite dans les tubules rénaux, induisant

directement une lésion tubulaire, d'autre part, il induit une transitoire baisse du taux de filtration glomérulaire après chaque dose et un risque de dysfonctionnement rénal [13].

La peroxydation lipidique est l'effet le plus anciennement connu des radicaux libres et le plus simple à mesurer, les dérivés de l'oxydation lipidique sont les composés les plus souvent étudiés lorsque l'on recherche un stress oxydant [14]. Le stress oxydant est caractérisé par les ROS qui induisent la peroxydation lipidique. Le MDA est un produit secondaire généré au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés [15]. La peroxydation lipidique contient une série de processus de réaction en chaîne radicalaires libres et est également associée à plusieurs types de dommages biologiques. Le rôle des radicaux libres et des ROS est de plus en plus reconnu dans la pathogenèse de nombreuses maladies humaines, y compris le cancer, le vieillissement et l'athérosclérose [16]. La peroxydation lipidique est aujourd'hui reconnue comme une réaction extrêmement importante dans les processus physiologiques et toxicologiques. Les hydroperoxydes lipidiques formés par l'attaque des radicaux libres sur les résidus d'acides gras polyinsaturés des phospholipides peuvent encore réagir avec les métaux redox (comme  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ), produisant finalement un malondialdéhyde mutagène et cancérigène [17].

Şener et al [18] ont montré que l'administration MTX provoque un stress oxydant révélé par l'augmentation du MDA dans les intestins, le foie et les reins qui est un marqueur de la peroxydation lipidique. Une autre étude a démontré aussi que l'administration de MTX entraîne une augmentation du taux du MDA dans le rein et d'autres tissus [19].

Le fait que les concentrations de MDA étaient plus élevées dans les tissus du groupe MTX, cela reflète la gravité de la peroxydation des lipides dans la membrane cellulaire [20]. La peroxydation lipidique est une réaction où les radicaux libres d'oxygène et les acides gras polyinsaturés génèrent des produits tels que des peroxydes, des alcools et MDA.

La catalase est un groupe d'enzymes tetramérique, chaque unité portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. Cette enzyme prévient les molécules biologiques induites par l'eau oxygénée. La catalase a donc pour rôle d'accélérer la réaction spontanée de dismutation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en oxygène et en eau. Les résultats montrent une diminution significative de l'activité de la CAT, la GPx et la SOD ( $P < 0,05$ ), au niveau du tissu hépatique, rénal, testiculaire, ovarien et intestinal chez les rats traités par le methotrexate (20 mg/kg) tout en comparant aux rats témoins. En revanche, nous n'enregistrons aucune différence statistiquement significative de l'activité enzymatique de toutes les enzymes (CAT, GPx et SOD) chez les rats traités par le cactus par rapport aux rats témoins. Nos résultats sont en accord avec des études précédentes qui ont démontré une altération de l'activité antioxydante des enzymes étudiées après l'administration du MTX [21].

Puisque le MTX est connu pour provoquer un stress oxydant dans les cellules, plusieurs paramètres indiquant le statut antioxydant ont également été examinés. Le stress oxydant dans la cellule peut être induit soit par une production accrue de ROS ou l'inhibition du système de défense antioxydant. Cet équilibre entre la production et le catabolisme des oxydants est essentiel pour le maintien de l'intégrité biologique des tissus [22]. Les enzymes antioxydantes (SOD, GPx et CAT) limitent les effets des molécules oxydantes dans les tissus et jouent un rôle dans la défense contre les dommages oxydatifs cellulaires étant piègeurs de radicaux libres. La glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la catalase constituent mutuellement une équipe de soutien de défense contre les ROS. De petites déviations dans les concentrations physiologiques pourraient avoir des effets considérables sur la résistance des lipides cellulaires, des protéines et de l'ADN aux dommages oxydatifs [23].

Nos résultats ont montré une diminution de l'activité de la GPx, SOD et la CAT dans les tissus étudiés. Étant donné que ces enzymes ont un rôle protecteur contre les dommages induits par les radicaux libres, leur induction pourrait être comprise comme une réponse adaptative au stress oxydant. [24]

La diminution dans les activités de la GPx et la CAT chez les rats traités par le methotrexate dans notre étude peut être due à l'accumulation intracellulaire des ROS. La même explication a été donnée par Miyazono et al en 2004, il a démontré une augmentation de la production des radicaux libre d'oxygène après traitement de MTX, et ces radicaux libres peuvent mener à une déficience fonctionnelle de la mitochondrie. La toxicité causée par MTX est caractérisée par l'activation de la réponse inflammatoire et sensiblement une très grande production des cytokines pro- inflammatoires [25].

Selon Miyazono et al 2004 [26] , la diminution de l'activité enzymatique de la catalase peut refléter une réduction de la capacité des mitochondries et des microsomes d'éliminer le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit en réponse au MTX .Le cycle d'oxydoréduction du glutathion fait intervenir deux enzymes essentielles la glutathion réductase (GR) qui transforme le glutathion oxydé (GSSG) en sa forme réduite (GSH) et la glutathion peroxydase (GPx), qui active la réaction de transformation des hydroperoxydes en alcools primaires.Ce système enzymatique contient également la glutathion S-transférase (GST) qui catalyse la réaction de conjugaison entre le glutathion réduit (GSH) et les substances étrangères (xénobiotiques, carcinogènes et composés électrophiles...) avec la formation des métabolites glutathion-conjugués [27]

Pour évaluer des dommages oxydatifs induit par MTX chez des rats Wistar, la production de protéines dcarbonylées a été aussi étudiée. La Carbonylation des protéines est un signe de dommages oxydatifs irréversible, conduisant souvent à une perte de la fonction des protéines, qui peuvent avoir des effets durables néfastes sur les cellules et les tissus [28]. En présence d'EOA, les protéines peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leurs structures primaire et secondaire. Les dommages oxydatifs au niveau des protéines (et des acides aminés).

La glutathion peroxydase, la superoxyde dismutase et la catalase constituent mutuellement une équipe de soutien de défense contre les ROS De petites déviations dans les concentrations physiologiques pourraient avoir des effets considérables sur la résistance des lipides cellulaires, des protéines et de l'ADN aux dommages oxydatifs [29].

Nos résultats ont montré une diminution de l'activité de la GPx , SOD et la CAT dans le tissu étudié. Étant donné que ces enzymes ont un rôle protecteur contre les dommages induits par les radicaux libres, leur induction pourrait être comprise comme une réponse adaptative au stress oxydant [30]

La diminution dans les activités de la GPx et la CAT chez les rats traités par le methotrexate dans notre étude peut être due à l'accumulation intracellulaire des ROS. La même explication a été donnée par Miyazono et al en 2004, il a démontré une augmentation de la production des radicaux libre d'oxygène après traitement de MTX, et ces radicaux libres peuvent mener à une déficience fonctionnelle de la mitochondrie. La toxicité causée par MTX est caractérisée par l'activation de la réponse inflammatoire et sensiblement une très grande production des cytokines pro- inflammatoires [31]

Selon Miyazono [32] , la diminution de l'activité enzymatique de la catalase peut refléter une réduction de la capacité des mitochondries et des microsomes d'éliminer le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit en réponse au MTX.

Le cycle d'oxydoréduction du glutathion fait intervenir deux enzymes essentielles la glutathion réductase (GR) qui transforme le glutathion oxydé (GSSG) en sa forme réduite (GSH) et la glutathion peroxydase (GPx), qui active la réaction de transformation des hydroperoxydes en alcools primaires.Ce système enzymatique contient également la glutathion S-transférase (GST) qui catalyse la réaction de conjugaison entre le glutathion réduit (GSH) et les substances étrangères (xénobiotiques, carcinogènes et composés électrophiles...) avec la formation des métabolites glutathion-conjugués [33]

Pour évaluer des dommages oxydatifs induit par MTX chez des rats Wistar, la production de protéines dcarbonylées a été aussi étudiée. La Carbonylation des protéines est un signe de dommages oxydatifs irréversible, conduisant souvent à une perte de la fonction des protéines, qui peuvent avoir des effets durables néfastes sur les cellules et les tissus [34]

En présence d'EOA, les protéines peuvent se dénaturer, se fragmenter ou perdre leurs structures primaire et secondaire. Les dommages oxydatifs au niveau des protéines (et des acides aminés) peuvent se manifester de diverses manières, par apparition de groupements hydroperoxydes (-OOH), ou par oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique conduisant à une fragmentation des protéines et à l'apparition de groupements carbonyles. Elle peut se manifester aussi par oxydation des chaînes latérales des acides aminés avec formation de ponts disulfure, de méthionine sulfoxyde et de groupements carbonyles, ou par la formation de dérivés chlorés et nitrés lors du contact de la tyrosine avec respectivement, le système MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le radical de l'oxyde nitrique (NO<sup>•</sup>).La formation des protéines carbonylées est actuellement le marqueur le plus largement utilisé de stress oxydatif sévère pour cela un certain nombre d'essais ont été mis au point [35]

Nos résultats montrent clairement que le MTX a induit une augmentation marquée de la production des protéines carbonylées dans des extraits des tissus. Le même résultat a été démontré par Kolli [36].

Le taux élevé des protéines carbonylées a été expliqué par Gebiki et Gebiki [37]. Ils ont signalé que les radicaux libres induisent la formation de protéines oxydées. De plus, lorsque la quantité élevée de produit superoxydes accable le système de SOD / catalase, peut endommager les membranes cellulaires, l'ADN et des protéines cellulaires [38]

Nous avons observé une restauration des activités des enzymes antioxydantes et du taux des protéines carbonylées chez les rats traités par le MTX et la coadministration du cactus, ce qui suggère l'effet protecteur de cette plante contre les dommages oxydatifs induits par la chimiothérapie. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Brahmi et al, (2012). [39]

L'augmentation des activités des enzymes antioxydantes chez les rats traités par le cactus et le méthotrexate peut servir de mécanisme de compensation supplémentaire pour maintenir l'intégrité de la cellule et la protection contre les dommages des radicaux libres. Cela peut être dû à la présence de nombreux composés antioxydants comme la vitamine C, les bêta-carotènes, les flavonoïdes, et les betalains [40]. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes démontrant l'effet de neutralisation des radicaux libres et l'action inhibitrice du cactus sur la production des anions superoxyde dans le foie et les reins [41] et testicule et ovaire [42] en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT et GPx). Ces composés antioxydants peuvent moduler l'activité des enzymes antioxydantes [43].

#### 4. CONCLUSION

L'objectif de notre recherche est de démontrer que l'extrait d'*Opuntia ficus indica* est capable d'exercer des effets protecteurs contre les altérations tissulaires causées par le méthotrexate. Notre travail a permis d'étudier la toxicité du méthotrexate d'une part, et la mise en évidence de l'effet protecteur du cactus vis-à-vis des effets cytotoxiques induits in vivo par cette molécule. L'analyse a porté essentiellement sur les effets induits par le MTX sur les variations du malondaldéhyde, des activités de la catalase et de la SOD, du glutathion peroxydase (GPx) et des fluctuations des protéines carbonylées. Ce désordre est associé à une altération structurale des reins. L'association Cactus/MTX a diminué significativement le niveau de la toxicité, et ce en modulant les niveaux des biomarqueurs du stress oxydant, et en régulant l'activité des enzymes antioxydantes. Cette combinaison a aussi amélioré la régulation des paramètres biochimiques et histologiques.

Les plantes aromatiques et médicinales sont donc la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médical. Dans l'industrie pharmaceutique, sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre du jour.

|                           | NaCl         | cactus      | MTX           | MTX + cactus  |
|---------------------------|--------------|-------------|---------------|---------------|
| MDA (nmol/mg pt)          | 3,4 ± 0,5    | 3,65 ± 0,43 | 8,04 ± 0,34*  | 4,13 ± 0,21 # |
| Catalase (μmol/min/mg pt) | 12,60 ± 0,28 | 11,78 ± 0,2 | 9,30 ± 0,06*  | 10,67 ± 0,23* |
| SOD (U/mg pt)             | 8,78 ± 0,52  | 7,43 ± 0,43 | 4,89 ± 0,53   | 5,33 ± 0,03   |
| GPX (mmole/mg pt)         | 0,93 ± 0,23  | 0,87 ± 0,41 | 0,45 ± 0,23   | 0,63 ± 0,1*   |
| Prot carb (mmole/mg pt)   | 1,93 ± 0,11  | 2,07 ± 0,31 | 3,69 ± 0,23 * | 3,01 ± 0,07 # |

Tableau I: Variation de l'activité des marqueurs du stress oxydatif au niveau du rein

Les données sont exprimées par moyenne ± SD

\*P ≤ 0.05 comparé au contrôle groupe # P ≤ 0.05 comparé au MTX groupe

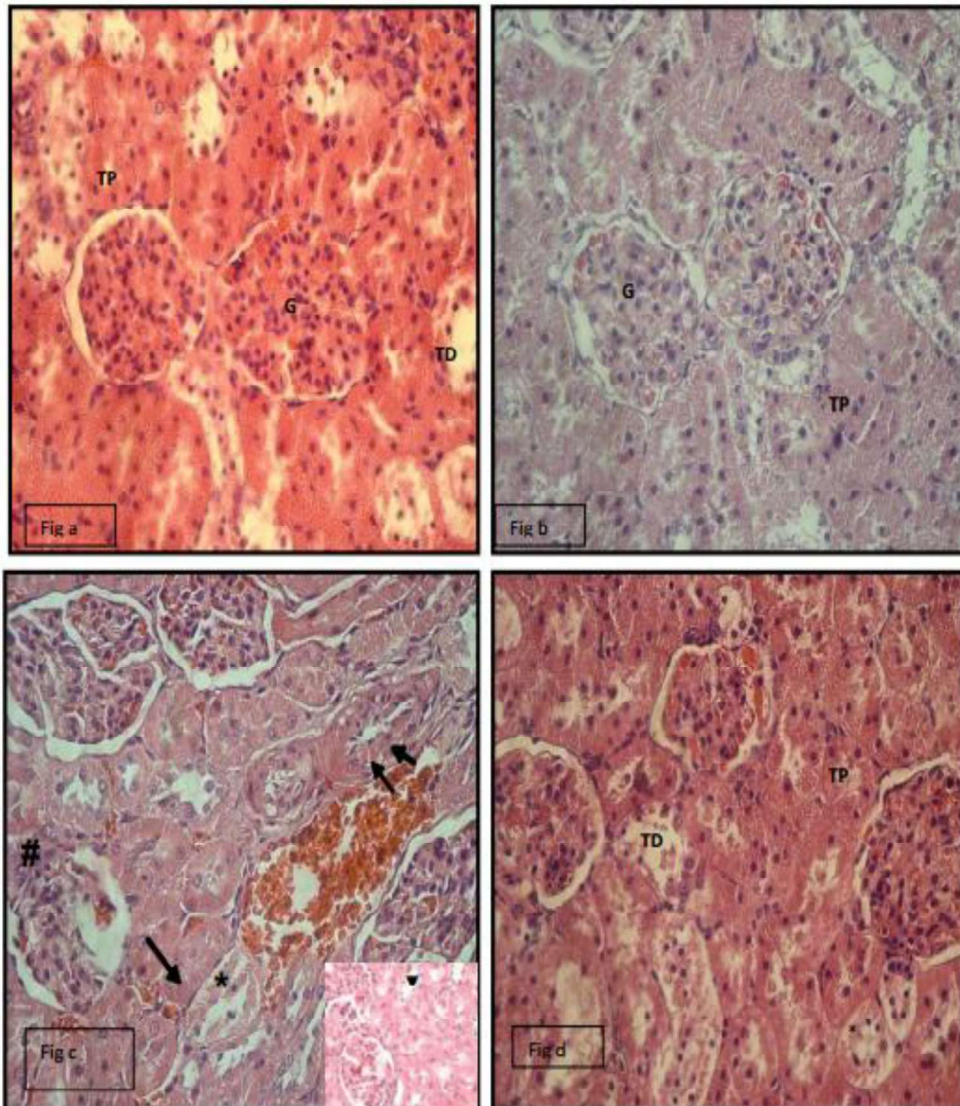


Figure 1 : Observation microscopique des tubules rénaux chez les rats témoins et traités.  
A : groupe témoin : B : groupe traité par l'extrait de cactus (400 mg/kg PC). C : groupe traité par le méthotrexate à raison de 20 mg/kg PC (i.p) durant 10 jours ; D: groupe traité par l'extrait de cactus (400 mg/kg PC) et injecté par méthotrexate.

Vacuolisation (▲) dans les cellules épithéliales des tubules proximaux.

Dilatation tubulaire (▼),

Décollement de l'épithélium tubulaire (\*).

Infiltration leucocytaires (#).

## Références

- [1] J.R. BERTINO. Clinical pharmacology of methotrexate. *\*Med Pediatr Oncol\**, vol. 10, n° 4, pp. 401-411, 1982.
- [2] B.C. WIDEMANN, P.C. ADAMSON. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *\*Oncologist\**, vol. 11, n° 11, pp. 694-703, 2006.
- [3] A. CETIN, L. KAYNAR, I. KOCYIGIT, S. HACIOGLU, R. SARAYMEN, O. OZTURK, I. SARI, O. SAGDIC. Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *\*Am J Chinese Med\**, vol. 36, n° 5, pp. 861-872, 2008.
- [4] L. TESORIERE, D. BUTERA, A.M. PINTAUDI, M. ALLEGRA, M.A. LIVREA. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with Vit C. *\*Am J Clin Nutr\**, vol. 80, n° 2, pp. 391-395, 2004.
- [5] M.L. URSO, P.M. CLARKSON. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *\*Toxicology\**, vol. 189, n° 1-2, pp. 41-54, 2003.
- [6] E.M. GALATI, M.T. MONFORTE, M.M. TRIPODO, A. D'AQUINO, M.R. MONDELLO. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. *\*J Ethnopharmacol\**, vol. 76, n° 1, pp. 1-9, 2001.
- [7] C. SAENZ, P. MECKLENBURG, A.M. ESTEVEZ, E. SEPULVEDA. Natural liquid sweetener from cactus pear: obtention and characteristics. *\*Acta Hort\**, vol. 438, pp. 135-138, 1996.
- [8] D. BRAHMI, Y. AYED, M. HFAIEDH, C. BOUAZIZ, H. BEN MANSOUR, L. ZOURGUI, H. BACHA. Protective effect of cactus cladode extract against cisplatin induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in balb/c mice: combination with phytochemical composition. *\*BMC Complement Altern Med\**, vol. 12, n° 111, pp. 1-10, 2012.
- [9] A. AKACHA, T. REBAI, L. ZOURGUI, M. AMRI. Preventive effect of ethanolic extract of cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes on methotrexate-induced oxidative damage of the small intestine in Wistar rats. *\*J Cancer Res Ther\**, vol. 14, n° 10, pp. 779-784, 2018.
- [10] J.A. BUEGE, S.D. AUST. Microsomal lipid peroxidation methods. *\*Methods Enzymol\**, vol. 52, pp. 302-310, 1978.
- [11] I. DURAK, Z. YURTARSLANLI, O. CANBOLAT, O. AKYOL. A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *\*Clin Chim Acta\**, vol. 214, n° 1, pp. 103-104, 1993.
- [12] M.H. HAFEZ, M.A. IBRAHIM, S.A. IBRAHIM, E.F. AMIN, W. GOMA, A.M. ABDELRAHMAN. Potential protective effect of etanercept and aminoguanidine in methotrexate-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rat. *\*Eur J Pharmacol\**, vol. 768, pp. 1-12, 2015.
- [13] B.C. WIDEMANN, P.C. ADAMSON. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *\*Oncologist\**, vol. 11, n° 11, pp. 694-703, 2006.
- [14] G.R. BUETTNER. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *\*Arch Biochem Biophys\**, vol. 300, n° 2, pp. 535-543, 1993.
- [15] E.A. MEAGHER, G.A. FITZGERALD. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *\*Free Radic Biol Med\**, vol. 28, n° 12, pp. 1745-1750, 2000.
- [16] P. HOLVOET, J. VANHAECKE, S. JANSSENS, F. VAN DE WERF, D. COLLEN. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *\*Circulation\**, vol. 98, n° 15, pp. 1487-1494, 1998.
- [17] E.N. FRANKEL. Photooxidation of unsaturated fats. In: *\*Lipid Oxidation\**. The Oily Press, Dundee, pp. 43-54, 1998.
- [18] G. SENER, E. EKSIÖGLU-DEMIRALP, M. CETINER, F. ERCAN, S. SIRVANCI, N. GEDIK, B.C. YEGEN. L-Carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *\*Cell Biol Toxicol\**, vol. 22, n° 1, pp. 47-60, 2006.
- [19] N. JAHOVIC, H. CEVIK, A.O. SEHIRLI, B.C. YEGEN, G. SENER. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *\*J Pineal Res\**, vol. 34, n° 4, pp. 282-287, 2003.
- [20] G. CIGHETTI, L. DUCA, L. BORTONE, S. SALA, I. NAVA, G. FIORELLI, M.D. CAPELLINI. Oxidative status and malondialdehyde in beta-thalassaemia patients. *\*Eur J Clin Invest\**, vol. 32, n° 1, pp. 55-60, 2002.
- [21] E. CIRALIK, E. BULBULOGLU, A. CETINKAYA, E.B. KURUTAS, M. CELIK, A. POLAT. Effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced small intestinal damage in rats. *\*Mt Sinai J Med\**, vol. 73, n° 8, pp. 1086-1092, 2006.
- [22] E. OMER, B. BUNYAMIN, I. MEHMET, G. MINE, S. SULEYMAN. The effect of mirtazapine on methotrexate-induced oxidative damage and infertility in rats. *\*ScienceAsia\**, vol. 40, n° 2, pp. 152-156, 2014.
- [23] L. FLOHE. Glutathione peroxidase. *\*Basic Life Sci\**, vol. 49, pp. 663-668, 1988.
- [24] M.L. URSO, P.M. CLARKSON. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *\*Toxicology\**, vol. 189, n° 1-2, pp. 41-54, 2003.
- [25] E. UZAR, H.R. KOYUNCUOGLU, E. UZ, H.R. YILMAZ, S. KUTLUHAN, S. KILBAS, F. GULTEKIN. The activities of antioxidant enzymes and the level of malondialdehyde in cerebellum of rats subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *\*Mol Cell Biochem\**, vol. 291, n° 1-2, pp. 63-68, 2006.

- [26] Y. MIYAZONO, F. GAO, T. HORIE. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *\*Scand J Gastroenterol\**, vol. 39, n° 11, pp. 1119-1127, 2004.
- [27] W. AOUACHERI, S. SAKA, R. DJAFER. L'effet toxique d'un insecticide (alphamethrine) sur l'activité du système enzymatique de détoxification du glutathion. *\*Ann Toxicol Anal\**, vol. 21, n° 3, pp. 125-129, 2009.
- [28] M.J. DAVIES. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *\*Free Radic Biol Med\**, vol. 27, n° 9-10, pp. 1151-1163, 1999.
- [29] V.P. DADHANIA, D.N. TRIPATHI, A. VIKRAM, P. RAMARAO, G.B. JENA. Intervention of lipoic acid ameliorates methotrexate-induced oxidative stress and genotoxicity: a study in rat intestine. *\*Chem Biol Interact\**, vol. 183, n° 1, pp. 85-97, 2010.
- [30] M.L. URSO, P.M. CLARKSON. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, vol. 189, n° 1-2, pp. 41-54, 2003.
- [31] N. VACARESSE, O. VIEIRA, F. ROBBIESYN, G. JURGENS, R. SALVAYRE, A. NEGRE-SALVAYRE. Phenolic antioxidants trolox and caffeic acid modulate the oxidized LDL-induced EGF-receptor activation. *Br J Pharmacol\**, vol. 132, n° 8, pp. 1777-1788, 2001.
- [32] A. MONJAUZE, H.N. LE HOUEROU. Le role des Opuntia dans l'economie agricole Nord Africaine. *\*Bull Ecole Natl Super Agron Tunis\**, vol. 8-9, pp. 85-164, 1965.
- [33] K. MAAROUFI, L. CHEKIR, E.E. CREPPY, F. ELLOUZ, H. BACHA. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *\*Toxicol\**, vol. 34, n° 5, pp. 535-540, 1996.
- [34] M.J. DAVIES. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *\*Free Radic Biol Med\**, vol. 27, n° 9-10, pp. 1151-1163, 1999.
- [35] I. DALLE-DONNE, R. ROSSI, D. GIUSTARINI, A. MILZANI, R. COLOMBO. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative damage in human disease. *\*Clin Chim Acta\**, vol. 329, n° 1-2, pp. 23-38, 2003.
- [36] V.K. KOLLI, P. ABRAHAM, B. ISAAC, D. SELVAKUMAR. Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage. *\*Chemotherapy\**, vol. 55, n° 2, pp. 83-90, 2009.
- [37] J.M. GEBICKI, A. GEBICKI. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *\*Biochem J\**, vol. 289, n° 3, pp. 743-749, 1993.
- [38] L. FREMONT. Biological effects of resveratrol. *\*Life Sci\**, vol. 66, n° 8, pp. 663-673, 2000.
- [39] D. BRAHMI, C. BOUAZIZ, Y. AYED, H. BEN MANSOUR, L. ZOURGUI, H. BACHA. Chemopreventive effect of cactus *Opuntia ficus indica* on oxidative stress and genotoxicity of aflatoxin B1. *Nutr Metab (Lond)\**, vol. 8, n° 73, pp. 1-9, 2011.
- [40] J.O. KUTI. Antioxidant compounds from four *Opuntia* cactus pear fruit varieties. *\*Food Chem\**, vol. 85, n° 4, pp. 527-533, 2004.
- [41] L. ZOURGUI, E.E. GOLLI, C. BOUAZIZ, H. BACHA, W. HASSEN. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. *\*Food Chem Toxicol*, vol. 46, n° 5, pp. 1817-1824, 2008.
- [42] N. HFAIEDH, M.S. ALLAGUI, M. HFAIEDH, A.E. FEKI, L. ZOURGUI, F. CROUTE. Protective effect of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladode extract upon nickel-induced toxicity in rats. *\*Food Chem Toxicol\**, vol. 46, n° 12, pp. 3759-3763, 2008.
- [43] E.M. GALATI, S. PERGOLIZZI, M.M. TRIPODO, A. D'AQUINO, M.R. MONDELLO. Study on the increment of the production of gastric mucus in rats treated with *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. cladodes. *\*J Ethnopharmacol\**, vol. 83, n° 3, pp. 229-233, 2002.