

## ARTICLE ORIGINAL

# Effet protecteur du polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec contre la néphrotoxicité induite par le thiaméthoxame.

## The protective effect of polysaccharide derived from fenugreek seeds against nephrotoxicity induced by thiamethoxam.

Amal Feki<sup>1</sup>  
Intissar Kammoun<sup>1</sup>  
Manel Naifar<sup>2</sup>  
Rim Kallel<sup>3</sup>  
Fatma Makni Ayadi<sup>2</sup>  
Tahia Boudawara<sup>3</sup>  
Ahmed Hakim<sup>4</sup>  
Abderraouf Hilali<sup>5</sup>  
Ibtissem Ben Amara<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unité de Recherche de Chimie Médicinale et Environnementale (UR-17-ES-40), Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, 3000 Sfax, Tunisia

<sup>2</sup> Laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Universitaire Habib Bourguiba, Sfax, Tunisia

<sup>3</sup> Laboratoire d'Anatomie Pathologie à l'Hôpital Universitaire Habib Bourguiba, Sfax, Tunisia

<sup>4</sup> Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine de Sfax, Université de Sfax, 3029 Sfax, Tunisie.

<sup>5</sup> Laboratory of health sciences and techniques, Higher Institute of health sciences, Hassan 1er University, Serrat, Morocco

**Auteur correspondant :**  
Dr Amal Feki

**Adresse :**  
Unité de Recherche de Chimie Médicinale et Environnementale (UR-17-ES-40), Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, 3000 Sfax, Tunisie

**Courriel :** amal.feki05@gmail.com

### Résumé

**Introduction :** Aujourd'hui, plusieurs travaux de recherche ont mis l'accent sur les molécules bioactives d'origine naturelle pour atténuer la toxicité induite par les pesticides.

**Objectifs :** Le présent travail consiste à étudier la néphrotoxicité induite par le thiaméthoxame (TMX) chez des rats adultes et l'effet protecteur induit par le polysaccharide (PSF) extrait à partir des graines de fenugrec (*Trigonellafoenum-graecum*).

**Matériel et méthodes :** De ce fait, des rats femelles de souche Wistar ont été divisés en 4 groupes de 8 rats chacun: le groupe 1 sert comme témoin, le groupe 2 reçoit le TMX, les groupes 3 et 4 reçoivent simultanément le TMX et une alimentation mélangée avec le PSF à deux doses (100 et 200 mg/kg respectivement) pendant 30 jours.

**Résultats :** Les résultats montrent que cet insecticide entraîne une néphrotoxicité suite à une perturbation au niveau des taux de la créatinine, de l'urée et de l'acide urique menant à un dysfonctionnement et à une insuffisance rénale. Ces altérations biochimiques sont accompagnées de modifications histologiques au niveau des reins. De plus, une modification significative des taux des marqueurs du stress oxydatif enzymatiques (catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase) et non enzymatiques (glutathion) avec augmentation de la peroxydation lipidique (malondialdéhyde et produits d'oxydation avancées des protéines), ont été observées témoignant l'effet déstabilisant du TMX. Cependant, la co-administration du PSF associée au TMX a atténué la néphrotoxicité et ceci en comparaison aux rats traités seulement par le TMX.

**Conclusion:** le PSF grâce à son pouvoir antioxydant puissant peut être un agent utile et efficace contre la néphrotoxicité et l'insuffisance rénale.

**Mots clés:** Polysaccharide; Insecticide; Néphrotoxicité; Stress oxydatif; Antioxydant.

### Abstract

**Introduction :** Nowadays, several researches have focused on natural bioactive molecules to mitigate the toxicity induced by pesticides.

**Objective :** The present study aimed to elucidate the toxicity induced by thiamethoxam (TMX) in rats and the possible protective effect provoked by the polysaccharide (PSF) extracted from the fenugreek seeds (*Trigonellafoenum-graecum*).

**Material and methods :** In fact, female Wistar rats were divided into 4 groups of 8 rats: group 1 served as a control, group 2 received TMX, groups 3 and 4 received simultaneously TMX co-administered with PSF at two graded doses (100 and 200 mg/kg respectively) for 30 days.

**Results :** The results showed that this insecticide provoked a nephrotoxicity followed by a disturbance in creatinine, urea and uric acid levels. These biochemical alterations are accompanied by histological changes in the kidney. In addition, a significant modification in the levels of enzymatic (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) and non-enzymatic (glutathione) oxidative stress markers with an increase in lipid peroxidation (malondialdehyde and advanced oxidation products of proteins) were observed, confirming the destabilizing effect of TMX. However, co-administration of PSF with TMX attenuated the nephrotoxicity, when compared to treated rats with TMX only.

**Conclusion :** PSF, due to its antioxidant activity, can be a useful and effective agent against nephrotoxicity and renal failure.

**Keywords:** Polysaccharide; Insecticide; Nephrotoxicity; Oxidative Stress; Antioxidant.

## INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, un regard particulier est porté sur la recherche de nouvelles sources de molécules végétales, afin de mettre au point de nouveaux principes actifs ou de découvrir des analogues de structures des molécules existantes (1). Ainsi, ce travail se propose d'approfondir les connaissances sur une plante médicinale, le fenugrec, appelée en arabe l'helba. Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé cette plante pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. Le fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) est d'une grande qualité nutritive, riche en phosphore, fer, soufre, acide nicotinique, alcaloïdes, saponines, flavonoïdes, glucides (20%), vitamines (A, B1 et C), magnésium, calcium, lécithine, protéines (30%) et lipides (10%). Les glucides sont essentiellement des fibres (la cellulose, l'hémicelluloses) et galactomannane soluble (2). Des études antérieures montrent que la forte teneur en polysaccharides de réserve des graines de fenugrec contribue à soulager les maux observés lors de la constipation (3).

Les polysaccharides sont connus et exploités depuis de nombreuses années du fait de leur abondance, de leur caractère renouvelable, de leur effet inoffensif, et de leur biodégradabilité (4). Les polysaccharides d'origine végétale présentent une variabilité structurale et une richesse en propriétés physico-chimiques, que l'on ne rencontre chez aucune autre classe d'organismes (5). Les graines de plantes légumineuses, contenant des polysaccharides, sont largement utilisées pour le traitement des maladies dans la médecine traditionnelle et moderne.

L'effet protecteur des polysaccharides contre la toxicité des agents chimiques a été le sujet de plusieurs études chez l'animal en ayant comme hypothèse qu'en se liant aux produits toxiques, les polysaccharides diminueraient leur biodisponibilité et favoriseraient leur excrétion (6). En effet, il existe une corrélation positive entre la quantité de pesticides liée aux polysaccharides *in vitro* et celle éliminée dans les fèces (7). De plus, des études récentes ont démontré que beaucoup de polysaccharides naturels jouent un rôle important dans la prévention des dommages oxydatifs induits par le stress comme pièges de radicaux libres chez les organismes vivants (8). Leur rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule des protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs fragments toxiques (9).

Parmi les pesticides, on cite le thiaméthoxame (TMX). En effet, le TMX est un insecticide organique synthétique appartenant à la famille chimique des néonicotinoïdes et à la classe des thianicotynils. Il s'agit d'une nouvelle molécule, développée au cours des trois dernières décennies, dont l'intérêt est dû d'une part à sa

lutte contre les insectes qui sont résistants aux autres classes d'insecticides et d'autre part à sa toxicité modérée pour les mammifères, les oiseaux et les poissons (9). Le TMX est légèrement toxique par voie orale et par inhalation et il possède une faible toxicité par la voie cutanée. Il est peu ou pas irritant pour la peau et les yeux et il ne cause pas de sensibilisation cutanée (10). Cet insecticide est classé cancérigène probable chez l'humain en raison de la réponse tumorigène chez cette espèce (11).

L'objectif de ce travail consiste à étudier l'impact de l'administration intrapéritonéale du TMX sur des rats adultes et de tester l'effet protecteur possible du polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) sur les paramètres biométriques, biochimiques, histologiques et sur le profil oxydant/antioxydant au niveau du tissu rénal des rats adultes.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre étude étant les graines de fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*). Après récolte, les graines sont débarrassées des débris. Elles subissent ensuite un lavage à l'eau distillée, un séchage à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours. Ensuite, les échantillons séchés sont broyés et conservés dans des boîtes stériles jusqu'à l'extraction.

Le procédé d'extraction du polysaccharide à partir des graines de fenugrec (PSF) débute par un traitement thermique du mélange (poudre à partir des graines de fenugrec + eau distillée) à 90 °C pendant 5 h. Le mélange obtenu est ensuite filtré sous vide pour récupérer le surnageant. Ensuite, l'éthanol absolu (1V/3V) a été ajouté afin de précipiter les sucres. Après centrifugation, le surnageant est concentré par ROTAVAPOR. Enfin, le mélange récupéré est dialysé contre un gradient d'eau distillée pendant 48 h puis lyophilisé.

### 2. Traitement des rats

Les animaux utilisés sont des rats femelles de souche Wistar pesant en moyenne 170-190 ± 3 g, provenant d'un élevage de la Faculté des Sciences de Gabès. Des rats (n=32) sont installés dans une animalerie où la température et l'humidité sont voisines de 20 °C et 60%, respectivement, et avec une alternance de 12 h d'obscurité et 12 h de luminosité.

Les animaux ont reçu une alimentation standard (provenant de la Société Industrielle de Concentrés, SNA, Sfax Tunisie) composé de glucides, lipides, protides, vitamines et oligoéléments. L'eau de boisson est l'eau de robinet.

Les procédures expérimentales ont été réalisées conformément aux directives des Instituts Nationaux de Santé pour les soins aux animaux et approuvées par le comité

d'éthique de la Faculté des Sciences de Sfax. Toutes les procédures animales ont été menées en stricte conformité avec les «directives du comité d'éthique de l'Institut» pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire. En effet, 32 rats ont été répartis sur 4 groupes de 8 rats chacun :

**Groupe A:** Des rats témoins injectés par voie intrapéritonéale par NaCl, comme véhicule ;

**Groupe B:** Des rats traités par le TMX à une dose de 100 mg/kg de poids corporels par voie intrapéritonéale ;

**Groupe C:** Des rats traités par le TMX à une dose de 100 mg/kg de poids corporels par voie intrapéritonéale et par le PSF à une dose de 100 mg/kg mélangé avec l'alimentation ;

**Groupe D :** Des rats traités par le TMX à une dose de 100 mg/kg de poids corporels par voie intrapéritonéale et par le PSF à une dose de 200 mg/kg mélangé avec l'alimentation.

Les différents groupes de rats reçoivent une injection par voie intrapéritonéale à une quantité de 2 ml/injection pendant 30 jours.

Le TMX est dissout dans du NaCl 0,9% et le PSF est mélangé dans l'alimentation standard.

### 3. Prélèvement des échantillons

Après la période du traitement, tous les animaux sont sacrifiés par décapitation dans une salle annexée à l'animalerie. Le sang est prélevé, par ponction aortique, dans des tubes héparinés puis centrifugés afin de séparer le plasma des éléments figurés. Les échantillons plasmatiques sont conservés à -20 °C pour la détermination ultérieure des taux plasmatiques de quelques paramètres biochimiques.

Les animaux sacrifiés sont ouverts ventralement, les reins des différents groupes sont prélevés, pesés et broyés à 4 °C dans du tampon phosphate (5 mM; pH 7,4), à raison de 1 ml /100 mg poids d'organe, pour la réalisation des dosages des paramètres du stress oxydatifs. D'autres échantillons sont immédiatement fixés dans une solution de formol à 10% afin de réaliser des études histologiques.

### 4. Détermination des paramètres du stress oxydatif au niveau des reins

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode décrite par Lowry *et al.* (12). Le principe se base sur la réduction du réactif de Folin en un complexe de coloration bleu en présence de protéines. Sa densité optique est calculée à 750 nm.

La peroxydation des lipides membranaires est déterminée par la mesure du produit de cette réaction, le malondialdéhyde (MDA). Celui-ci est détecté par une réaction colorimétrique à l'aide d'acide thiobarbiturique (TBA) qui détecte de faibles quantités de peroxydes lipidiques

et plus particulièrement le MDA libre. Celui-ci réagit avec le TBA pour former un chromogène rouge en milieu acide, dont l'absorption est détectée par spectrophotométrie à 532 nm (13). Le calcul des MDA se fait selon la réaction suivante :

$$\text{MDA (nmoles MDA/mg protéines)} = \frac{DO \times 10^6}{E \times L \times X \times F_d}$$

Avec DO: densité optique lue à 530 nm; E : coefficient d'extinction molaire du MDA ( $E = 1,56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); L: longueur du trajet optique ( $L = 1 \text{ cm}$ ); X: concentration en protéines (mg/ml); Fd: facteur de dilution,  $F_d = (V_{S1} \times V_S) / (V_f \times V_F)$  avec V<sub>S1</sub> : volume de prise de l'échantillon; V<sub>S</sub>: volume prélevé du surnageant; V<sub>f</sub> : volume final à l'incubation à 80°C; V<sub>F</sub>: volume final intermédiaire à la centrifugation; ici  $F_d = 0,2083$ .

Les produits d'oxydation avancée des protéines (AOPP) ont été estimés selon la méthode décrite par Witko *et al.*, (14). L'absorbance du mélange réactionnel est calculée à 340 nm. La concentration de chaque échantillon en AOPP est déterminée en utilisant le coefficient d'extinction ( $261 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) et les résultats sont exprimés en nmoles/mg de protéines.

Le dosage de l'activité du superoxydedismutase (SOD) est effectué en utilisant la technique de Beauchamp & Fridovich (15). L'activité du SOD est mesurée par sa capacité à inhiber la réduction du NBT (nitrobleu de tetrazolium) selon une méthode indirecte de photoréduction. Dans un milieu aérobie éclairé, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleuâtre (bleu de formazan) dont l'absorbance est détectée à 560 nm. L'activité enzymatique de la SOD est calculée en termes d'U/mg de protéines selon la formule suivante :

$$\text{Activité SOD} = \frac{DO_{\text{Contrôle}} - DO_{\text{essai}}}{DO_{\text{Contrôle}} \times V_e \times P} \times 20 \times 100$$

Avec V<sub>e</sub>: Volume de l'extrait enzymatique en µl (50 µl); DO: Densité optique ; P: Concentration en protéine en mg/ml; 20: Facteur de dilution.

Le dosage de l'activité de la catalase (CAT) est effectué selon la technique décrite par Aebi (16). L'activité CAT est mesurée par le suivi à 240 nm de la dismutation du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Les résultats sont exprimés en µmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transformées par minute et par mg de protéines. L'activité catalase est calculée selon la réaction suivante:

$$\text{Catalase } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min/mg protéine}) = \frac{\Delta DO \times d}{(\epsilon \times L \times X \times 0,02)}$$

Avec  $\Delta DO$ : variation de la densité optique par minute; d: dilution de l'échantillon au début;  $\epsilon$ : coefficient d'extinction de  $H_2O_2$  ( $\epsilon = 0,043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); L: largeur de la cuve ( $L = 1 \text{ cm}$ ); X: concentration de protéines en mg/ml; 0,02 : facteur de conversion de l'activité de 20  $\mu\text{l}$  à 1000  $\mu\text{l}$ .

Le dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx) est réalisé selon la technique décrite par Flohé &

Günzler (17). La GPx catalyse l'oxydation de cumène, en présence de GSH, en hydroxypéroxyde de cumène. En présence de glutathion réductase (GR) et de NADPH, le glutathion oxydé (GSSG) est immédiatement converti sous une forme réduite avec oxydation concomitante du NADPH en  $NADP^+$ . La diminution de l'absorbance qui en résulte est mesurée à 340 nm. L'activité GPx est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{GPx } (\mu\text{moles GSH oxydé/min/mg de protéines}) = \frac{(DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{Blanc}}) \times 0,04 \times 5}{DO_{\text{Blanc}} \times X \times 10}$$

Avec 0,04: quantité initiale de GSH par tube; 5: Facteur de conversion de l'activité par 1 ml; X: concentration de protéines en mg/ml; 10: temps de la réaction en min.

Le dosage du glutathion réduit (GSH) se fait selon la méthode d'Ellman (18) modifiée par Jollow *et al.*, (19). Le GSH réagit avec l'acide dithiodinitrobenzoïque (DTNB) pour former un produit de couleur jaune dont l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 412 nm.

### 5. Détermination des paramètres biochimiques au niveau du plasma

La détermination des paramètres biochimiques au niveau du plasma est réalisée grâce à un automate DXC 600.

Le dosage de la créatine se fait par une réaction colorimétrique décrite la première fois par Jaffé en 1886 (Méthode de Jaffé). Il s'agit du dosage de la créatinine avec l'acide picrique en milieu alcalin ce qui donne une couleur rouge (20). La cinétique de développement est mesurée à 500 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en créatinine (Biolabo, France).

L'urée est dosée par la méthode enzymatique décrite par Talke *et al.*, (21) (Biomaghreb, Tunis, Tunisie). Les ions ammonium, en présence de salicylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée.

L'acide urique est dosé par la méthode enzymatique et colorimétrique décrite par Fossati *et al.*, (22) (Biomaghreb). La coloration rose est évaluée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 510 nm.

### 6. Étude histologique

Après fixation par le formol tamponné à 10%, les morceaux des reins sont mis dans des cassettes et placées dans un automate afin d'assurer la déshydratation par les bains d'alcool éthylique suivis par des bains de toluène pour une bonne imprégnation des organes dans de la paraffine. Une étape d'inclusion des fragments dans la paraffine est effectuée. Ensuite, des coupes sériées sont réalisées à 3 ou 4  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, puis elles sont colo-

rées par l'hématoxyline-éosine.

### 7. Analyse statistique

Les valeurs moyennes sont exprimées avec leur écart type, représentées sur les figures par un trait vertical (barre d'erreur). La comparaison des moyennes est estimée en utilisant le Test Student entre les groupes témoins et traités (Excel, 2010). La différence est considérée significative pour  $p < 0,05$ .

## RÉSULTATS

### 1. Etude des paramètres biométriques

La figure 1 a présenté l'évolution de la masse corporelle des rats en fonction du temps. Chez le groupe traité pendant 30 jours par le TMX à une dose de 100 mg/kg/pc, une perte de 7% de leur poids en comparaison avec les rats témoins, a été notée (Figure 1). Ces résultats ont été accompagnés par une diminution de 27% de la consommation en aliments solides et une augmentation de la consommation en eau de 15% en comparaison avec celles des témoins (Tableau 1).

Le co-traitement des rats par le TMX et le PSF à deux doses différentes (100 mg/kg et 200 mg/kg) a ramené ces valeurs à la normale avec une consommation plus élevée chez les rats traités par 200 mg/kg de PSF (Tableau 1).

### 2. Etude des paramètres biochimiques au niveau du plasma

Chez les rats traités par le TMX, on a noté une augmentation des taux de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine de 9%, 17% et 5%, respectivement, par rapport aux rats témoins (Tableau 2). Toutefois, le co-traitement par le PSF a ramené toutes ces valeurs à leur niveau normal.

### 3. Etude des paramètres du stress oxydatif au niveau des reins

Le traitement par le TMX a provoqué une forte peroxydation lipidique, objectivée par une augmentation significative du taux de MDA d'environ 40% au niveau du tissu rénal (Figure 2A). Cependant, la co-administration du PSF à deux doses croissantes a induit une diminution du taux de MDA en comparaison au groupe témoin.

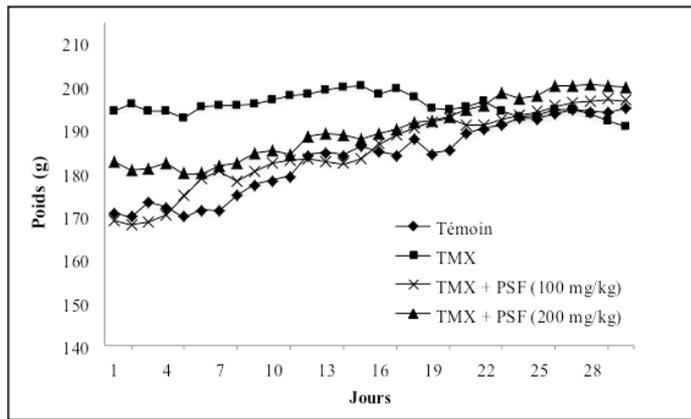


Figure 1: Évolution des poids corporels des différents groupes de rats.

TMX : rats traités au thiaméthoxame ; TMX + PSF (100 mg/kg): rats traités au thiaméthoxame associé au polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec à une dose de 100 mg/kg; TMX + PSF (200 mg/kg) : rats traités au thiaméthoxame associé au polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec à une dose de 200 mg/kg.

Tableau 1: Consommation quotidienne des aliments solides et des boissons par les différents groupes de rats

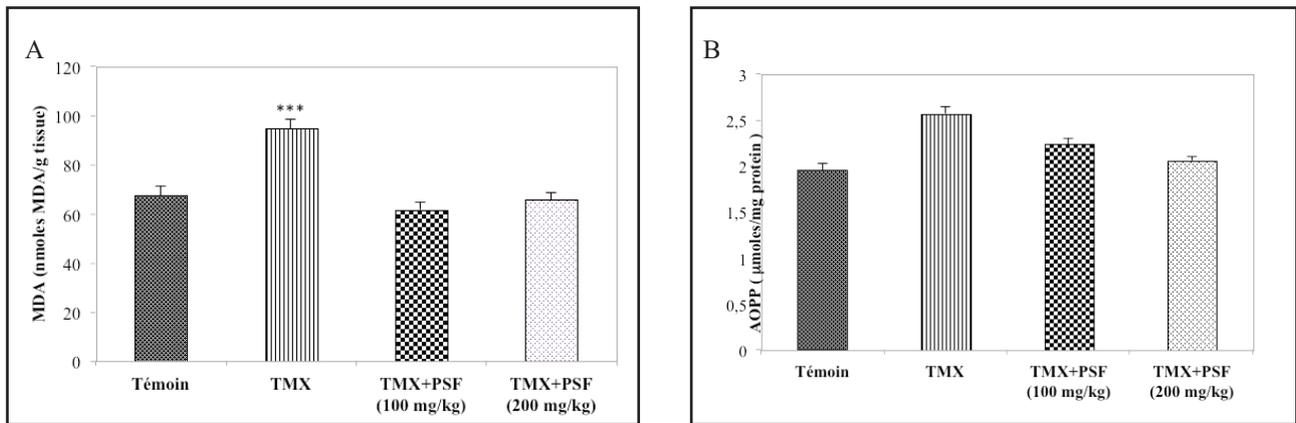
	Groupes de rats			
	Témoin	TMX	TMX + PSF (100 mg/kg)	TMX + PSF (200 mg/kg)
Aliments solides (g/j/rat)	21,382±7,72	15,708±8,99**	21,302±8,89+	25,8±9,68++
Eau (ml/j/rat)	21,989±13,64	25,779±12,27*	18,81±12,9++	19,439±12,97

Traités vs témoins : \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001.  
 Traités vs co- traités: +: p<0,05; ++: p<0,01; +++: p<0,001.  
 TMX : Thiaméthoxame ; PSF : polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec.

Tableau 2 : Taux de la GPx et la catalase et le taux de GSH chez des rats témoins et traités par le TMX pendant 30 jours associé ou non au polysaccharide (PSF)

Les paramètres	Groupes de rats			
	Témoin	TMX	TMX + PSF (100 mg/kg)	TMX + PSF (200 mg/kg)
GSH (µg/mg de protéine)	46.38 ± 0,91	66.14 ± 2,15***	48.36 ± 3,10+++	47.24 ± 0,74
CAT (µmoles de H2O2 transformées /min/mg protéine)	6.39 ± 0,25	2.64 ± 0,05***	3.19 ± 0,21**	3.85 ± 0,07
SOD (unités/mg protéine)	34.24 ± 0,4	28.25 ± 0,34***	31.17 ± 0,53** ++	32.20 ± 0,24*
GPx (nmoles de GSH/min/mg protéine)	2.20 ± 0,05	1.84 ± 0,06***	1.91 ± 0,05*** +	2.03 ± 0,03

Traités vs témoins: \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001.  
 Traités vs co- traités: +: p<0,05; ++: p<0,01; +++: p<0,001.  
 GSH : Glutathion; CAT: Catalase ; SOD: Superoxydedismutase ; GPx: Glutathion peroxydase;  
 TMX: Thiaméthoxame; PSF: polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec.



**Figure 2: Taux de MDA (A) et des AOPP (B) chez des rats témoins et traités par le TMX pendant 30 jours associé ou non au polysaccharide (PSF).**

**MDA** : malondialdéhyde ; **AOPP** : produits d’oxydations avancées des protéines; **TMX** : rats traités au thiaméthoxame; **TMX + PSF(100 mg/kg)**: rats traités au thiaméthoxame associé au polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec à une dose de 100 mg/kg; **TMX + PSF (200 mg/kg)**: rats traités au thiaméthoxame associé au polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec à une dose de 200 mg/kg.

Les résultats obtenus dans la figure 2B ont montré une augmentation significative qui atteint jusqu’à 30% des taux en produits avancés de l’oxydation protéique (AOPP), chez les groupes traités par le TMX par rapport aux rats témoins. Pour le groupe traité par le PSF associé au TMX, une diminution significative ( $p < 0,05$ ) à des valeurs proches à la normale, a été observée (Figure 2B). De plus, les résultats ont montré, suite au traitement avec le TMX, une diminution significative de l’activité de la SOD, la catalase et la GPx (Tableau 3). Cependant, la co-administration du PSF a induit une augmentation de ces activités enzymatiques à des valeurs semblables à la normale.

Le GSH, antioxydant non enzymatique, a connu une diminution suite à l’exposition des rats à cet insecticide (Tableau 3). Toutefois, la co-administration du polysaccharide *via* l’alimentation a rétabli cette perturbation à des valeurs proches de la normale.

**4. Etude des paramètres histologiques au niveau des reins**

D’après la figure 3, des modifications ont été observées au niveau des coupes histologiques des reins des différents groupes de rats. En effet, une augmentation de l’espace de filtration glomérulaire avec présence de congestion vasculaire et une infiltration leucocytaire ont été

**Tableau 3: Les biomarqueurs rénaux chez des rats témoins et traités par le TMX pendant 30 jours associé ou non au polysaccharide (PSF)**

	Groupes de rats			
	Témoin	TMX	TMX + PSF (100 mg/kg)	TMX + PSF (200 mg/kg)
Créatinine (mol/l)	40±4,36	42±6,89*	41,83±8,45+	46,33±6,65++
Urée (mmol/l)	8,06±0,7	8,77±1,28**	7,1±0,92	8,03±0,60+
Acide urique (mol/l)	23,25±3,82	27,25±3,06**	23,67±6,06	25,33±2,5+

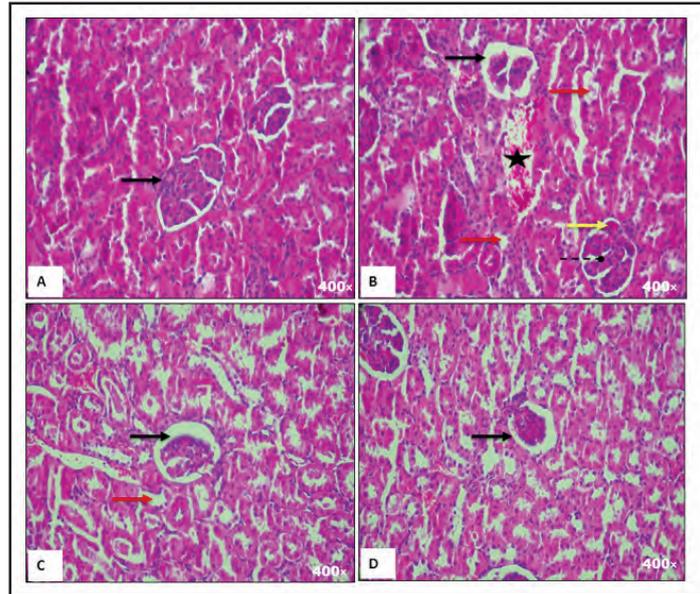
Traités vs témoins: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

Traités vs co- traités: +:  $p < 0,05$ ; ++:  $p < 0,01$ ; +++:  $p < 0,001$ .

TMX : Thiaméthoxame ; PSF : polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec.

observées chez les rats traités au TMX. De plus, ces perturbations ont été accompagnées par une altération des tubules rénaux avec installation d'une hémorragie intense (Figure 3B), en comparaison aux rats témoins (Figure 3A). Suite à l'addition du PSF dans l'alimentation des rats

traités par l'insecticide, l'histo-architecture du tissu rénal a retrouvé sa forme initiale (Figure 3C). Pour le groupe soumis à une alimentation riche en PSF, le tissu rénal a été similaire à celui des rats témoins (Figure 3A-D).



**Figure 3:** Structures histologiques des reins des rats témoins (A) des rats traitées au TMX (B), des rats traitées au TMX associé à l'PSF à une dose de 100 mg/kg (C), et 200 mg/kg (D).

Coloration à l'hématoxyline-éosine. Espace de Bowman  $\rightarrow$ , Infiltration leucocytaire  $\bullet$ , Hémorragie  $\star$ , Nécrose  $\rightarrow$  ; vascularisation  $\rightarrow$  ; TMX : Thiaméthoxame ; PSF: polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec

### DISCUSSION

Des études récentes ont démontré que les polysaccharides naturels jouent un rôle important dans la prévention des dommages oxydatifs induits par le stress comme piègeurs de radicaux libres chez les organismes vivants (8). Leur rôle consiste à empêcher l'accumulation dans la cellule des protéines ou d'ADN oxydés et à dégrader leurs fragments toxiques (23). L'objectif de ce travail consiste à étudier l'impact de l'administration intrapéritonéale d'un insecticide, le thiaméthoxame (TMX), sur des rats adultes et à tester l'effet protecteur possible d'un polysaccharide extrait à partir des graines de fenugrec (*Trigonellafoenum-graecum*) sur quelques paramètres biométriques, biochimiques, histologiques et sur le profil oxydant/antioxydant au niveau du tissu rénal.

L'étude des paramètres biométriques chez les rats exposés au TMX, administré pendant 30 jours, montre une diminution de la masse corporelle et de la consommation en aliments solides. Cette diminution est liée à l'effet toxique de cet insecticide qui induit un manque de l'appétit des rats. Quant à l'augmentation de la consom-

mation en eau, elle peut se traduire par une insuffisance rénale ou hépatique dont les symptômes sont l'apparition d'une soif excessive (24). Toutefois l'incorporation du PSF dans l'alimentation induit une allévation de la toxicité et par la suite l'amélioration de l'appétit.

Divers xénobiotiques peuvent évoquer un important déséquilibre du statut antioxydant et un endommagement des constituants cellulaires à savoir les lipides, les protéines et l'ADN (25). Dans la présente étude, les résultats montrent que l'exposition des rats au TMX a induit une augmentation significative des taux de MDA accompagnée par une élévation importante des produits avancés de l'oxydation protéique (AOPP) au niveau du tissu rénal. Cette augmentation montre que cet insecticide induit un stress oxydatif marqué par la génération de radicaux libres capables d'oxyder et d'endommager la membrane lipidique. Cependant, une diminution des taux de MDA et des AOPP chez les groupes co-traités par le PSF associés au TMX, a été notée. Ceci pourrait s'expliquer par l'activité antioxydante du PSF à capter les radicaux libres directement ou indirectement et à réagir en tant que cofacteurs enzymatiques (26).

Les antioxydants constituent le principal système de défense limitant la toxicité induite par les radicaux libres (23). Parmi les principaux antioxydants on cite la SOD, la GPx, la CAT et le GSH. En effet, la SOD joue un rôle important dans la détoxification des radicaux libres et constitue la première ligne de défense enzymatique contre le stress oxydatif (27). D'autre part, la GPx joue un rôle intracellulaire très important en agissant sur les peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidiques par l'intermédiaire du GSH (28). Dans le présent travail, les résultats montrent une diminution de l'activité de la SOD, du GPx et de la CAT avec une augmentation significative du taux de GSH qui sont probablement due à une production accrue de radicaux superoxydes ou à la réduction de leur synthèse suite à la forte toxicité induite par le TMX. Ces résultats sont en accord avec les travaux antérieurs de Feki *et al.* (6, 29) effectués sur des rats traités avec le TMX au niveau des tissus hépatiques et cardiaques. Ainsi, la co-administration du PSF rétablit efficacement l'activité enzymatique et non enzymatique grâce à son rôle de piègeurs des radicaux libres et protecteurs contre le stress oxydatif (30).

D'autre part, l'étude expérimentale *in vivo* montre que le TMX provoque des dommages au niveau des paramètres biochimiques chez les rats. Une augmentation des taux de l'urée, de l'acide urique et de la créatinine a été notée, en comparaison avec les témoins. Cette augmentation en créatinine témoigne une altération des reins et d'un éventuel dysfonctionnement ou d'une insuffisance rénale. De plus, l'augmentation des taux plasmatiques de l'urée peut refléter une défaillance de la capacité de filtrage des reins, suite à des lésions rénaux. Cependant, le co-traitement avec le PSF a rétabli de façon significative les taux en biomarqueurs rénaux à des valeurs proches de la normale. Ces résultats suggèrent que ce polysaccharide a empêché la fuite de ces enzymes du rein vers le sang en raison de ses capacités élevées à stabiliser la membrane et à réduire ainsi les dommages du tissu rénal.

Afin de confirmer les changements biochimiques, l'examen histologique du rein a été réalisé. De ce fait, le traitement au TMX provoque des changements structurels illustrés par une hémorragie, une infiltration des leuco-

cytes inflammatoires et une vacuolisation. De plus, l'examen histologique a montré une vaste dénaturation vacuolaire avec augmentation de l'espace de filtration glomérulaire chez les rats traités au TMX. Cependant, ces modifications histo-pathologiques ont été moins prononcées au niveau des reins du groupe co-traités au polysaccharide.

Toutefois, la co-supplémentation du PSF avec TMX à deux doses croissantes (100 et 200 mg/kg), réduit l'endommagement des reins et améliore les changements biochimiques et histologiques. Les résultats actuels corroborent avec les études antérieures réalisées par Kammoun *et al.*, (31), suggérant l'efficacité des polysaccharides dans la réparation des dommages causés suite à une intoxication chimique. Le mécanisme par lequel le polysaccharide exerce son action néphro-protectrice peut être dû à ses propriétés biologiques à savoir son pouvoir antioxydant, son activité antibactérienne et anti-inflammatoire. En effet plusieurs études ont montré que les polysaccharides peuvent agir en tant qu'excellent piègeur de radicaux libres, inhibant l'oxydation des lipides et des protéines. De plus, ils peuvent stabiliser l'activité membranaire en diminuant la fluidité (32). D'autre part, ces polymères peuvent inhiber la formation de radicaux libres et la propagation des réactions radicalaires *via* la donation d'hydrogène, l'hydroxylation aromatique et la chélation des ions métalliques de transition (3).

## CONCLUSION

L'exposition des rats adultes au TMX entraîne des perturbations au niveau des paramètres biométriques, biochimiques, histologiques et sur l'équilibre oxydant/antioxydant au niveau du tissu rénal. Toutefois, la co-administration du PSF a induit un effet protecteur et a corrigé considérablement les effets délétères induits par l'insecticide.

## REMERCIEMENTS

Le présent travail a été financé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, Tunisie.

Ce travail a été soutenu financièrement par le projet Tuniso-Marocain (20PRD16).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Deters AM, Lengsfeld C, Hensel A. Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;102(3):391–399.
2. Shirani G, Ganesharane R. Extruded products with Fenugreek (*Trigonella foenum-graecium*) chickpea and rice: Physical properties, sensory acceptability and glycaemic index. *Journal of Food Engineering* 2009;90(1):44–52.
3. Ktari N, Feki A, Trabelsi I, Triki M, Maalej H, Slima

- SB, *et al.*. Structure, functional and antioxidant properties in Tunisian beef sausage of a novel polysaccharide from *Trigonella foenum-graecium* seeds. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017;98:169–181.
4. Alipour HJ, Rezaei M, Shabanpour B, Tabarsa M. Effects of sulfated polysaccharides from green alga *Ulva intestinalis* on physicochemical properties and microstructure of silver carp surimi. *Food Hydrocolloids* 2018;74:87–96.
5. Kammoun I, Bkhairia I, Ben Abdallah F, Jaballi I, Ktari N, Boudawara O, *et al.* Potential protective effects

of polysaccharide extracted from *Ulva lactuca* against male reprotoxicity induced by thiacloprid. Archives of Physiology and Biochemistry 2017;123(5):334–343.

6. Feki A, Jaballi I, Cherif B, Ktari N, Naifar M, Makni Ayadi F, *et al.* Therapeutic potential of polysaccharide extracted from fenugreek seeds against thiamethoxam-induced hepatotoxicity and genotoxicity in Wistar adult rats. Toxicology Mechanisms and Methods 2019 Jun;29(5):355–367.

7. Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR, *et al.* Direct presentation of non-peptide prenyl pyrophosphate antigens to human  $\gamma\delta$  T cells. Immunity 1995;3(4):495–507.

8. Gao J, Zhang T, Jin Z-Y, Xu X-M, Wang J-H, Zha X-Q, *et al.* Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb. Food Chemistry 2015;169:430–438.

9. Bingham G, Gunning RV, Delogu G, Borzatta V, Field LM, Moores GD. Temporal synergism can enhance carbamate and neonicotinoid insecticidal activity against resistant crop pests. Pest Manag Sci 2008;64(1):81–85.

10. Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odoux J-F, Aupinel P, *et al.* A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. Science 2012;336(6079):348–350.

11. Green T, Toghiani A, Lee R, Waechter F, Weber E, Peffer R, *et al.* Thiamethoxam Induced Mouse Liver Tumors and Their Relevance to Humans. Toxicological Sciences 2005;86(1):48–55.

12. Ben Saad H, Gargouri M, Kallel F, Chaabene R, Boudawara T, Jamoussi K, *et al.* Flavonoid compounds from the red marine alga *Alsidium corallinum* protect against potassium bromate-induced nephrotoxicity in adult mice: *Alsidium corallinum* Protect Against KBrO<sub>3</sub>-Induced Nephrotoxicity Environmental Toxicology 2017;32(5):1475–1486.

13. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods in Enzymology Elsevier; 1990; pp 421–431.

14. Witko V, Nguyen AT, Descamps-Latscha B. Microtiter plate assay for phagocyte-derived Taurine-chloramines. J Clin Lab Anal 1992;6(1):47–53.

15. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 1971;44(1):276–287.

16. Aebi H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology Elsevier; 1984; (13) pp 121–126.

17. Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods in Enzymology Elsevier; 1984; (12) pp 114–120.

18. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics 1959;82(1):70–77.

19. Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione N, Gillette JR. Bromobenzene-Induced Liver Necrosis. Protective Role of Glutathione and Evidence for 3,4-Bromobenzene Oxide as the Hepatotoxic Metabolite. Pharmacology 1974;11(3):151–169.

20. Hanser AM, Hym B, Michotey O, Gascht D, Marchal A, Minery M, *et al.* (Comparison of methods

for the determination of blood creatinine). Ann Biol Clin (Paris) 2001;59(6):737–742.

21. Talke H, Keller J, Schmah F. Effect of Nicotinamide on the Regulation of Carbohydrate Metabolism in Rat Liver Horm Metab Res. 1970;2(03):147–152.

22. Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. Clinical Chemistry 1980;26(2):227–231.

23. Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J-O. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutrition Clinique et Métabolisme 2002 Dec;16(4):233–9.

24. Ben Saad H, Ben Amara I, Kharrat N, Giroux-Metgès M-A, Hakim A, Zeghal KM, *et al.* Cytoprotective and antioxidant effects of the red alga *Alsidium corallinum* against hydrogen peroxide-induced toxicity in rat cardiomyocytes. Archives of Physiology and Biochemistry 2019;125(1):35–43.

25. Ben Amara I, Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats. Ecotoxicology and Environmental Safety 2011;74(4):811–819.

26. Feki A, Ben Saad H, Jaballi I, Magne C, Boudawara O, Zeghal KM, *et al.* Methyl thiophanate-induced toxicity in liver and kidney of adult rats: a biochemical, molecular and histopathological approach. Cellular and Molecular Biology 2017;63(2):20.

27. Ben Amara I, Ben Saad H, Cherif B, Elwej A, Lassoued S, Kallel C, *et al.* Methyl-thiophanate increases reactive oxygen species production and induces genotoxicity in rat peripheral blood. Toxicology Mechanisms and Methods 2014;24(9):679–687.

28. Ben Saad H, Nasri I, Elwej A, Krayem N, Jarraya R, Kallel C, *et al.* A Mineral and Antioxidant-Rich Extract from the Red Marine Algae *Alsidium corallinum* Exhibits Cytoprotective Effects Against Potassium Bromate-Induced Erythrocyte Oxidative Damages in Mice. Biol Trace Elem Res 2014;160(1):85–96.

29. Feki A, Ben Saad H, Bkhairia I, Ktari N, Naifar M, Boudawara O, *et al.* Cardiotoxicity and myocardial infarction-associated DNA damage induced by thiamethoxam in vitro and in vivo: Protective role of *Trigonella foenum-graecum* seed-derived polysaccharide. Environmental Toxicology 2019;34(3):271–282.

30. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews 2009;56(11):317–333.

31. Kammoun I, Bkhairia I, Ben Abdallah F, Jaballi I, Ktari N, Boudawara O, *et al.* Potential protective effects of polysaccharide extracted from *Ulva lactuca* against male reprotoxicity induced by thiacloprid. Archives of Physiology and Biochemistry 2017;123(5):334–343.

32. Xie J-H, Liu X, Shen M-Y, Nie S-P, Zhang H, Li C, *et al.* Purification, physicochemical characterisation and anticancer activity of a polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves. Food Chemistry 2013;136(3–4):1453–1460.