

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Département : Biologie

Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité/Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Evaluation de l'effet protecteur de la propolis contre la
cardiotoxicité chez la souris**

Présenté par :

BAZINE Nahla

KADRI Maria

KEDADRIA Wieme

Devant le jury composé de :

Présidente : Dr MERABET Rym

MAA

Université de Guelma

Examinatrice : Dr BOUSSENANE Nadia

MCB

Université de Guelma

Encadrante : Dr BRAIK Asma

MCB

Université de Guelma

Juin 2023

Remerciement

Tout D'abord, Nous remercions Dieu tout-puissant qui nous a donné la force, le courage et la patience pour accomplir ce travail.

Nos remerciements et respect vont à Mme. MERABET Rym, Maitre de Conférences à l'université de Guelma, pour avoir accepté la présidence du jury d'évaluation de cet humble travail.

Nous exprimons également nos remerciements et considération à Mme. BOUSSENANE Nadia, Maître de Conférences à l'université de Guelma, pour avoir accepté d'évaluer et d'examiner ce modeste travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement notre encadrante Mme. BRAIK Asma, Maitre de Conférences à l'université de Guelma, qui nous a accordé l'honneur de diriger ce travail. Merci pour sa disponibilité, sa patience. Ses conseils pertinents ont été pour nous un solide repère et réconfort dans tous les moments.

Nous remercions Mr. GUEROUI Yassine, Doyen de notre faculté, pour son soutien et toute les facilités qu'il nous a accordés pour mener à bien ce modeste travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous les membres des laboratoires et animalerie de notre faculté, surtout Mme RATIBA, Mme GHANIA et Mr MEHDI pour leur aide continuelle au cours de la réalisation pratique de ce travail.

Enfin, nos remerciements vont également à toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce mémoire.

Merci

Dédicace

*Je voudrais tout d'abord, remercier **DIEU** de m'avoir donné le courage pour accomplir ce modeste travail.*

Je dédie ce travail :

A moi-même

*A mon très cher grand père «**Madjid**», que dieu te garde dans son vaste paradis.*

*A mon très cher père «**Mohammed**», mon soutien moral et ma source de joie et de*

bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde .

*A ma très chère mère «**Wassila**» pour l'affection, la patience, l'encouragement, qu'elle m'a donné pendant toute ma vie.*

*A toute ma famille **Bazine** et **Souilah***

*A mes chers amis lesquelles je considère comme mes sœurs : **Hadil, Nihed, Khawla ,Rayene, Bouchra,Hiba, Rihame et Maroua .***

*A mes partenaires dans ce travail ; **Wiem et Maria***

*A mes chers enseignants : **Mme Braik, Mme Merabet , Mme Hamdiken,Mme Grara,Mme Aissani.***

A toute personne qui m'aime.

A toute personne qui m'a aidé d'un mot, d'une idée ou d'un encouragement.

NAHLA

Dédicace

Je dédie mon travail à ma famille.

Un spécial sentiment de gratitude envers mes parents bien aimés dont les mots d'encouragement et de motivation pour la ténacité résonnent à mes oreilles.

A mes sœurs Loubna et Rayene, qui m'ont soutenu tout au long du processus. J'apprécierai toujours tout ce qu'elles ont fait, en particulier Loubna pour m'avoir aidé à développer mes compétences et à maîtriser les points de repère.

A mes chères enseignantes : M^{me} Braïk, M^{me} Merabet, M^{me} Hamdikene et M^{elle} Aïssani.

À mes amies de travail Wieme et Nahla.

MARIA

Dédicace

À l'être le plus cher de ma vie, mon modèle perpétuel, celui qui s'est toujours dévoué pour m'aider à atteindre mes objectifs

A toi mon père.

A ma mère que dieu repose son âme.

A mes sœurs HANA et KHADIJA.

A mon frère et sa femme.

À mes neveux.

A Samira.

A mes plus proches amies Maria, Nihel, Meriem et Doua.

Qu'Allah leurs prête santé À madame BRAIK Asma et tous mes enseignants, à madame Ratiba.

À mes amies de travail Maria KADRI et Nahla Bazine qui ont partagé avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.

À tous ceux qui nous ont aidés.

Ainsi à toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de mes études.

Wieme

Résumés

Résumé

La propolis est un produit de la ruche composée de polyphénols ayant un rôle protecteur contre le stress oxydant. L'effet cardioprotecteur de la propolis a été évalué sur un modèle murin d'infarctus du myocarde induit par l'isoprotérénol (ISO). L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait éthanolique de propolis (EEP) a été effectuée par le test de piégeage du radical libre 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH) et par le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP). Les souris ont été traitées par deux doses de l'EEP (50 et 100 mg/kg/jour *p.o.*) pendant 7 jours suivi d'une injection sous-cutanée d'ISO (150mg/kg) pendant deux jours consécutifs. Les résultats ont montré que l'EEP possédait une bonne capacité à piéger les radicaux libres et à réduire le fer avec un taux de 30 % de polyphénols par gramme de propolis. Les souris traitées par l'isoprotérénol ont présenté une augmentation significative de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) et une hypercholestérolémie avec un taux élevé de peroxydation lipidique accompagné d'une baisse de niveau du glutathion (GSH) et de la catalase (CAT) au niveau du tissu cardiaque. Le prétraitement par la propolis aux deux doses a significativement un effet cardioprotecteur significatif. L'EEP prévient les signes de toxicité induit par l'isoprotérénol en inhibant la peroxydation lipidique, restaurant l'activité antioxydante et diminuant les taux sériques de LDH et de cholestérol. La propolis présente une bonne activité cardioprotectrice vis-à-vis de l'infarctus du myocarde induit par l'ISO.

Mots-clés : Propolis ; Stress oxydant ; Espèces réactives de l'oxygène ; Activité antioxydante ; Isoprotérénol ; cardiotoxicité ; Infarctus du myocarde.

Abstract

Propolis is a hive product composed of polyphenols with a protective role against oxidative stress. The cardioprotective effect of propolis was evaluated in a mouse model of myocardial infarction induced by isoproterenol (ISO). The evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of the ethanolic extract of propolis (EEP) was carried out by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging test and by the ferric reducing antioxidant power test (FRAP). Mice were treated with two doses of EEP (50 and 100 mg/kg/day *p.o.*) for 7 days followed by a subcutaneous injection of ISO (150mg/kg) for two consecutive days. The results showed that EEP had a good ability to scavenge free radicals and reduce iron with a rate of 30% polyphenols per gram of propolis. Mice treated with isoproterenol showed a significant increase in lactate dehydrogenase (LDH) activity and hypercholesterolemia with a high rate of lipid peroxidation accompanied by a decrease in glutathione (GSH) and catalase (CAT) levels in heart tissue. Pretreatment with propolis at both doses has a significant cardioprotective effect. EEP prevents signs of isoproterenol-induced toxicity by inhibiting lipid peroxidation, restoring antioxidant activity and lowering serum LDH and cholesterol levels. Propolis exhibits good cardioprotective activity against ISO-induced myocardial infarction.

Keywords: Propolis; Oxidative stress; Reactive oxygen species; Antioxidant activity; Isoproterenol; cardiotoxicity; Myocardial infarction.

المخلص

العكبر هو منتج نحلي يتكون من مادة البوليفينول التي لها دور وقائي ضد الإجهاد التأكسدي. تم تقييم التأثير الواقي للقلب للعكبر في نموذج الفئران لاحتشاء عضلة القلب الناجم عن الأيزوبروتيرينول (ISO). تم إجراء تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلص الإيثانولي للعكبر بواسطة اختبار إزالة الجذور الحرة (DPPH), وباختبار قوة الاختزال للحديد (FRAP). عولجت الفئران بجرعتين من المستخلص الإيثانولي للعكبر EEP (100 و 50 مغ/كغ/يوم عن طريق الفم) لمدة 7 أيام متبوعة بحقن الأيزوبروتيرينول ISO (150 مغ/كغ) تحت الجلد لمدة يومين متتاليين. أظهرت النتائج أن EEP لديه قدرة جيدة على تثبيط الجذور الحرة وارجاع الحديد بمعدل 30٪ بوليفينول لكل جرام من العكبر. أظهرت الفئران التي عولجت بالأيزوبروتيرينول زيادة كبيرة في نشاط lactate dehydrogenase (LDH) وفرط كوليسترول الدم مع ارتفاع معدل أكسدة الدهون مصحوبًا بانخفاض في مستوى glutathione (GSH) و catalase (CAT) في أنسجة القلب. المعالجة المسبقة بالعكبر بكلتا الجرعتين لها تأثير كبير في حماية القلب. يمنع EEP علامات السمية التي يسببها الأيزوبروتيرينول عن طريق تثبيط أكسدة الدهون، واستعادة نشاط مضادات الأكسدة وخفض مستويات LDH والكوليسترول في الدم يُظهر العكبر نشاطًا جيدًا وقائيًا للقلب ضد احتشاء عضلة القلب الناجم عن ISO.

الكلمات المفتاحية: العكبر؛ الإجهاد التأكسدي؛ الجذور الحرة؛ النشاط المضاد للأكسدة؛ إيزوبروتيرينول؛ السمية

القلبية؛ احتشاء عضلة القلب.

Table des matières

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction1

Revue bibliographique

Stress oxydant et supplémentation antioxydante

I. Stress oxydatif.....	3
1. Définition et origine du stress oxydant	3
2. Espèces réactives de l’oxygène.....	3
2.1. Définition des ERO.....	3
2.2. Origine des ERO.....	4
2.3. Cibles des ERO	5
3. Stress oxydatif et pathologie cardiaques	10
4. Système antioxydant.....	12
4.1. Antioxydants enzymatiques.....	13
4.2. Antioxydants non enzymatiques	14
4.3. Supplémentation antioxydante	16
II. Propolis : Antioxydant naturel.....	18
1. Origine et composition de la propolis	18
2. Caractéristiques de la propolis.....	20
3. Propriétés biologiques de la propolis.....	20
3.1. Activité antioxydante et antitumorale	21
3.2. Activité anti-inflammatoire et immun-modulatrice.....	21

3.3. Activité antimicrobienne.....	21
3.4. Activité antivirale	22
4. Propolis et cardioprotection	22

Isoprotérénol et cardiotoxicité

I. Infarctus du myocarde	24
1. Définition de l'infarctus de myocarde	24
2. Physiopathologie de l'infarctus du myocarde	24
3. Evaluation des lésions induites lors de l'infarctus du myocarde	27
3.1. Paramètres hémodynamiques	27
3.2. Marqueurs biologiques dans le sang	27
3.3. Mesure de la taille de l'infarctus.....	29
3.4. Marqueurs de souffrance cellulaire cardiaques	29
4. Modèles expérimentaux de l'étude de l'infarctus du myocarde.....	32
4.1. Modèles <i>in vivo</i>	32
4.2. Autres modèles.....	33
II. Isoprotérénol.....	34
1. Structure et composition chimique	34
2. Propriété physicochimique de l'isoprotérénol	34
3. Pharmacocinétique de l'isoprotérénol	34
4. Mécanisme d'induction de l'IM par l'isoprotérénol	35

Partie Pratique

I. Evaluation de l'activité antioxydante de la propolis <i>in vitro</i>	38
1. Matériel végétal.....	38
1.1. Présentation.....	38
1.2. Solubilité.....	38

2. Méthodes	38
2.1. Dosage des Polyphénols.....	38
2.2. Dosage des flavonoïdes	39
2.3. Mesure de l'activité antioxydante Test DPPH	40
2.4. Test de la réduction du fer FRAP	41
II. Evaluation de l'effet cardioprotecteur de la propolis <i>in vivo</i>	42
1. Matériel animal.....	42
2.1. Protocole expérimental	42
2.3. Evaluation des marqueurs biochimiques cardiaques.....	43
2.4. Evaluation des paramètres de stress oxydant dans le tissu cardiaque	44
2.4.1. Préparation de la fraction cytosolique	44
2.4.2. Evaluation des dommages oxydatifs.....	44
2.4.3. Evaluation du statut antioxydant	45
2.5. Mesure de la taille de l'infarctus du myocarde par la coloration TTC	48
<i>Résultats et Discussion</i>	50
Conclusion	67
<i>Références bibliographiques</i>	62
<i>Annexes</i>	73

Liste des figures

Figure 1: Formation des différentes ERO à partir du radical superoxyde.....	4
Figure 2: Principales sources des ERO.	5
Figure 3: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	6
Figure 4: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.....	8
Figure 5: Etapes de la peroxydation des AGPI (exemple de l'acide arachidonique).	9
Figure 6: Exemple de la voie classique de glycation d'une protéine conduisant aux AGE.....	10
Figure 7: Rôle pathologique du stress oxydatif dans les maladies cardiovasculaires.	11
Figure 8: Classification des antioxydants.....	12
Figure 9: Structure du GSH.....	14
Figure 10 : Vues antérieure et postérieure de la circulation coronarienne dans un myocarde sain.....	25
Figure 11: Physiopathologie de l'IM.....	26
Figure 12: Mécanisme moléculaire la cardiotoxicité induite par l'isoprotérénol.....	37
Figure 13: Radical libre DPPH. AH est une molécule donneuse antioxydante et A est un radical libre formé.	40
Figure 14: Mécanisme de réduction de ferricyanure de potassium.	41
Figure 15: Réaction du malonaldéhyde(MDA) avec l'acide trichloracétique.....	45
Figure 16: Réaction du glutathion (GSH) avec le réactif d'Ellman/DTNB ; Acide 2-nitro-5-mercapto-benzoïque.....	46
Figure 17: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.	50
Figure 18: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.....	51
Figure 19: Pourcentage du piégeage du radical DPPH par la propolis et la quercétine.	53
Figure 20: Activité antioxydante de la propolis et de la quercétine par le test FRAP.	55
Figure 21: Variation des rapports de poids cœur/corps chez les différents lots.....	56
Figure 22: Variation de l'activité de la LDH plasmatique chez les souris des différents lots.	57
Figure 23: Variation des taux de cholestérol sérique chez les souris des différents lots.	59

Figure 24 : Variation des taux de MDA chez les souris des différents lots.	60
Figure 25: Variation des taux du glutathion réduit chez les souris des différents lots.....	62
Figure 26: Variation de l'activité de la catalase chez les souris des différents lots.	64

Liste des tableaux

Tableau 1. Compositions chimique de l'extrait brute de propolis.....	19
Tableau 2. Composition chimiques des propolis pure.	19
Tableau 3. Caractéristique physico-chimique de la propolis.....	20
Tableau 4. Paramètres des stress oxydant.	30
Tableau 5: Pourcentages d'inhibition de la propolis et la quercétine.	54
Tableau 6: vue macroscopique du tissu myocardique des différents lots.	66

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
AG	Acide gallique
AGE	Produits de glycation avancée
AGPI	Acides gras polyinsaturés
AIF	facteur d'activation mitochondrial
AOPP	Acide l- α -aminoxy-phénylpropionique
ARN	Acide ribonucléique
ASAT	Aspartate-Amino-Transférase
ATP	Adenosine Triphosphate
CAT	Catalase
CD	Classe de différenciation
CK	Créatine Kinase
CK-MB	Créatine Kinase bande myocardique
cyt c	cytochrome c
DIABLO	protéine de liaison IAP directe à faible pI
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	Acide 5,5-dithiodis-2-nitrobenzoïque
EAG	Equivalent d'acide gallique
EEP	Extrait éthanolique de la propolis
EPAC	ester phénéthylque de l'acide caféique
EQ	Equivalent quercétine
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
FRAP	Pouvoir antioxydant réducteur ferrique
GC	chromatographie en phase gazeuse
GC-MS	chromatographie en phase gazeuse et spectroscopie de masse
GPX	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion Réduit
GSSG	Disulfure de Glutathion
4-HNE	4-hydroxynonéal
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
HOCl	acide hypochloreux
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
HtrA2	Omi/protéine A2 à haute température
IM	Infarctus du myocarde
IAM	Infarctus du myocarde aigu
IAP	Protéine inhibitrice de l'apoptose
IC₅₀	la concentration d'inhibition de 50 % des radicaux libres
IL	Interleukine

IM	Infarctus du myocarde
ISO	Isoprotérénol
IsoP	Isoprostanés
KCl	Chlorure de potassium
LAD	Artère interventriculaire antérieure
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LDL-C	Cholestérol- Lipoprotéines de basse densité
LPO	Peroxydation des lipides
LVDP	pression développée ventriculaire gauche
LVEDP	pression diastolique d'extrémité ventriculaire gauche
MDA	Malondialdéhyde
M	Molaire
mg	milligramme
mM	millimolaire
MPO	Myéloperoxydase
NaCl	Chlorure de sodium
ng	Nanogramme
NMB	Acide 2-nitro-5-mercapto-benzoïque
NO	Oxyde nitrique
NO₂	dioxyde d'azote
NOS	oxyde nitrique synthase
OMS	Organisation mondiale de la santé
·OH	hydroxyle
8-OH-dG	8-hydroxy-2'-désoxyguanosine
ONOO⁻	peroxynitrite
P100	Propolis 100 mg/kg
P50	Propolis 50 mg/kg
PCV	Pathologies cardiovasculaires
QRC	Quercétine
RMN	magnétoscopie nucléaire résonance
RO[·]	alcoxyle
ROO[·]	peroxyde
SC	Sous-cutanée
SH	Groupe sulfhydryle
Smac	second activateur de la caspase dérivé de la mitochondrie
SOD	Superoxyde Dismutase
MS	la spectroscopie de masse
TBARS	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TBA	Tetrabutylammonium
TCA	2,4,6-trichloro-anisole
TNB	Acide 2-nitro-5-mercapto-benzoïque
TNF	Facteurs de nécrose tumorale
TTC	2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
TTF	Formazan de triphényl-tétrazolium
Trx	Thiorédoxine
TUNEL	Marquage de fin de pseudo d'UTP médié par la transférase terminale

UTP
UI/L

Uridine-5'-triphosphate
Unité internationale par Litre

Introduction

Introduction

Les pathologies cardiovasculaires (PCV) sont considérées actuellement comme étant la principale cause de morbidité et de mortalité dans le monde entier **(Ciumărnean et al., 2021)**. Les données révélées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indiquent que ces maladies ont entraîné environ 17,9 millions de décès en 2019, soit 32 % de l'ensemble des décès survenus dans le monde et il est prévu qu'il atteigne 22,2 millions d'ici 2030 **(Puteri et al., 2022; Şahin and İlğün, 2022)**.

Les PCV font référence à un ensemble de maladies associées aux anomalies cardiaques et vasculaires, entre autres les maladies coronariennes qui sont provoquées par une insuffisance d'irrigation sanguine oxygénée dans le muscle cardiaque aboutissant à des problèmes cardiovasculaires sévères, comme l'infarctus du myocarde (IM) ou même le décès. La pathogénèse de l'IM implique principalement la surproduction des radicaux libres entraînant ainsi un stress oxydant **(Bhattacharya et al., 2011; Fuentes et al., 2019; Puteri et al., 2022)**.

Plusieurs tentatives pour améliorer la prise en charge de l'IM aiguë entraînent la mise en œuvre de traitements vitaux tels que les pharmacothérapies, les procédures d'angioplastie et les méthodes de prévention. Toutefois, les résultats des traitements actuels sont nettement restreints et sont pourvus d'effets indésirables. Par conséquent, il est indispensable de chercher une nouvelle substance avec une toxicité moindre pour la prévention et le traitement des PCV **(Boarescu et al., 2019; Li et al., 2018)**. En effet, les substances bioactives naturelles représentent une approche thérapeutique innovante pour le traitement de l'IM **(Neto et al., 2022)**.

Dans ce contexte, le modèle standard couramment utilisé pour examiner les effets cardioprotecteurs des substances phytochimiques, des extraits de plantes, des dérivés/analogues de plantes est l'induction de l'IM par l'Isoprotérénol. Ce modèle d'IM est comparable à l'infarctus chez les humains **(Li et al., 2018; Neto et al., 2022)**. L'isoprotérénol produit des radicaux libres extrêmement toxiques pour les cellules par auto-oxydation, ce qui induit une peroxydation des phospholipides de la membrane, causant ainsi des dommages importants à la membrane du muscle cardiaque **(Boarescu et al., 2019)**.

Par ailleurs, il existe une substance naturelle, qui depuis des siècles, est toujours utilisée en médecine traditionnelle. La propolis est utilisée pour diverses affections grâce à ses propriétés biologiques. Sa composition en substances polyphénoliques telles que les flavonoïdes, les acides phénoliques et leurs esters est la raison de ses multiples vertus reconnues notamment comme antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes, antivirales, immunomodulatrices et antiprolifératives (**Ahmed et al., 2017; Taufik et al., 2022**). Des travaux de recherches ont testé l'effet cardioprotecteur de la propolis malaisienne, brésilienne, vis-à-vis de l'infarctus du myocarde chez le rat (**Ahmed et al., 2017; Neto et al., 2022**). Par ailleurs, la propolis algérienne a fait l'objet de plusieurs études de cardioprotection contre les anticancéreux (**Alyane et al., 2008**) et l'ischémie cardiaque (**Braik et al., 2019**). Cependant aucune étude de l'effet cardioprotecteur de la propolis sur l'infarctus du myocarde induit par l'isoprotérénol n'a été testé.

Notre travail permet d'examiner les effets du prétraitement avec la propolis sur les modifications du statut oxydatifs durant l'IM chez la souris par l'isoprotérénol.

Notre mémoire est divisé en deux volets. Le premier est une revue bibliographique qui aborde des notions théoriques sur le stress oxydant, la propolis et son intervention dans la cardioprotection. Cette revue permet aussi de présenter la physiopathologie de l'infarctus du myocarde ainsi que le mécanisme d'induction de l'IM par l'isoprotérénol. Le second volet décrit la méthodologie suivie pour mener à bien cette étude ainsi que les résultats obtenus et leur discussion, puis une conclusion est présentée à la fin du mémoire.

Revue bibliographique

Chapitre I

*Stress oxydant et supplémentation
antioxydante*

I. Stress oxydatif

1. Définition et origine du stress oxydant

Le stress oxydatif est reconnu comme étant un élément essentiel dans l'apparition et les complications de diverses maladies chroniques (**Zbadi et al., 2018**). Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des oxydants, ce qui perturbe la signalisation et le contrôle redox et/ou endommage les molécules (**Sies, 2020**).

Sous des conditions physiologiques normales, les mécanismes de défense de notre corps régulent efficacement la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) : l'équilibre entre les antioxydants et les pro-oxydants est maintenu. Le stress oxydant se produit lorsque l'organisme ne parvient plus à contrôler la présence excessive des ERO toxiques, la surabondance de ces derniers qui ne sont pas neutralisées par les systèmes de défense est extrêmement dangereuse pour les macromolécules vitales de nos cellules (**Zbadi et al., 2018**).

2. Espèces réactives de l'oxygène

2.1. Définition des ERO

Les ERO ont une fonction cruciale dans la régulation de multiples fonctions physiologiques chez les êtres vivants. Elles représentent un groupe de composés chimiques qui se forment lorsque l'oxygène est partiellement réduit et incluent principalement l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2), le radical hydroxyle ($^{\cdot}OH$), l'acide hypochloreux ($HOCl$), le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) et Le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Figure 1) (**Yang et al., 2019**).

Les ERO sont des molécules dotées d'électrons célibataires dans leur orbite externe. De ce fait, ces composés sont hautement instables et très réactifs, et ils ont tendance à déclencher des réactions en cascade qui engendrent des changements chimiques irréversibles des protéines ou des lipides. Ces réactions nocives peuvent causer des troubles cellulaires graves et même de la cytotoxicité (**Lefer and Granger, 2000**).

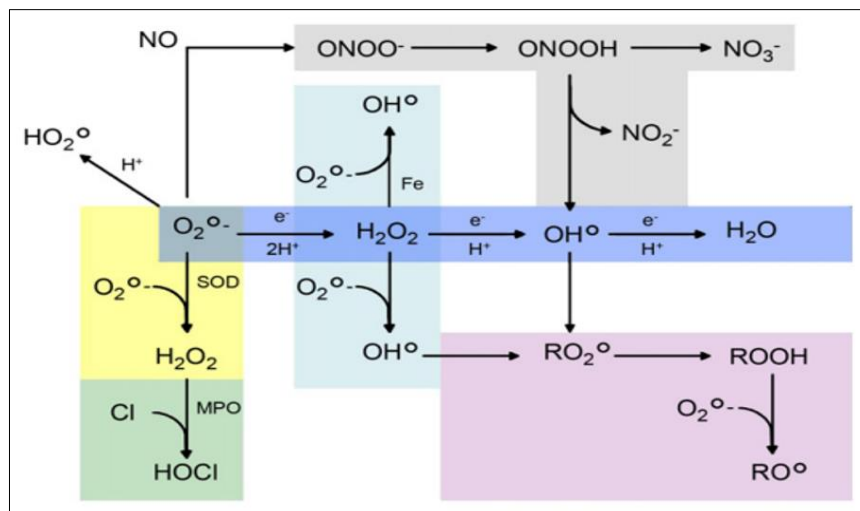


Figure 1: Formation des différentes ERO à partir du radical superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

2.2. Origine des ERO

La production des ERO est essentiellement d'origine enzymatique et résulte de plusieurs sources : la NAD(P)H oxydase membranaire et le complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire sont les principales. D'autres sources, cytosoliques ou présentes au sein de différents organites cellulaires, peuvent également jouer un rôle dans la modulation de la signalisation intracellulaire : xanthine oxydase, enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipoxygénases, cyclo-oxygénases), enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochromes P450) et peroxysomes. Les NO synthases sont, quant à elles, à l'origine de la synthèse du radical NO^\bullet , mais elles peuvent aussi dans certaines conditions (faible concentration en L-arginine ou en co-substrat réduit, la tétrahydrobioptérine...) produire des anions superoxyde (figure 2) (Fatehi-Hassanabad et al., 2010), (Migdal and Serres, 2011).

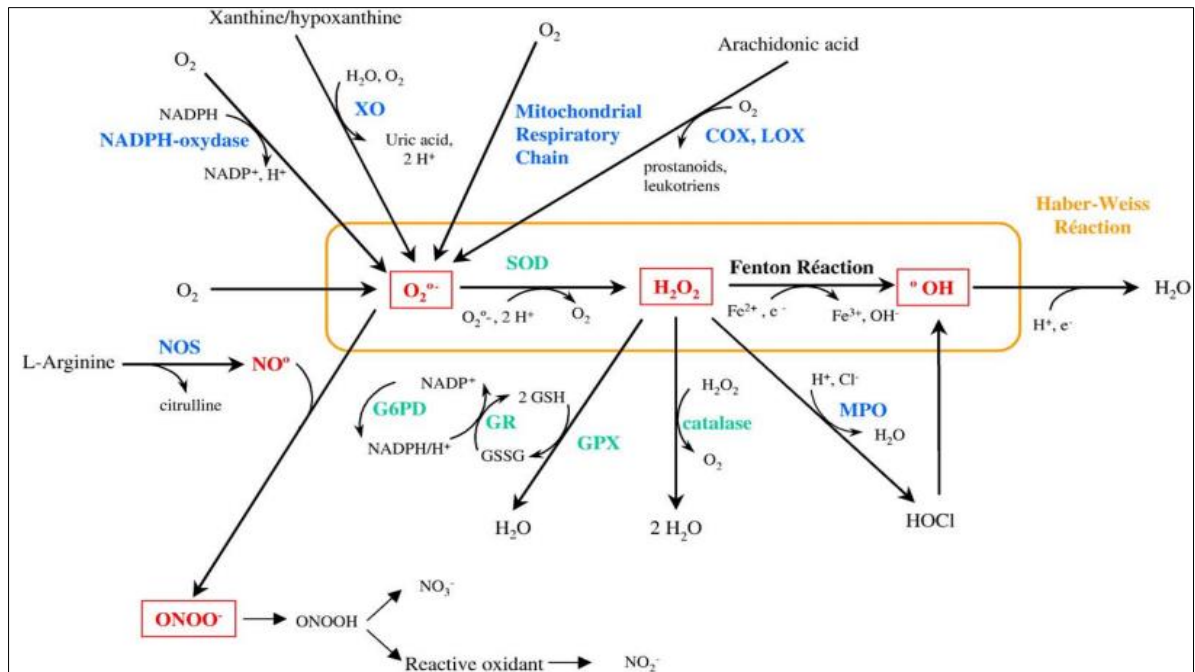


Figure 2: Principales sources des ERO (Margail et al. 2005).

Les anions superoxydes, très réactifs, sont principalement produits par (1) la voie de l'acide arachidonique, (2) la chaîne respiratoire mitochondriale, (3) l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine par la xanthine oxydase, et (4) les NADPH-oxydases. Les anions superoxydes peuvent réagir avec l'oxyde nitrique, produit par les synthèses d'oxyde nitrique, pour générer un oxydant puissant, le peroxyde nitrite, ou être dégradés par le superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène, une espèce moins réactive. Le peroxyde peut alors (1) être catabolisé par la glutathion peroxydase ou la réaction de la catalase, (2) réagir avec le Fe²⁺ pour former des radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton, ou (3) être dégradé par le superoxyde dismutase en une espèce moins réactive. La réaction de Fenton, ou (3) être dégradé par la myéloperoxydase, une autre source de radicaux hydroxyles. Abréviations : COX, cyclooxygénase ; G6PD, glucose-6-phosphate déshydrogénase ; GSH, glutathion réduit ; GR, glutathion réductase ; GPX, glutathion peroxydase ; GSSG, glutathion oxydé ; HOCl, acide hypochloreux ; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène ; LOX, lipoxygénase ; MPO, myéloperoxydase ; NADPH, nicotinamide adénine diphosphate ; NO, oxyde nitrique ; NO₃, nitrate ; NO₂, nitrite ; NOS, NO synthase ; O₂^{•-}, anion superoxyde ; •OH, radical hydroxyle ; ONOO•, anion peroxyde nitrite ; ONOOH, acide peroxyde nitrique ; SOD, superoxyde dismutase ; XO, xanthine oxydase.

2.3. Cibles des ERO

Lors du stress oxydant, toutes les macromolécules cellulaires sont des cibles potentielles des ERO (Barouki, 2006). Les ERO ont la capacité d'oxyder de nombreuses molécules biologiques telles que les glucides et les acides nucléiques, les lipides et les protéines. Par trois modes d'action :

- Elimination d'un électron, ex. : $\cdot\text{OH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{}^-\text{OH}$
- Arrachement d'un atome d'hydrogène sur un substrat organique RH.
Ex : $\cdot\text{OH} + \text{RH} \rightarrow \text{R}\cdot + \text{H}_2\text{O}$ (réaction qui se produit lors de l'oxydation des lipides).
- Addition sur une double liaison, ex. : $\cdot\text{OH} + >\text{C}=\text{C}< \rightarrow >\text{C}-\text{C}(\text{OH})$ (**Durand et al., 2013**).

2.3.1. Acide désoxyribonucléique (ADN)

Qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, l'ADN est une cible majeure des ERO. Les radicaux $\text{O}_2\cdot^-$ et $\text{OH}\cdot$ causent des dommages à l'ADN. Interagissent avec les bases puriques et pyrimidiques mais aussi avec le désoxyribose (**Koehler-Ramonatxo, 2006**). Par exemple, La guanine peut réagir avec $\text{OH}\cdot$ pour former la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OH-dG) qui à son tour se liera à l'adénine au lieu de la cytosine (**Haleng et al., 2007**).

Il existe cinq catégories principales de dommages oxydatifs, peuvent être engendrés par le radical $\text{OH}\cdot$. Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaires, des cassures de brins et des pontages ou "cross-links" ADN-protéines (Figure 3) (**Favier, 2003**).

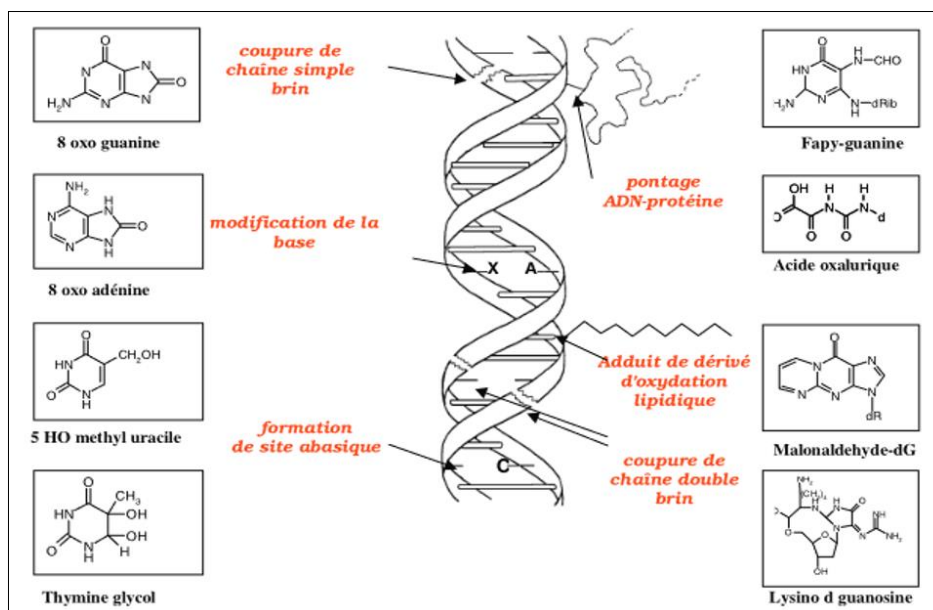


Figure 3: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (**Favier, 2003**).

Les lésions non réparées perturberont les mécanismes de réplication de l'ADN et conduiront soit à des erreurs de lecture et de synthèse par ADN polymérase qui entraînent une mutation ponctuelle dans le génome, soit l'impossibilité de copie de l'ADN qui conduira à une suicide cellulaire programmée par un mécanisme appelé apoptose (**Hamma, 2016**).

Dans le cas de L'ADN mitochondrial, la molécule est très vulnérable aux attaques des ERO en raison de sa proximité avec la chaîne de transport d'électrons, site de génération de $O_2\cdot$. Même dans des conditions normales, il se détériore rapidement en raison du manque de protection des histones et de la présence faible des mécanismes de réparation, les mutations se produisent à un rythme d'au moins cinq à 10 fois plus que le taux observé dans l'ADN nucléaire (**Hamma, 2016**).

2.3.2. Protéines

Les protéines sont des cibles majeure aux attaques des radicaux libres, notamment celles qui contiennent un groupement sulfhydryle (SH), en raison de leur abondance dans les cellules (**Hamma, 2016**). Des modifications oxydatives des protéines peuvent être induites par des ERO sur la chaîne polypeptidique et les chaînes latérales des acides aminés (**Therond, 2006**).

Les protéines peuvent soit subir une réticulation par formation de ponts di-tyrosine particulièrement détectables par leur fluorescence, ou subissent des coupures en cas d'extrême agression, soit des modifications de certains acides aminés en cas d'attaques modérées (**Favier, 2003**).

De plus, les protéines oxydées perdent leur capacité à se lier correctement au récepteur ou à se lier à un ligand spécifique et deviennent plus sensible à l'action des protéases notamment du protéasome. Les protéines oxydées deviennent également très hydrophobes, soit par l'élimination de groupements amines ionisables, soit par extériorisation des régions hydrophobes centrales. Ils formeront alors des amas anormaux qui s'accumulent dans les cellules ou autour des cellules. Ces groupes, associés aux lipides, forment les dépôts de lipofuscine caractéristiques de tissus (**Favier, 2003**).

Les ERO sont capables de réagir avec les différents acides aminés qui composent la protéine, notamment, Les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine), soufrés (méthionine,

cystéine) ou aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine). Les acides aminés aromatiques sont les plus sensibles à l'oxydation par les ERO (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**).

L'oxydation va entraîner la perte d'acides aminés essentiels, notamment par l'ajout de groupements carbonyles. Ces groupements carbonyles peuvent interagir avec les fonctions amines non oxydées de la lysine pour former des liaisons imines (-HCN-), ce qui peut conduire à l'agrégation des protéines (Figure 4) (**Hamma, 2016**).

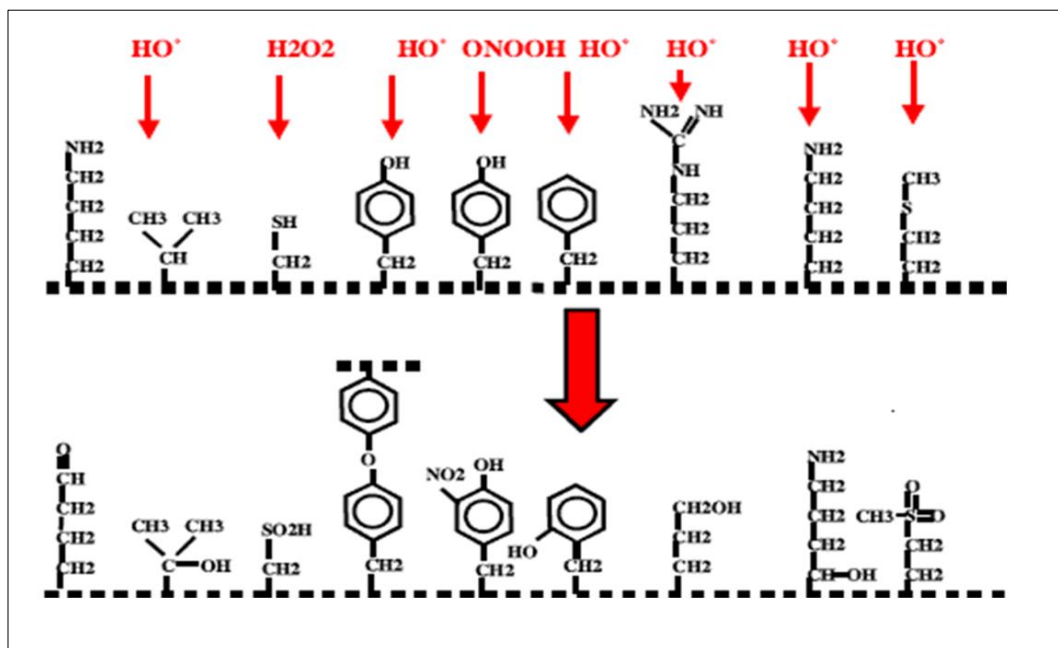


Figure 4: Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (**Favier, 2003**).

2.3.3. Lipides

Les lipides et surtout les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les cibles privilégiées de l'attaque radicalaire en raison de leur richesse en hydrogène bis-allylique facilement oxydable. Cette réaction est appelée « peroxydation lipidique » (**Durand et al., 2013**). La peroxydation lipidique est un processus de réaction radicalaire en chaîne responsable de la formation de plusieurs produits primaires (hydroperoxydes) ou secondaires (aldéhydes) (Figure 5) (**Haleng et al., 2007 ; Favier, 2003**).

Le MDA et le 4-HNE peuvent interagir avec les groupes amino libres des protéines et de l'ADN, entraînant la formation d'adduits capables de modifier les propriétés biologiques des protéines et sont hautement mutagènes. De plus, les protéines modifiées par le MDA sont immunogènes (Hamma, 2016).

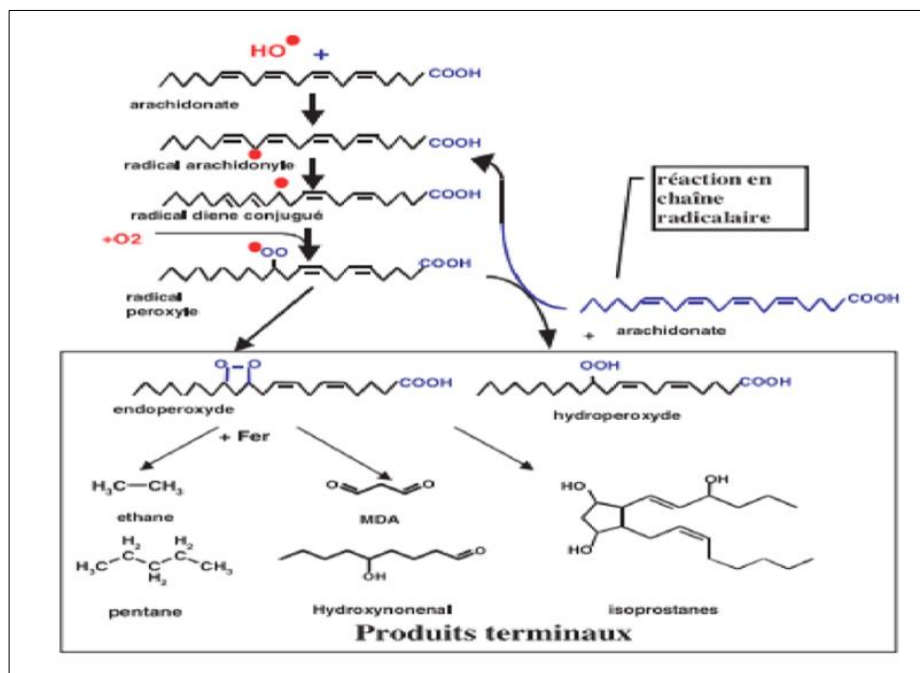


Figure 5: Etapes de la peroxydation des AGPI (exemple de l'acide arachidonique) (Favier, 2003).

2.3.4. Polysaccharides

Si la chimie d'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules. De plus, le glucose peut être oxydé dans des conditions physiologiques, en présence d'oligo-métaux, en libérant du cétoaldéhyde, H_2O_2 et OH^\bullet , provoquant la glycation (Favier, 2003).

Une réaction de glycation est une réaction non enzymatique entre la fonction carbonyle d'un sucre et la fonction amine libre d'un acide aminé d'une protéine, souvent la lysine ou l'arginine, pour former une base de Schiff réversible (Urios et al., 2007). La réaction dépend fortement du temps d'exposition au sucre et de la concentration du sucre (Wautier et al., 2014).

La base de Schiff peut subir un réarrangement moléculaire qui conduit à la formation de cétoamine stable ou produit d'Amadori, Ces derniers peuvent être transformés, en quelques semaines, en produits dicarboxylés hautement réactifs tels que les glucosones pour former des AGE (par exemple la 1,4-désoxyglucosone liée à un précurseur protéique du glucosepane) (Figure 6) (Urios et al., 2007).

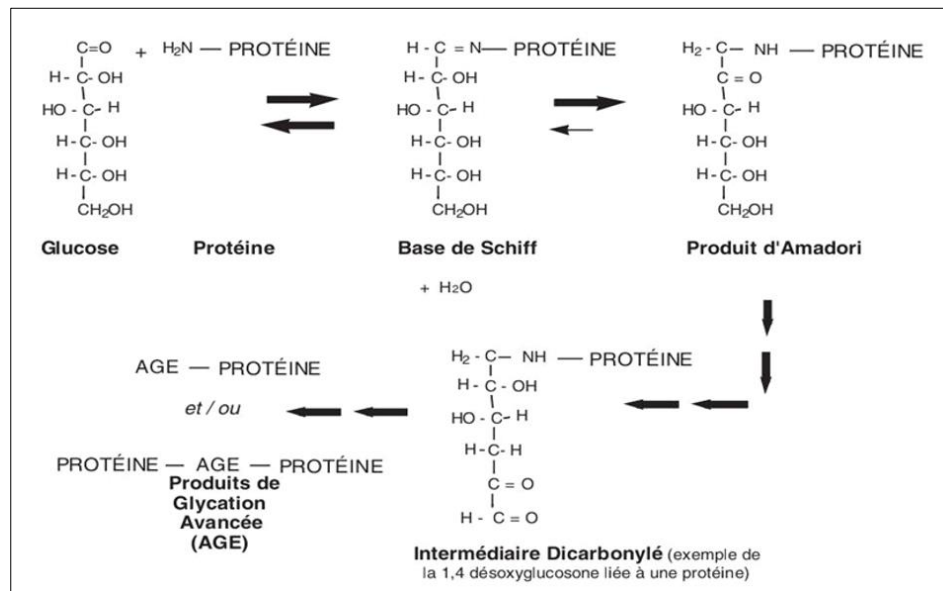


Figure 6: Exemple de la voie classique de glycation d'une protéine conduisant aux AGE (Peyroux and Sternberg, 2006 ; Urios et al., 2007).

3. Stress oxydatif et pathologie cardiaques

Les PCV sont des syndromes cliniques résultantes de plusieurs facteurs de risque, d'origines variées, qui incluent notamment l'hyperlipidémie, l'hypertension artérielle, la consommation de tabac, le diabète, les déséquilibres nutritionnels, le stress et la faible activité physique (Pizzino et al., 2017). La pathophysiologie des PCV, principalement engendrée par l'athérosclérose, implique la modification de la structure des vaisseaux sanguins qui peut causer des obstructions du flux sanguin affectant le cœur et le système nerveux. Ces affections regroupent différents troubles tels que les troubles coronariens, les accidents vasculaires cérébraux, l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, les cardiopathies congénitales et les maladies vasculaires (Dubois-Deruy et al., 2020). Ces dernières années, les résultats des études ont mis en évidence que le

stress oxydatif peut être considéré comme une origine majeure ou mineure de diverses pathologies cardiaques (Pizzino et al., 2017).

Les ERO peuvent entraîner une altération oxydative des macromolécules cellulaires essentielles (lipides, protéines ou ADN). Ce qui conduit à des changements dans les organites subcellulaires (Noyau, réticulum sarcoplasmique, mitochondries, sarcoleme). Les ERO pourraient altérer la capacité de contraction en oxydant la Ca_2^+ -ATPase du réticulum sarco/endoplasmique, ainsi que les protéines contractiles comme la tropomyosine et l'actine, ce qui conduirait à un mauvais fonctionnement contractile (Figure 7) (Dubois-Deruy et al., 2020).

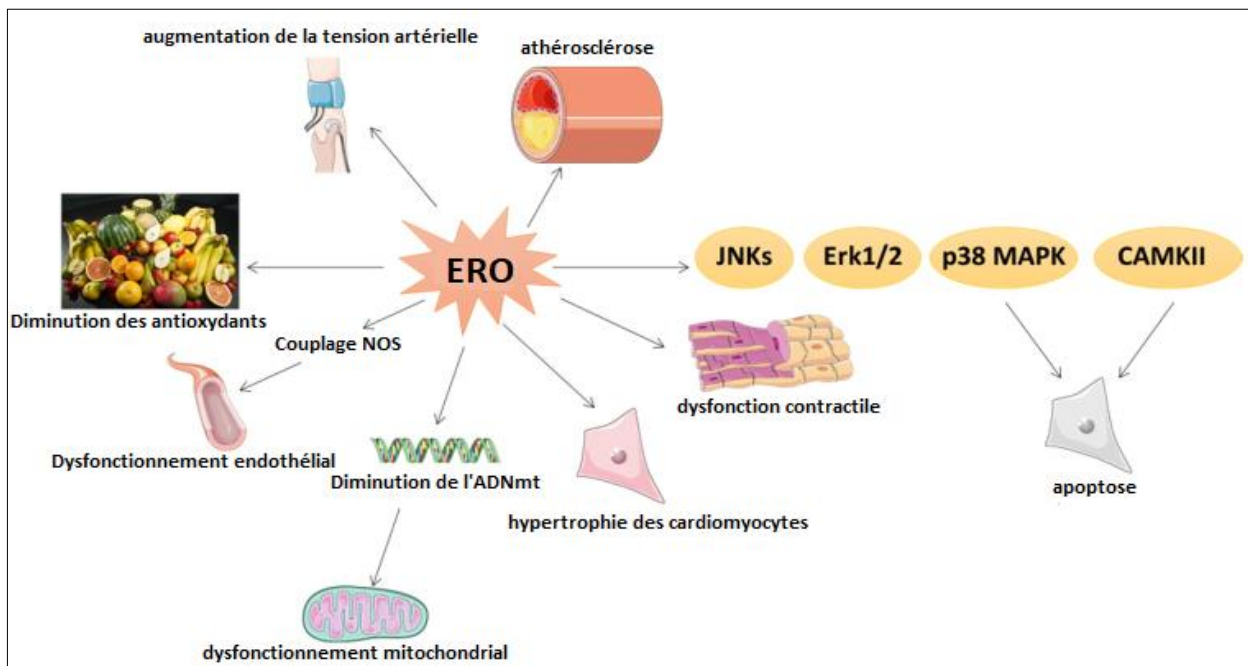


Figure 7: Rôle pathologique du stress oxydatif dans les maladies cardiovasculaires (Dubois-Deruy et al., 2020).

ERO : espèces réactives de l'oxygène). *NOS*: oxyde nitrique synthase. *ADNmt* : ADN mitochondrial. *JNK* : kinase N-terminale c-Jun. *Erk1/2* : kinases extracellulaires régulées par le signal. *P38 MAPK* : protéine kinase activée par un mitogène p38. *CAMKII* : Ca/calmoduline-dépendante kinase II.

4. Système antioxydant

La production physiologique d'ERO est entièrement contrôlée par les systèmes de défense antioxydants.

Les antioxydants sont définis comme des substances capables de concurrencer des substrats oxydés à des concentrations relativement faibles, donc retardant ou empêchant ainsi l'oxydation de ces substrats (**Hamma, 2016**).

A l'heure actuelle, deux classes de systèmes de défense ont été mises en évidence. Le système endogène qui est constitué d'enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, complexe enzymatique de thiorédoxine) ou d'agents réducteurs non enzymatiques (glutathion, Coenzyme Q10.....) dont le travail consiste à convertir les ERO en molécules stables et non réactives (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Le taux cellulaire de ces enzymes est généralement contrôlé et leur activité est conditionnée entre autres par la disponibilité en oligoéléments tels que le cuivre, le manganèse, le zinc, le sélénium... (**Lecerf et al., 1994**).

L'organisme dispose d'une deuxième ligne de défense, ce sont des composés apportés par l'alimentation où leur rôle principal est de neutraliser les effets toxiques de l'ERO et ainsi protéger les cellules de tout dommage (**Koechlin-Ramonatxo, 2006**). Comme les antioxydants moléculaires liposolubles (vitamine E, vitamines A, caroténoïdes) ou hydrosolubles (vitamine C, acide urique) (Figure 8). Ils peuvent être classés selon leur localisation intracellulaire, transmembranaire et extracellulaire (**Lecerf et al., 1994**).

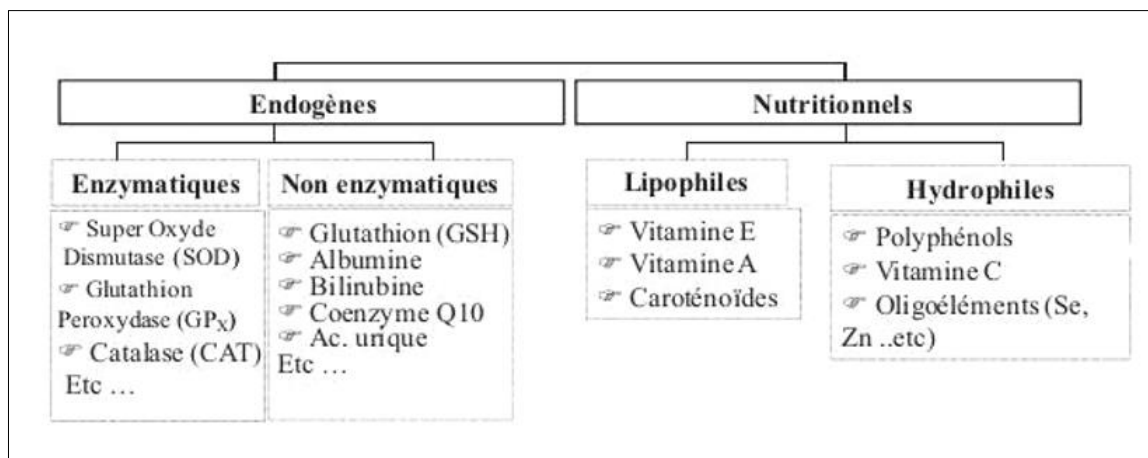


Figure 8: Classification des antioxydants (**Durand et al., 2013**).

4.1. Antioxydants enzymatiques

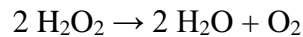
4.1.1. Superoxyde dismutases (SOD)

Les SOD représentent l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydatif. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la réaction de la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante (**Hamma, 2016**) :



4.1.2. Catalase

La catalase est une enzyme qui réduit le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et libère de l'oxygène et de l'eau (**Goudable and Favier, 1997**). Ils sont principalement localisés dans les peroxysomes (**Hamma, 2016**).



4.1.3. Glutathion peroxydases (GPxs)

Les GPx sont des sélénoprotéines qui réduisent l' H_2O_2 et des hydroperoxydes lipidiques en H_2O et en alcools lipidiques dans une réaction spécifique dépendante du substrat (GSH) (**Hamma, 2016**):



4.1.4. Système thiorédoxine (Trx)

Le principal antioxydant impliqué dans la décomposition des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène, ainsi que responsable du maintien des protéines à l'état réduit est la thiorédoxine qui sera régénérée par le NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TrxR) (**Haleng et al., 2007**).

4.2. Antioxydants non enzymatiques

4.2.1. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) synthétisé à partir du glutamate (α - glutamylcystéinyglycine) (Figure 9) (Hamma, 2016).

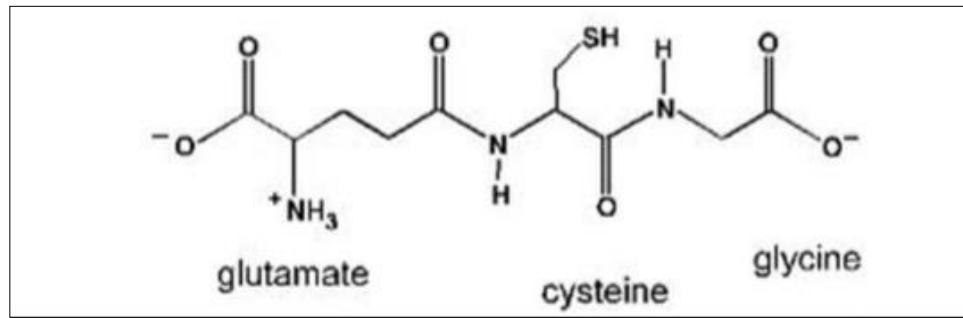


Figure 9: Structure du GSH (Hamma, 2016).

4.2.2. Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique), est un excellent piègeur de radicaux libres (Haleng et al., 2007), réagit facilement avec les ERO telles que l'hydroxyle ($\cdot\text{OH}$), l'alcoxyle ($\text{RO}\cdot$) et le peroxyde ($\text{ROO}\cdot$) (Lecerf et al., 1994).

4.2.3. Vitamine E

La vitamine E est le terme utilisé pour le tocophérol et tocotriénols dont la molécule de tocol (hydroxychromone) est la structure de base (Hamma, 2016), les deux structures sont similaires bien que le tocotriénol structure a des doubles liaisons sur la chaîne latérale (Haleng et al., 2007). L' α -tocophérol est l'antioxydant le plus important car il est liposoluble. Il empêche principalement la peroxydation des lipides (Hamma, 2016).

4.2.4. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des isoprénoïdes constitués principalement de huit unités d'isoprène, ces unités sont organisées en un squelette rigide par la présence de 3 à 15 doubles liaisons conjuguées. L' α et β -carotène (provitamine A) sont les plus abondants dans le plasma humain (Hamma, 2016).

4.2.5. Vitamines A

Le rétinol est la forme active de la vitamine A, cette dernière est un antioxydant efficace qui inhibe la propagation de la peroxydation lipidique en neutralisant les radicaux peroxyles (**Hamma, 2016**).

4.2.6. Coenzyme Q10

La coenzyme Q10, appelée ubiquinone est un dérivé benzoquinolique à longue chaîne latérale d'isoprène, ce qui lui confère un caractère lipophile (**Hamma, 2016**).

4.2.7. Acide urique

C'est le produit final du métabolisme des purines chez l'homme et il est soluble dans l'eau (**Hamma, 2016**) ayant une capacité de piéger plusieurs ERO particulièrement (OH^\bullet , ROO^\bullet , NOO^\bullet) (**Haleng et al., 2007**).

4.2.8. Bilirubine

La bilirubine est un produit final de la dégradation de l'hème. Il se lie également à l'albumine et empêche son entrée dans les tissus riches en graisses comme le cerveau. Il est également capable de piéger le ROO^\bullet et l'oxygène singulet (**Haleng et al., 2007**).

4.2.9. Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires abondants dans le règne végétal qui ont une structure aromatique qui portent un ou plusieurs groupes hydroxyle. En général, ce sont d'excellents pièges pour les ERO et de très bons chélateurs pour les métaux de transition tels que le fer et le cuivre (**Ghani, 2020; Haleng et al., 2007**).

4.2.9.1. Flavonoïdes

Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Essentiellement d'origine végétale (**Chira et al., 2008**). leurs structures comprennent un squelette constitué de deux cycles aromatiques (A et B) porteurs de plusieurs fonctions phénol et reliés par une chaîne de trois atomes de carbone, leur activités ont été attribuées à la neutralisation des radicaux hydroxyles , superoxydes et l'oxygène singlet (**Hamma, 2016**).

4.2.10. Oligoéléments

- **Sélénium**

Le sélénium n'est pas considéré comme un antioxydant car il n'a pas la capacité de piéger les radicaux libres, mais il est considéré comme un cofacteur pour de la GPx (**Haleng et al., 2007**).

- **Cuivre**

A concentration physiologique, le cuivre est un cofacteur pour des enzymes telles que la SOD, la cytochrome C oxydase et la dopamine bêta-hydroxylase, mais lorsque sa concentration est élevée, il devient pro-oxydant (**Haleng et al., 2007**).

- **Zinc**

Le zinc agit comme cofacteur pour de nombreuses enzymes est un cofacteur essentiel de la SOD et peut empêcher les réactions de formation d'ERO causées par les métaux de transition tels que le fer ou le cuivre (**Haleng et al., 2007**).

- **Manganèse**

Il est considéré comme essentiel pour l'activité SOD mitochondriale. Une carence en manganèse entraîne une diminution de l'activité de cette enzyme et une altération de la fonction mitochondrial (**Hamma, 2016**).

4.3. Supplémentation antioxydante

Il est de plus en plus évident que les extraits de certains produits animaux et végétaux terrestres ou marins utilisés tels quels ou après modification chimique (enzymes ou protéines antioxydantes) contiennent des principes actifs bioactifs qui aident à protéger contre les

maladies cardiovasculaires. Les effets bénéfiques de ces bioactifs semblent être médiés par de multiples voies biochimiques et mécanismes de signalisation qui agissent indépendamment ou en synergie (**Leifert and Abeywardena, 2008**).

Les dérivés végétaux sont abondamment utilisés principalement dans le domaine de la cosmétique complémentaire et anti-âge, qu'ils soient extraits en principe de végétaux, d'épices, de fruits ou de plantes médicinales. Ils appartiennent à de nombreuses familles chimiques, alcaloïdes, glucosides, dérivés indoliques, mais la famille des polyphénols donne le plus de molécules. Les plus couramment utilisés sont la quercétine, le resvératrol, extrait de peau de raisin rouge, et la curcumine, extrait de curcuma. Les chélateurs du fer ont été largement étudiés, mais certaines molécules sont parvenues à détrôner la ferrioxamine, un sidérophore naturel extrait de la bactérie *Nocardia*. Cependant, cette molécule doit être administrée par voie parentérale. Le dexrazoxane est un chélateur cationique bivalent du fer qui, en tant que prétraitement de la doxorubicine, anticancéreux cardiotoxique, réduit l'incidence et la gravité de la cardiotoxicité. Cependant, sa courte durée de vie, comparée à celle du médicament, réduit son efficacité (**Haleng J. et al., 2007**). On outre, les vitamines sont également considérées comme des suppléments. Ils récupèrent directement les ERO parmi eux la vitamine E et la vitamine C (**Pincemail et al., 2002**), et surtout la supplémentation alimentaire en vitamine B₁₂ ayant plusieurs avantages sur la santé humaine (**Fang et al., 2002**).

II. Propolis : Antioxydant naturel

1. Origine et composition de la propolis

1.1. Définition

Le mot « propolis » est issu de deux mots grecs anciens : «*pro*» signifiant avant ou en défense et «*polis*» signifiant ville, ce qui veut dire « devant la cité » ou « protège la cité » (**Kasiotis et al., 2017**).

La propolis est une matière naturelle d'origine mixte (**Popova et al., 2007**), elle désigne toute une série de substances résineuses gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies par les abeilles à partir de différentes parties de végétaux (essentiellement les bourgeons et les écorces de certains arbres) (**Mărghitaș et al., 2013**). Elle est utilisée dans la ruche par les abeilles pour boucher les trous, pour éviter les courants d'air indésirables, pour lisser les parois intérieures, pour imperméabiliser les parois afin d'éviter une humidité excessive et pour protéger l'entrée contre les intrus (**Santos et al., 2020**).

1.2. Origine

Des études scientifiques prouvent que les composants de la propolis proviennent de deux sources distinctes (**Mărghitaș et al., 2013**) :

- **Origine végétale** : à partir des sécrétions végétales recueillies par les abeilles, sève des pousses de peuplier, pin, bouleau, châtaignier et érable, et substances lipophiles sécrétées par les plaies, résines ou gommes de plantes. En plus, des matériaux aléatoires sont introduits dans la production de propolis (pollen, nectar ou miel) (**Mărghitaș et al., 2013**).
- **Origine animale** : substances sécrétées par les abeilles (cire, salive) (**Mărghitaș et al., 2013**).

1.3. Composition

La composition de la propolis est variable selon la source visitée par l'abeille (**Mărghitaș et al., 2013**), car dans différents écosystèmes, différents exsudats et sécrétions de plantes pourraient servir de source de propolis (**Popova et al., 2007**), et pour identifier actuellement les

composants différents on utilise les méthodes d'analyses modernes : la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase gazeuse (GC), ainsi que des techniques d'identification, telles que la spectroscopie de masse (MS), la magnéto-scopie nucléaire résonance (RMN), chromatographie en phase gazeuse et spectroscopie de masse (GC-MS) (Huang et al., 2014).

La propolis est constituée de 50 à 55 % de résines et baumes, de 30 % de cires et acides gras, de 10 % d'huiles essentielles, de 5 % de pollen et de 5 % de substances organiques et minérales (Cardinault et al. 2012).

Tableau 1: Compositions chimiques de l'extrait brut de propolis (Cardinault et al. 2012).

<i>Composition en ordre</i>	<i>Composition par groupes</i>
<i>Résines et baumes</i>	<i>Flavonoïdes, acides phénoliques, esters</i>
<i>Cire et acides gras</i>	<i>La cire d'abeille et des plantes</i>
<i>Huiles essentielles volatiles</i>	<i>Anéthol et eugénol</i>
<i>pollen</i>	<i>Protéines, arginine et proline</i>
<i>Autres</i>	<i>Cétones, lactones, quinones, stéroïdes, acide benzoïques, vitamine A/B, sucre, 14 traces de minéraux, silice et zinc sont plus connus</i>

Parmi ces dernières, on retrouvera beaucoup de flavonoïdes et autres dérivés phénoliques ainsi que leurs esters, des dérivés aromatiques 299 volatils, des minéraux (fer, calcium, zinc, cuivre, manganèse) et des vitamines (C, E et du groupe B) (Cardinault et al. 2012).

Tableau 2: Composition chimique des propolis pure (Velikova et al. 2000).

<i>Composition des propolis pure</i>	
<i>Flavonoïdes</i>	<i>Chrysin, galangine, sakuranetine, 3-méthylgalangine</i>
<i>Acides aliphatiques</i>	<i>Hexadécanoïque, acide oléique, acide octadécanoïque</i>
<i>Esters</i>	<i>Benzoate de benzyle, cinnamate de benzyle, férulate d'isopent-3-ényle</i>
<i>Acides aromatiques</i>	<i>acide benzoïque, acide p-hydroxybenzoïque; Acide caféique, acide 3,4-diméthoxycinnamique</i>
<i>Alcools, terpènes, quinone</i>	<i>Cardinol, Bisabolol, Vinyl phénol, Chrysophanol.</i>
<i>Autres</i>	<i>Glycérol, Vanilline, Acide mallique</i>

2. Caractéristiques de la propolis

Chaque composé de la propolis ayant des activités biologiques qui lui sont propres, les propriétés physico-chimiques de chaque type de propolis seront donc conditionnées par sa composition (Marieke et al.,2005).

Tableau 3: Caractéristique physico-chimique de la propolis (Marieke Mutsaers, et al., 2005).

<i>Caractéristiques physiques</i>		<i>Caractéristiques chimique</i>	
Consistance	<ul style="list-style-type: none"> • 15 °C, elle est dure et friable. • 30 °C elle est molle et malléable. • 30 et 60 °C elle est coulante et gluante. 	Solubilité	<p>Les alcools et acétone, éther, chloroforme propylène glycol, diméthylsulfoxyde, éthylène-dilamine.</p> <p>La température influence la solubilité du fait de la teneur en cire de la propolis.</p>
Couleur	varie du jaune au noir en passant par l'orangé, le mauve et le brun en fonction de l'origine des résines.	Point de fusion	Son point de fusion se situe autour de 70°C.
Goût et Odeur	<p>-un goût amer a presque sucré avec une sensation brûlante et pimentée.</p> <p>-Arome agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits.</p> <p>Lorsqu'on la brûle, elle dégage une odeur très délicate et très recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient.</p>	Densité	La densité de la propolis est de 1.2 en moyenne (soit supérieure à celle de l'eau).

3. Propriétés biologiques de la propolis

Ces dernières années , les chercheurs ont étudié de manière approfondie les propriétés biologiques de la propolis telles que les activités anti-tumoraux, antimicrobiens, anti-inflammatoires, antioxydants, immun-modulateurs et autres (Sforcin, 2016), Pour cette raison, la propolis est largement utilisée dans les aliments et les boissons afin d'améliorer la santé et prévenir des maladies telles que les maladies cardiaques, le diabète et le cancer (Kumazawa et al., 2004).

3.1. Activité antioxydante et antitumorale

De nombreux chercheurs ont confirmé que la propolis a une activité antioxydante (**Kumazawa et al., 2004**) due de nombreux composés antioxydants : vitamines E , C et polyphénols. L'EPAC (ester phénéthylque de l'acide caféique) est le composé au meilleur pouvoir antioxydant dans la propolis (**Cardinault et al., 2012**). En plus, la propolis possède une activité antitumorale (**Cardinault et al., 2012**). Ces mécanismes d'action repose sur l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition des métalloprotéinases matricielles et la prévention des métastases et de l'invasion (**Sforcin, 2016**).

3.2. Activité anti-inflammatoire et immun-modulatrice

Le processus inflammatoire se produit à la suite de la libération de médiateurs chimiques (histamine, cytokines) par les tissus endommagés (**Araujo et al., 2012**). L'effet anti-inflammatoire de la propolis se fait par plusieurs mécanismes : en inhibant l'activation de certaines molécules du système immunitaire (IL-6) et en inhibant certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation (cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, myéloperoxydase, NADPH-oxydase, ornithine décarboxylase) (**Cardinault et al., 2012**).

D'autre part, les extraits de propolis ont également la capacité d'agir dans une réponse immunitaire non spécifique en activant les macrophages et en augmentant également la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-8), en renforçant la coopération entre CD4 et CD8 (**Cardinault et al., 2012**). Concernant la réponse immunitaire humorale, les chercheurs ont confirmé que la propolis et ses composants augmentaient la production d'anticorps par les plasmocytes (**Sforcin, 2016**).

3.3. Activité antimicrobienne

Il existe de nombreuses activités antimicrobiennes, dont les suivantes : l'activité antibactérienne de la propolis qui est associée à deux niveaux , le premier est lié à l'action directe sur le microorganisme telle que son effet sur la perméabilité de la membrane cellulaire du microorganisme, la perturbation du potentiel membranaire et la production d'adénosine triphosphate (ATP) ainsi qu'une diminution de la mobilité bactérienne et l'autre à la stimulation du système immunitaire (**Przybyłek and Karpiński, 2019**).

D'autre part, l'activité antibactérienne de la propolis est plus élevée pour les bactéries gram-positives que pour les bactéries gram-négatives (**Sforcin, 2016**). Aussi la propolis a une activité fongicide contre les germes appartenant au genre *Candida*, et a également un effet contre les champignons tels que *Aspergillus* et *Mycrosporium*, ainsi que contre les levures (**Cardinault et al., 2012**).

3.4. Activité antivirale

La propolis a un effet antiviral en empêchant partiellement l'entrée du virus dans les cellules, ce qui affecte les étapes de réplication du cycle viral dans les cellules et conduit à la dégradation de l'ARN avant que le virus entre dans les cellules (**Sforcin, 2016**).

4. Propolis et cardioprotection

Les PCV représentent la cause principale de décès à l'échelle mondiale (**Silva et al., 2021**). Ces maladies sont associées à un trouble de la fonction cardiaque et de la circulation sanguine (**Chavda et al., 2023; Silva et al., 2021**). Étant donné que les maladies cardiovasculaires sont souvent liées à des facteurs de risque tels que le stress oxydatif et l'obésité, la prise de propolis contenant des composants bioactifs pourrait aider à réduire les risques associés à ces maladies (**Zulkiflee et al., 2022**). Les effets de cette substance bioactive sur le système cardiovasculaire résultent de l'association de diverses fonctions biologiques : antioxydante, anti-inflammatoire, immunomodulatrice, antihypertensive, anti-athérosclérotique et antiangiogénique, qui sont souvent interdépendantes les unes des autres (**Silva et al., 2021**).

Dans cette optique, la propolis dispose de multiples caractéristiques de protection cardiovasculaire grâce à ses principes actifs, en particulier ses composés phénoliques, tels que la chrysin, la quercétine, la pinocembrine et la lutéoline. Ces composés phénoliques de la propolis diminuent l'activité des cyclooxygénases, des ERO et de l'oxyde nitrique (NO), qui sont également liés aux propriétés antioxydantes de la propolis (**Zulkiflee et al., 2022**), ces polyphénols ont une incidence sur la production des NO au niveau de l'endothélium vasculaire, ce qui provoque une dilatation des vaisseaux sanguins ainsi que l'activation de gènes favorisant la protection du système cardiovasculaire (**Braakhuis, 2019**). En outre, un autre composé essentiel de la propolis, l'ester phénylique de l'acide caféique (EPAC), possède des propriétés antioxydantes et procure des effets protecteurs contre les lésions ischémie-

reperfusion dans divers tissus, notamment le cerveau, le côlon, le cœur et le foie. D'après **(Ahmed et al., 2017)** la propolis malaisienne démontre une activité cardioprotectrice et des propriétés antioxydantes contre le stress oxydatif induit par l'isoprotérénol en capturant les radicaux cytotoxiques. De plus, les flavonoïdes de la propolis ont également la capacité de stopper la progression de l'hypertrophie cardiaque pathologique et des maladies cardiaques **(Zulkiflee et al., 2022)**.

Chapitre II

Isoprotérénol et cardiotoxicité

I. Infarctus du myocarde

1. Définition de l'infarctus de myocarde

L'IM (du latin : *Infarctus myocardii*) fait référence à un événement d'une crise cardiaque (Lu et al., 2015). Sur le plan pathologique, l'IM est défini comme la mort des cardiomyocytes due à une ischémie (Frangogiannis, 2015), et survient lorsque le sang cesse de circuler correctement dans une partie du cœur et que le myocarde est lésé en raison d'un manque d'apport d'oxygène (Lu et al., 2015), c'est-à-dire d'un déséquilibre entre le besoin en oxygène et l'apport réel (Patel et al., 2012). Lorsqu'une des artères coronaires qui alimentent le cœur en sang se rétrécit et s'obstrue avec des plaques, du cholestérol et des dépôts de graisse, cela entraîne la formation de caillots sanguins qui entravent le flux sanguin vers le cœur. Cette affection est appelée athérosclérose, qui est caractérisée par le durcissement des parois des artères. Si l'épisode est grave, il est qualifié d'infarctus aigu du myocarde (IAM) (Lu et al., 2015).

2. Physiopathologie de l'infarctus du myocarde

Le myocarde est anatomiquement irrigué par deux artères coronaires principales, la coronaire droite et la coronaire gauche. Chacune d'entre elles se termine par de petites ramifications qui alimentent le muscle cardiaque du côté épocardique. Les deux principales branches terminales de la coronaire gauche sont l'artère circonflexe gauche et l'artère interventriculaire antérieure descendante antérieure gauche (Figure 10). Bien qu'il y ait une anastomose entre les petites ramifications terminales des artères coronaires, cette anastomose est insuffisante si l'une d'elles est obstruée. L'occlusion ou la sténose de l'une de ces artères entraîne une diminution du flux sanguin coronaire et par conséquent le développement d'un infarctus du myocarde (figure 11) (Awad Hegazy, 2022).

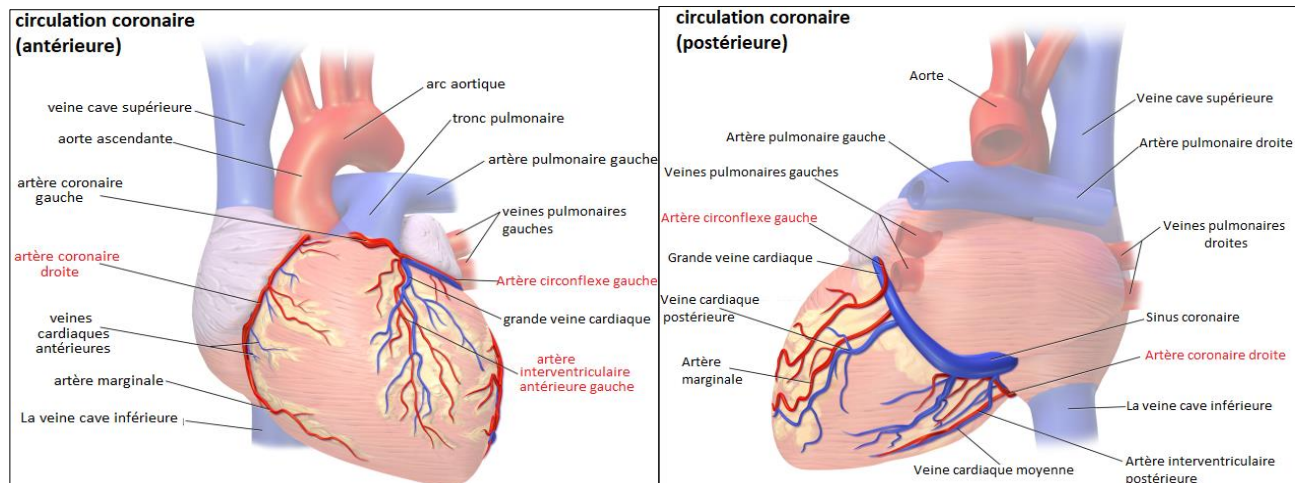


Figure 10: Vues antérieure et postérieure de la circulation coronarienne dans un myocarde sain (Velasco, 2019).

La physiopathologie de l'IM est compliquée et requiert la réunion de multiples procédés, à savoir le stress oxydatif, l'excès de calcium, les lésions au niveau du myocarde et des cellules endothéliales, le dysfonctionnement contractile et la mort cellulaire, soit par apoptose, soit par nécrose, soit par les deux (Neto et al., 2022).

La séquence des événements physiopathologiques de l'IM est très compliquée et peut être récapitulée de la manière suivante :

• Dysfonctionnement endothélial

Une altération de la fonction endothéliale entraîne la rétention des lipoprotéines de faible densité (LDL) dans la couche sous-endothéliale où elles subissent une oxydation ainsi qu'une agrégation en combinaison avec d'autres facteurs athérogènes en provoquant le recrutement de monocytes dans les plaques athérosclérotiques en développement, où ils se transforment en macrophages (Jebari-Benslaiman et al., 2022; Vogel et al., 2019).

• Plaque et formation du noyau nécrotique

L'endothélium devient alors perméable, les macrophages au sein de la plaque subissent une transformation en cellules spumeuses remplies de lipides. En fin de compte les macrophages subissent des mécanismes de mort cellulaire, d'apoptose et de nécrose et avec la migration des

fibres musculaires des noyaux nécrotiques seront formés (**Kowara and Cudnoch-Jedrzejewska, 2021**) (**Awad Hegazy, 2022**).

• Angiogenèse en plaques et hémorragie intermédiaire

De nouveaux vaisseaux se forment à partir du *vasa vasorum* situé dans l'adventice vasculaire, ce qui offre une voie supplémentaire aux monocytes et aux cellules immunitaires pour atteindre la base de la plaque athéromateuse. Ces vaisseaux sont délicats, ce qui peut entraîner des hémorragies et des fuites d'extravasation de protéines plasmatiques et des globules rouges. Ce saignement cause une dilatation de la plaque et favorise l'apparition d'une inflammation accrue. (**Awad Hegazy, 2022**).

• Rupture de la coiffe fibreuse et thrombose

La rupture de la plaque survient à travers la fine coiffe fibreuse entraînant ainsi l'exposition du sang au noyau nécrotique qui contient une grande quantité d'érythrocytes et de matériaux hautement thrombogènes, ce qui conduit à la formation de caillots. Ce mécanisme est la principale cause de thrombose, qui peut être associée à des syndromes coronariens aigus et à un IM (**Awad Hegazy, 2022**).

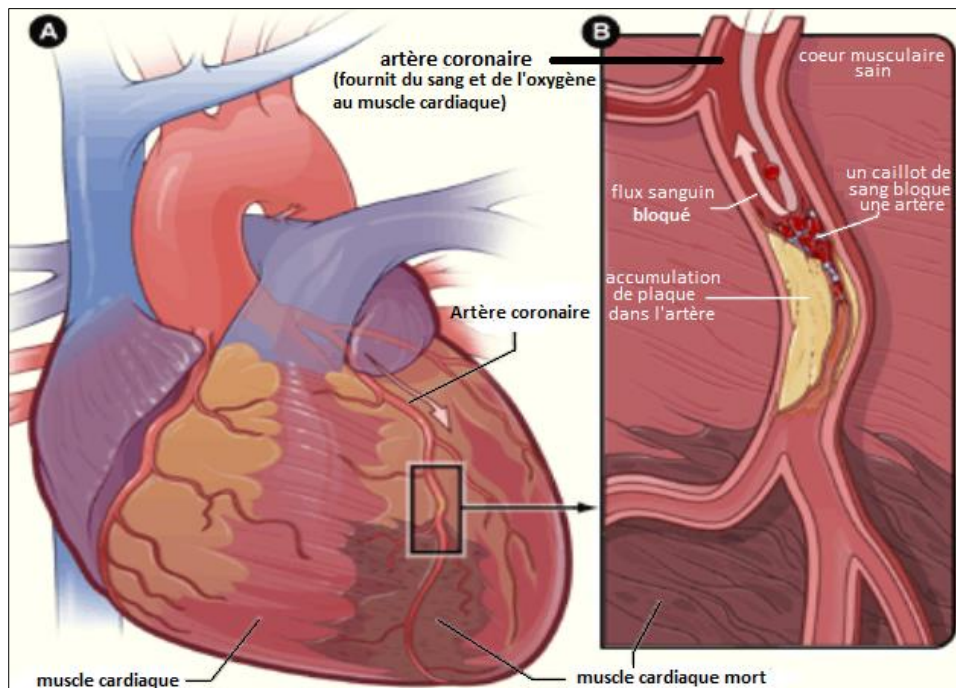


Figure 11: Physiopathologie de l'IM (**Kumar Singh and Kumar Jat, 2022**).

3. Evaluation des lésions induites lors de l'infarctus du myocarde

3.1. Paramètres hémodynamiques

L'hémodynamique est l'étude de la dynamique du système circulatoire (**Itatani, 2015**), c'est-à-dire étude de l'écoulement du sang dans les vaisseaux (**Itatani et al., 2017**). Les paramètres hémodynamiques indiquent la récupération fonctionnelle du cœur après l'IM. Ces paramètres de performance cardiaque ont été déterminés en examinant les fonctions systolique et diastolique. Il s'agit de fréquence cardiaque, débit aortique, pression systolique ventriculaire gauche, pression de perfusion aortique, pression diastolique d'extrémité ventriculaire gauche (LVEDP), la pression développée ventriculaire gauche (LVDP)...etc.) (**Lebeau et al., 2001**).

3.2. Marqueurs biologiques dans le sang

L'atteinte des cellules du muscle cardiaque peut être détectée par un test sanguin de biomarqueurs sensibles. Parmi les marqueurs cités, on peut distinguer, ceux qui n'ont pas de spécificité d'organe et se trouvent dans le muscle strié (myoglobine, CK totales, ASAT) et ceux dont la concentration est différente dans le cœur et dans les muscles squelettiques (troponine) (**Mythili and Malathi, 2015**).

3.2.1. Marqueurs non enzymatiques

• Complexe des troponines

C'est un ensemble de structures impliquées dans la régulation de la contractilité squelettique et cardiaque, la troponine C, la troponine T et la troponine I situées sur les filaments fins du muscle strié (**Mythili and Malathi, 2015**).

L'élévation de ces biomarqueurs dans le sang reflète une modification conduisant à la nécrose des cellules myocardiques. Ainsi, une augmentation de la troponine peut être observée lors d'autres infarctus tels qu'arythmie sévère, insuffisance respiratoire aiguë (**Tiwari et al., 2012**), embolie pulmonaire, anémie sévère, hypertension artérielle sévère avec ou sans hypertrophie ventriculaire gauche, atteinte myocardique non ischémique (myocardite, commotion cérébrale).

Atteinte myocardique multifactorielle (décompensation cardiaque, embolie) ...etc (**Gast et al., 2015**).

• **Myoglobine**

La myoglobine est une protéine de faible poids moléculaire liant le fer et l'oxygène abondamment exprimée dans le myocarde et le muscle squelettique (**Flonta et al., 2009**). La myoglobine est rapidement libérée par le myocarde lésé. Ses taux sanguins commencent à augmenter dans les 30 premières minutes à 2 heures après le début de l'ischémie, ce qui fait de la myoglobine un marqueur important pour la détection précoce/exclusion des lésions cardiaques. La myoglobine ne se trouve dans aucun autre tissu que le muscle, ce qui en fait un marqueur sensible de l'IM, avec une valeur prédictive négative élevée, et constitue donc un test utile pour exclure rapidement aux urgences. Cependant, comme l'expression de la myoglobine n'est pas limitée au myocarde, sa spécificité et sa valeur prédictive positive sont plutôt faibles (**Tilea et al., 2021**).

3.2.2. Marqueurs enzymatiques non spécifiques

• **L-aspartate-aminotransférase (ASAT)**

L'aspartate aminotransférase est une enzyme intracellulaire soluble courante nécessaire au métabolisme des acides aminés. La plus grande quantité d'ASAT est exprimée dans le foie, le myocarde, les reins et les muscles squelettiques (**Li et al., 2021**). En 1954, Ladue et al. ont démontré une augmentation significative de l'ASAT 3 à 4 h après l'IM, marquant le début de l'ère du diagnostic enzymatique de l'IM. Les taux sanguins d'ASAT augmentent dans les 12 à 24 premières heures après l'IM, culminent 1 à 2 jours après l'événement aigu et reviennent à la ligne de base dans les 10 à 14 jours suivant l'IAM (**Tilea et al., 2021**).

• **Lactate déshydrogénase (LDH)**

Un an seulement après l'avènement de l'ASAT en tant que biomarqueur de l'IM, la LDH, une enzyme qui convertit de manière réversible le lactate en pyruvate, il est apparu comme un nouvel indicateur prometteur de l'IM. Les taux sanguins de LDH augmentent généralement dans les 6 à 12 heures suivant l'apparition de l'IM, culminent dans les 1 à 3 jours et reviennent à la

ligne de base dans les 8 à 14 jours. Comme l'ASAT, la LDH est également exprimée dans une variété de tissus, y compris le foie, les reins, le cœur, les globules rouges, les poumons et surtout les muscles squelettiques, constituant la LDH, un marqueur moins spécifique des lésions cardiaques (Tilea et al., 2021).

• Créatine Kinase (CK)

La créatine kinase est une enzyme abondamment exprimée dans les cellules du myocarde, où elle catalyse le transfert réversible du phosphate à haute énergie de l'ATP à la créatine, produisant du phosphate de créatine (Aydin et al., 2019). La CK est devenue un paramètre de laboratoire crucial pour l'identification des lésions myocardiques et de l'IM. L'enzyme est cependant présente dans une grande variété d'autres tissus, ce qui affecte fortement sa spécificité en tant que biomarqueur des lésions myocardiques. Ce problème a été en partie surmonté par l'utilisation de l'isoforme CK-bande myocardique (CK-MB) (Tilea et al., 2021).

3.3. Mesure de la taille de l'infarctus

La coloration au 2,3,5-triphényltétrazolium chloride (TTC) est une méthode utilisée pour déterminer la taille expérimentale de l'IM (Dos Santos et al., 2008). Le mécanisme par lequel le TTC interagit avec les cardiomyocytes est à la base de cette méthode. Fondamentalement, le triphényltétrazolium colore le myocarde en rouge grâce à une activité déshydrogénase complète, tandis que le myocarde infarci, qui n'a pas d'activité déshydrogénase, ne se colore pas (Khalil et al., 2006).

3.4. Marqueurs de souffrance cellulaire cardiaques

3.4.1. Paramètres du stress oxydant

Les biomarqueurs du stress oxydatif peuvent être classés comme des molécules modifiées par des interactions avec les ERO dans le microenvironnement, et des molécules ayant une fonction antioxydante qui changent en réponse à une augmentation du stress redox. Les indicateurs de stress oxydatif les plus couramment utilisés sont les MDA, SOD, CAT... (Tableau 4). L'évaluation de ces biomarqueurs est relativement peu coûteuse et simple, mais aucun intervalle de référence n'a été défini, ce qui ne permet pas de mesurer la prévalence du stress

oxydatif chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque. De plus, les preuves de la pertinence pronostique de ces biomarqueurs sont actuellement extrêmement limitées (**Ho et al., 2013**).

Tableau 4: Paramètres des stress oxydant (*Aimo et al., 2020; Blankenberg et al., 2003; Ho et al., 2013; Trpkovic et al., 2015*).

Biomarqueurs	
MDA	<i>Le MDA est généré in vivo par peroxydation d'acides gras polyinsaturés. Le MDA interagit avec les protéines et est lui-même potentiellement athérogène.</i>
Nitrotyrosine	<i>La nitrification de la protéine tyrosine est médiée par des ERO telles que le peroxydant (ONOO⁻) et le dioxyde d'azote (NO₂), et entraîne l'ajout d'un groupe nitro aux résidus de tyrosine sensibles.</i>
Produits protéiques d'oxydation avancée (AOPP)	<i>Les AOPP sont un groupe de protéines oxydées produites par oxydation. L'AOPP est un marqueur du stress oxydatif et de l'inflammation. Ils représentent un biomarqueur plus stable que les produits de l'oxydation des lipides.</i>
Rapport glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG)	<i>Un excellent marqueur du stress oxydatif et de son importance. En effet, GSH réagit très rapidement pour former GSSG ; Plus la valeur de ce rapport est faible, plus le stress d'oxydation est élevé.</i>
MPO	<i>La MPO agit comme une enzyme clé dans la génération d'une large gamme de ROS en catalysant la conversion du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en espèces comprenant : [•]OH, ONOO⁻, acide hypochloreux (HOCl) et NO₂. Les ROS dérivés du MPO peuvent alors modifier les lipides, les lipoprotéines et les protéines</i>
OxLDL	<i>L'oxydation des LDL peut se produire sans enzymes ou peut être catalysée par des enzymes telles que la 12/15-lipoxygénase. La formation d'oxLDL se produit principalement dans la paroi vasculaire, où elle est absorbée par les macrophages via la voie des récepteurs piègeurs pour former des cellules spumeuses.</i>

Capacité antioxydante sérique	<i>L'activité de la glutathion peroxydase est l'un des meilleurs prédicteurs uni-variés du risque d'événements cardiovasculaires. Le risque d'événements cardiovasculaires était inversement associé à une augmentation du quartile de l'activité de la glutathion peroxydase.</i>
Superoxyde dismutase (SOD)	<i>Enzymes antioxydantes essentielles qui éliminent les ERO comme la catalase et la peroxydase.</i>
IsoP	<i>IsoP est une famille de composés stables de type prostaglandine produits par la peroxydation de l'acide arachidonique, un acide gras polyinsaturé présent dans les phospholipides des membranes cellulaires.</i>

3.4.2. Nécrose et apoptose

La mort cellulaire des myocytes apoptotiques précède la nécrose cellulaire est un déterminant majeur de la taille de l'infarctus. La mort apoptotique et la nécrose sont un facteur contributif indépendant de la taille de l'infarctus, mais l'apoptose représente 86 % de la perte totale de cellules myocardiques et la nécrose ne représente que 14 % (**Zhu et al., 2021**).

3.4.2.1. Apoptose

C'est un processus régulé par l'activation de la caspase. Il existe deux mécanismes distincts sous-jacents à l'apoptose des cardiomyocytes initiée par les mitochondries. Premièrement, l'hyperosmolarité de la membrane externe mitochondriale, induite par la réduction de l'ATP ou le stress oxydatif, favorise les facteurs d'apoptose dans l'espace intermembranaire mitochondrial tels que le cytochrome c (cyt c), le facteur d'activation mitochondrial (AIF), un second activateur de la caspase dérivé de la mitochondrie (Smac) /protéine de liaison IAP directe à faible pI (DIABLO) ou Omi/protéine A2 à haute température (HtrA2) (**Jeong and Seol, 2008**). L'apoptose des myocytes joue un rôle important dans l'infarctus du myocarde, il convient de souligner que les cardiomyocytes apoptotiques du myocarde infarci subissent alors des modifications nécrotiques compatibles avec l'apparition du marqueur myosine. Ceci est une conséquence de la perturbation prolongée du flux sanguin coronaire vers la zone ischémique de la paroi vasculaire entraînant des modifications secondaires à la nécrose et à la cicatrisation (**Zhu et al., 2021**).

3.4.2.2. Nécrose

Contrairement à l'apoptose, la nécrose n'est pas régulée par des protéines ou des enzymes. Le signal déclencheur initial de la nécrose est la rupture des biofilms, tels que les membranes cellulaires ou les mitochondries. Il est admis que la rupture de la membrane cellulaire est le résultat d'une diminution de la pression osmotique intracellulaire, favorisant l'entrée d'eau dans le cytoplasme (**Xu et al., 2018**).

3.4.3. Evaluation de l'intégrité tissulaire

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. Les cellules apoptotiques sont détectées par marquage immunohistochimique en utilisant l'essai TUNEL (*terminal transferase-mediated d'UTP nick end-labeling*) dans lequel des résidus de d'UTP marqués à la digoxigénine sont incorporés catalytiquement aux extrémités 3-OH des doubles ou simple brin d'ADN (**Bak et al., 2006**).

4. Modèles expérimentaux de l'étude de l'infarctus du myocarde

L'utilisation des modèles expérimentaux a offert de nouvelles approches visant à améliorer le diagnostic et le traitement de ces pathologies. Une vaste gamme de ces modèles allant de l'homme à une seule molécule et au-delà ont été élaborés pour imiter les conditions cliniques liées aux pathologies cardiovasculaires (**Halim et al., 2018; Hearse and Sutherland, 2000; Zaragoza et al., 2011**).

4.1. Modèles *in vivo*

Les modèles expérimentaux *in vivo* s'avèrent plus appropriés pour appréhender l'impact global des médicaments sur un organisme vivant (**Kumar et al., 2016**). La régulation de la fonction cardiaque *in vivo* est assurée par diverses entrées, telles que le système nerveux autonome, les hormones produites et le système immunitaire. Divers modèles animaux, de petite et grande taille, sont fréquemment employés pour étudier les maladies cardiaques (**Oh et al., 2019**).

4.1.1. Modèles de ligature chirurgicale

La ligature de l'artère coronaire descendante antérieure gauche (*Left Anterior descending coronary artery* LAD) est la méthode chirurgicale la plus fréquemment employée pour l'infarctus aigu du myocarde (**Kumar et al., 2016**). La cible habituelle est l'artère interventriculaire antérieure gauche qui représente une suture très fine qui est placée autour de l'artère coronaire. La ligature de l'artère coronaire est effectuée afin de provoquer un infarctus transmural (**Oh et al., 2019**). Les animaux de laboratoire fréquemment utilisés pour cette technique chirurgicale sont les souris et les rats car ils présentent plusieurs avantages par rapport aux animaux de plus grande taille (**Kumar et al., 2016**).

4.1.2. Méthodes chimiques

L'induction de l'IM par l'isoproterenol est un modèle qui propose divers avantages comparés à la méthode chirurgicale, parmi ces avantages la simplicité, le faible taux de mortalité, une technique non invasive, donc aucun risque d'infections post-chirurgicales. Une injection unique d'isoprotérénol sous-cutanée avec une dose de 85 à 150 mg/kg de poids corporel pendant deux jours consécutifs a montré un schéma pareil de changements métaboliques, biochimiques et morphologiques chez l'être humain. En général, les rats sont souvent privilégiés dans ce modèle, mais plusieurs autres espèces telles que les rats et les lapins l'utilisent également (**Kumar et al., 2016**).

4.2. Autres modèles

Plusieurs autres modèles ont été établis entre autres ; les modèles *in vitro* dont de multiples modèles de cardiomyocytes ont été élaborés, ce modèle offre un contrôle plus précis des conditions expérimentales et des manipulations (**Oh et al., 2019**), les modèles *ex vivo* sont fiables, simples pour appréhender le mécanisme moléculaire, l'électrophysiologie, l'activité mécanique et les sites cibles des agents pharmacologiques innovants, ils sont exempts d'obstacles biologiques tels que le genre, l'âge et les variables pharmacocinétiques (**Kumar et al., 2016**). Chacun de ces modèles imite les différents phénotypes de maladies cardiaques que l'on retrouve chez les patients.

II. Isoproté réno l

1. Structure et composition chimique

Le chlorhydrate d'alcool 3,4-dihydroxy- α -[(isopropylamino) méthyl] benzylique, également appelé Isoproté réno l, est une catécholamine synthétique agoniste β -adrénergique sympathomimétique non sélectif dont la formule moléculaire est $C_{11}H_{17}NO_3HCl$. Il est principalement prescrit pour traiter la bradycardie (Allawadhi et al., 2018 ; Patel et al., 2012).

2. Propriété physicochimique de l'isoproté réno l

L'isoproté réno l, d'une masse moléculaire de 211,24 g/mol, est une poudre blanche, inodore, ayant un goût légèrement amer. Sa couleur s'assombrit progressivement lorsqu'elle est exposée à l'air et à la lumière. Les solutions aqueuses virent au brun rose lorsqu'elles sont exposées à l'air et le contact avec les métaux doit être évité car elles provoquent une décoloration et une perte d'activité. le pH d'une solution aqueuse à 1% d'environ 5, son point de fusion compris entre 165°C et 170°C et sa teneur en humidité ne dépassant pas 1%, l'isoproté réno l est insoluble dans l'éther et dans le chloroforme mais soluble à 20° en moins de 1 partie eau et 55 partie d'alcool (Tariq and Al-Badr, 1985).

3. Pharmacocinétique de l'isoproté réno l

3.1. Absorption

L'isoproté réno l est plus facilement absorbé lorsqu'il est administré par voie parentérale ou sous forme d'aérosol. L'absorption sublinguale ou les doses orales ne sont pas fiables, Le médicament est mal absorbé par l'estomac, mais bien absorbé par l'intestin grêle, le côlon proximal, le rectum et les muqueuses trachéales (Tariq and Al-Badr, 1985).

3.2. Distribution

Après 20 minutes de prise d'isoproté réno l par voie orale, son effet commence à apparaître et cet effet durera environ 60 minutes. En revanche, l'inhalation de 5 mg d'isoproté réno l conduit à une concentration plasmatique d'environ 0,03 ng/ml en 5 minutes. La recherche a également confirmé que l'isoproté réno l disparaît de la circulation en quelques minutes. La demi-vie plasmatique après administration intraveineuse rapide est de 3 à 5 minutes (Tariq and Al-Badr,

1985).

3.3.Métabolisme

Après administration orale ou inhalée d'isoproté réno l, la majeure partie du médicament est conjugué par O-méthylation et Sulfates conjugués, mais lorsqu'il est administré par voie intraveineuse, il est métabolisé principalement en forme O-méthyle. En outre, une quantité importante d'isoproté réno l administré par voie orale est métabolisée par conjugaison à travers l'intestin pariétal avant l'absorption (**Tariq and Al-Badr, 1985**).

3.4.Elimination

L'excrétion de l'isoproté réno l dépend fortement de la voie d'administration, environ 90 % de l'isoproté réno l administré par voie intraveineuse étant excrété dans l'urine dans les 24 heures, principalement sous forme de 3-O-méthyl, et environ 15 % de celui-ci étant excrété sous forme inchangée. D'autre part, après inhalation ou administration orale d'isoproté réno l, 80 à 95 % de celui-ci est excrété dans l'urine sous forme de sulfate conjugué, 1 à 2 % sous forme de médicament inchangé et 1 à 2 % sous forme de métabolite méthylique libre. De petites quantités sont excrétées dans la bile sous forme de métabolite méthylé (**Tariq and Al-Badr, 1985**).

4. Mécanisme d'induction de l'IM par l'isoproté réno l

Autrefois, l'induction expérimentale de lésions myocardiques était effectuée par des interventions chirurgicales comme la ligature de l'aorte, l'administration d'agonistes β -adrénergiques à l'aide de mini-pompes osmotiques implantées et la clôture de l'artère coronaire. Toutefois, ces méthodes entraînaient une forte incidence de morbidité et de mortalité, non seulement en raison des interventions elles-mêmes, mais également des risques d'infection et de complications tels que le pneumothorax. L'emploi de l'isoproté réno l chez les animaux a offert une technique rapide, aisée et non invasive, engendrant des dommages cardiaques semblables à ceux constatés dans l'infarctus du myocarde aigu chez l'être humain (**Wong et al., 2017**).

Cela est effectué grâce à l'aptitude de l'isoproté réno l à générer des ERO, qui induisent un stress oxydatif occasionnant des détériorations progressives des mitochondries et des

perturbations des paramètres biochimiques du cœur et des altérations histologiques significatives conduisant à des lésions cardiaques (**Allawadhi et al., 2018; Wong et al., 2017**).

L'administration d'isoprotérénol provoque également un déséquilibre ionique. Lorsque l'enzyme adénylate cyclase (AC) est activée et les niveaux de l'ATP sont épuisés, il y aura un excès des ions Ca^{2+} . La surabondance de ces ions a un impact négatif sur potentiel membranaire mitochondrial. Cela va entraîner la production des ERO, qui vont activer l'endonucléase dépendante du calcium et du magnésium. En conséquence, l'ADN endommagé par fragmentation, entraîne finalement des lésions ischémiques et l'apoptose cellulaire. En outre, le taux de la malonaldéhyde (MDA) est augmenté de manière significative tandis que les taux d'antioxydants, tels que la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), le glutathion (GSH) et la glutathion peroxydase (GPx), sont considérablement diminués (**Wong et al., 2017**).

Par conséquent, ce médicament est adopté pour l'étude de l'effet des composés phytochimiques, des extraits des plantes ainsi que des dérivés/analogues de plantes...etc sur la cardiotoxicité (**Neto et al., 2022**). La figure 12 présente une vue sur l'aspect moléculaire de la cardiotoxicité provoquée par l'isoprotérénol.

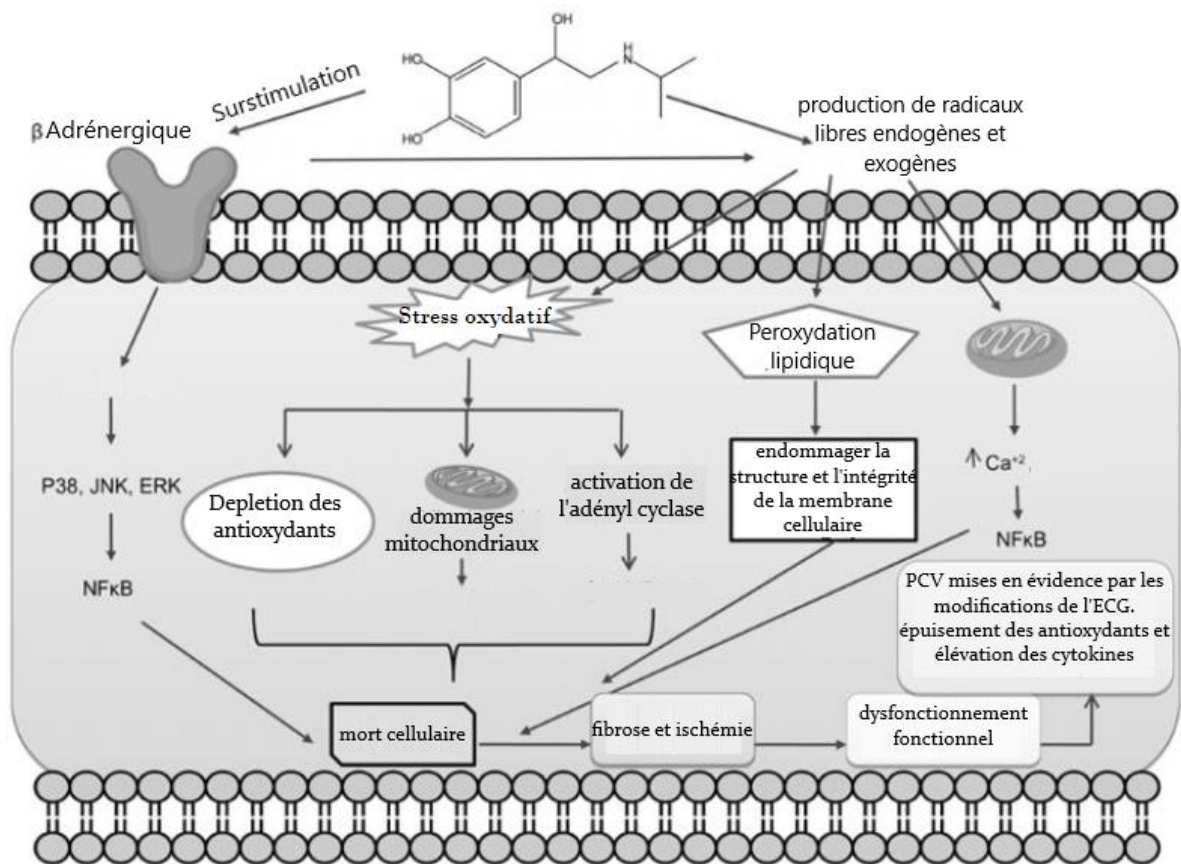


Figure 12: Mécanisme moléculaire la cardiotoxicité induite par l’isoproté rénal (Allawadhi et al., 2018).

Partie Pratique

Matériel et Méthodes

La présente étude a été menée au sein de laboratoire de Biochimie ainsi que dans l'animalerie de l'université -8 Mai 1945- de Guelma. Elle a été divisée en deux volets. Le premier concerne l'analyse phytochimique de notre échantillon la « propolis » et le deuxième s'intéresse à l'effet de la propolis sur la cardiotoxicité induite par l'isoprotérénol chez les souris.

I. Evaluation de l'activité antioxydante de la propolis *in vitro*

1. Matériel végétal

1.1. Présentation

L'extrait éthanolique de la propolis a été gracieusement offert par le laboratoire de Toxicologie Moléculaire de l'université de Jijel. Elle a été obtenue à partir de colonies d'abeilles situées dans la région de Jijel à l'Est de l'Algérie.

1.2. Solubilité

L'extrait éthanolique de la propolis est faiblement soluble dans l'eau. Pour réaliser les tests phytochimiques, l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) a été dissout dans l'éthanol pur.

2. Méthodes

2.1. Dosage des Polyphénols

La méthode de Folin-Ciocalteu a été adoptée pour l'estimation des polyphénols totaux de l'extrait éthanolique de la propolis (**Li et al., 2007**).

Principe

Le réactif Folin-Ciocalteu se compose d'un assortiment d'hétéropolyacides, d'acides phosphomolybdiques et phosphotungstiques (**Agbor et al., 2014**). Ce test fonctionne en transférant des électrons en milieu alcalin à partir de composés phénoliques vers des complexes d'acide phosphomolybdique/phosphotungstique qui produisent des complexes bleus. Ces derniers peuvent être déterminés par spectroscopie à environ 765 nm (**Ainsworth and Gillespie, 2007**).

Mode opératoire

Dans un tube à essai, un volume de 200 µl de la solution de l'EEP à 0.1 mg/ml a été additionné à un 1 ml du réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois. Après une agitation le mélange est incubé pendant 5 minutes puis un volume de 800µl de carbonate de sodium Na₂CO₃ à 7.5 % a été rajouté avant d'incuber le mélange réactionnel pendant 90 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le blanc a été préparé de la même façon en remplaçant l'EEP par l'éthanol. Une gamme de dilution à partir d'acide gallique (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1mg/ml) a été utilisée pour obtenir une courbe d'étalonnage, les dilutions subissent le même protocole de dosage. Les mesures de la DO sont faites par spectrophotométrie (JENWAY 630S) à 765 nm. Chaque mesure a été effectuée en trois fois. Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g de propolis (mg Eq AG/g EEP).

2.2. Dosage des flavonoïdes

La mesure de la quantité totale de flavonoïdes présents dans l'extrait éthanolique de la propolis est effectuée en utilisant la méthode élaborée par **(Bahorun et al., 1996)**.

Principe

La méthode est basée sur l'oxydation des carbones 4 et 5 des flavonoïdes par le réactif AlCl₃ à 2%, elle conduit à la formation d'un complexe jaune absorbant la lumière à 430nm **(Tine et al., 2019)**.

Mode opératoire

A 1ml de la solution de l'EEP à 1 mg/ml, 1ml de la solution méthanolique de chlorure d'aluminium AlCl₃ à 2% a été ajoutée, le mélange réactionnel a été agité puis incubé pendant 10 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. Le blanc a été préparé de la même façon en remplaçant l'EEP par 1 ml d'éthanol. La lecture de la DO a été effectuée par spectrophotomètre UV-Visible (JENWAY 630S) à 430 nm. Pour la préparation de la gamme d'étalonnage une solution mère de quercétine à 0.1 mg/ml (flavonoïde de référence) a été préparée et à partir de laquelle des dilutions (0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1mg/ml) sont réalisées. Chaque mesure a été réalisée en trois fois.

Les résultats sont exprimés en mg équivalents de quercétine par g de poids d'extrait (mg Eq QRC/g EEP).

2.3. Mesure de l'activité antioxydante Test DPPH

Principe

Le DPPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical synthétique présentant à l'état oxydé une couleur violette intense (Molyneux, 2003). La réduction de cette molécule par les protons à partir de substances antioxydants induit la disparition de la coloration violette dont la dégradation est en fonction de la richesse de l'extrait en ces molécules capables de neutraliser ce radical libre. La cinétique de dégradation de la couleur est déterminée par spectrophotométrie par comparaison à un témoin (sans extrait) selon l'équation suivante :

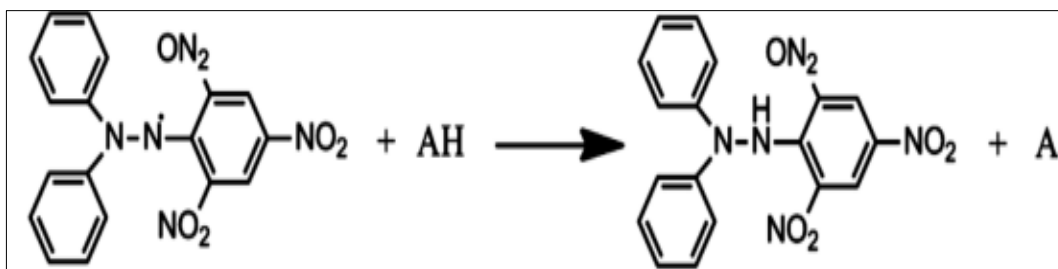


Figure 13: Radical libre DPPH. AH est une molécule donneuse antioxydante et A est un radical libre formé (Sirivibulkovit et al., 2018).

Mode opératoire

La mesure de l'activité antioxydante de la propolis est effectuée en utilisant la méthode modifiée de (Koleva et al., 2002).

Des concentrations différentes de l'extrait de propolis (0,001 – 1 mg/ml) ont été mélangé avec un volume de la solution éthanolique de DPPH (4×10^{-5} M). Dans des tubes à essai, un volume de 1,5 ml de la solution éthanolique de DPPH a été ajouté à 0,05 ml de chaque dilution de l'extrait de la propolis (0.1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025, 0.001 mg/mL). Le mélange réactionnel a été maintenu dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Le témoin a été préparé dans les mêmes conditions en remplaçant la propolis par l'éthanol, L'absorbance du milieu réactionnel a été mesurée à 517 nm. Toutes les manipulations ont été effectuées en

triplicata. Des dilutions de quercétine égales aux dilutions de l'EEP ont été testées par la même procédure.

L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC_{50}) qui est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = (\text{Abs}_{\text{Control}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}} / \text{Abs}_{\text{Control}}) \times 100$$

Les IC_{50} correspondant à l'EEP et à la quercétine sont calculées à partir des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées.

2.4. Test de la réduction du fer FRAP

Principe

Le pouvoir réducteur des extraits phénoliques est basé sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} (bleu de Prusse) en présence d'un antioxydant qui possède le pouvoir de céder des électrons qui donnent la couleur bleue (Zhang and Shahidi, 2015).

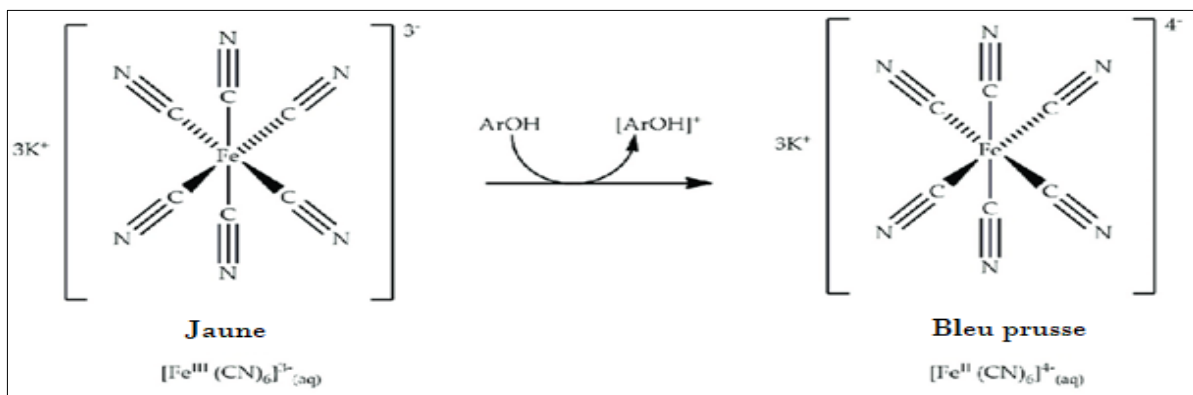


Figure 14: Mécanisme de réduction de ferricyanure de potassium (Bibi Sadeer et al., 2020).

Mode d'opérateur

Le test FRAP a été réalisé en utilisant la méthode décrite par (Aparadh et al., 2012). Dans des tubes à essai, sont introduits : 500 μ l de l'échantillon à différentes concentrations ; 1ml de de solution tampon phosphate ((0,2 M) PH = 6.6) et 1 ml de de solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ (1 %). Le mélange est agité et incubé à 50°C pendant 20 min, ensuite,

1ml d'acide trichloracétique (10 %) est appliqué pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 t.p.m. pendant 10 min. Après, à 1.5 ml de surnageant sont ajoutés 1.5 ml d'eau distillée et 0.1 ml d'une solution de trichlorure de fer (FeCl_3) (0.1%). Le mélange est agité encore une fois et incubé pendant 10 min. L'absorbance est lue à 700 nm. Les absorbances seront converties en mmole Fe^{II} /mg de propolis ou de quercétine à l'aide d'une courbe étalon de concentrations différentes de $\text{FeSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$ (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.3, 1.5 mM) préparées dans les mêmes conditions.

II. Evaluation de l'effet cardioprotecteur de la propolis *in vivo*

1. Matériel animal

Cette étude expérimentale a été menée sur des souris mâles adultes du genre *Mus Musculus* pesant entre 27 et 37 g, obtenues à partir de l'institut pasteur d'Algérie. Les animaux ont été hébergés dans des cages standards dans l'animalerie et soumis à un cycle de lumière de 12 heures. Ils ont été nourris avec une alimentation standard et avaient un accès libre à l'eau.

2. Méthodes

2.1. Protocole expérimental

Pour l'administration aux souris par voie orale, l'EEP a été dissout dans le DMSO 5%.

Pour l'induction de l'infarctus du myocarde, l'isoprotérénol a été fraîchement préparée dans une solution saline 0.9 % au moment de l'administration par voie sous-cutanée (SC) à la dose de 150 mg/kg (Sahu et al., 2015)

Après la période d'adaptation, pour l'étude principale les souris ont été sélectionnés selon leur poids et divisés en six lots de sept souris chacun et ont été traités comme suit :

Lot I (Contrôle) : les souris de ce groupe ont reçu chaque jour du NaCl 0.9% par voie SC pendant 7 jours.

Lot II (Isoprotérénol ISO) : les souris de ce groupe ont reçu une injection d'isoprotérénol (150 mg/kg) le 6^{ème} et le 7^{ème} jour à 24h d'intervalle.

Lot III (DMSO 5% +ISO) : les souris de ce groupe ont reçu par gavage gastrique DMSO 5% pendant 7 jours et une injection SC de l'isoprotérénol (150 mg/kg) le 6^{ème} et le 7^{ème} jour à 24h d'intervalle.

Lot IV (Propolis 100mg/kg) : les souris de ce groupe ont reçu par gavage l'EEP à 100mg/kg pendant 7 jours.

Lot VI (propolis 50+ Iso) : les souris de ce groupe ont reçu par gavage l'EEP à 50 mg/kg pendant 7 jours suivie d'une injection SC d'isopretérénol (150mg/kg) le 6^{ème} et le 7^{ème} jour à 24h d'intervalle.

Lot V (propolis 100+Iso) : les souris de ce groupe ont reçu par gavage l'EEP à 100 mg/kg pendant 7 jours suivie d'une injection SC d'isopretérénol (150mg/kg) le 6^{ème} et le 7^{ème} jour à 24h d'intervalle.

2.2. Sacrifice des souris

A la fin de l'expérimentation et 48h après l'administration la première dose de l'isoprotérénol, les animaux ont été mis à jeun pendant une nuit (12 h) avec accès libre à l'eau. Les souris ont été pesées puis sacrifiées et placés en *décubitus* dorsale pour l'incision thoracique. Le cœur battant a été rapidement excisé ensuite rincé dans du NaCl 0.9% à 4°C et pesé.

2.3. Evaluation des marqueurs biochimiques cardiaques

2.3.1. Prélèvement sanguin

Le sang a été prélevé et a été mis dans des tubes héparinés ensuite les tubes ont été mis dans une centrifugeuse réfrigérée (SIGMA 2-16KL) à 4000 t.p.m., 4°C pendant 5 min. le plasma obtenu est récupéré et utilisé pour le dosage des paramètres biochimiques (LDH, Cholestérol).

2.3.2. Dosage de l'activité de la Lactate déshydrogénase (LDH)

L'activité de la LDH plasmatique des six lots a été évaluée en utilisant un kit commercial (ELITech) (*Annexe 1*). Ces mesures ont été réalisées par un analyseur automatisé (SELECTRA PRO S).

2.3.3. Dosage du Cholestérol

Les taux du cholestérol plasmatique des six lots ont été estimés en utilisant des kits commerciaux (ELITech) (*Annexe 2*). Ces mesures ont été réalisées par un analyseur automatisé (SELECTRA PRO S).

2.4. Evaluation des paramètres de stress oxydant dans le tissu cardiaque

2.4.1. Préparation de la fraction cytosolique

La fraction cytosolique est préparée selon la méthodes décrite par (**Mnafgui et al., 2021**). Le cœur de souris prélevé a été rincé par Na Cl 0.9 % puis pesé. Le tissu cardiaque a été homogénéisé dans du tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4, 4 °C) contenant du KCl (1.17 %) en utilisant un homogénéisateur ULTRA-TURRAX. L'homogénat est centrifugé à 4000 t.p.m. pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est fractionné puis conservé à -20°C pour les dosages des paramètres du stress oxydant.

2.4.2. Evaluation des dommages oxydatifs

2.4.2.1. Dosage du malondialdéhyde

Principe

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des produits finaux formés lorsque les acides gras polyinsaturés (PUFA) avec trois doubles liaisons ou plus sont décomposé sous l'effet des radicaux libres (**Lahouel et al., 2004**).

Les taux de MDA au sein de l'homogénat du tissu cardiaque ont été évalués en utilisant une méthode spectrophotométrique. Elle repose sur la réaction entre le composé issu de la peroxydation lipidique (MDA) et l'acide thiobarbiturique (TBA) basé sur l'apparition d'un complexe d'une couleur rose, en milieu acide et à 100 °C appelé TBARS (Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique) (figure 15). Ce composé est extractible par les solvants organiques comme le n-butanol en milieu acide et à 100 °C dont la densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 532 nm (**Aguilar Diaz De Leon and Borges, 2020; Ahmed et al., 2017; Ohkawa et al., 1979**).

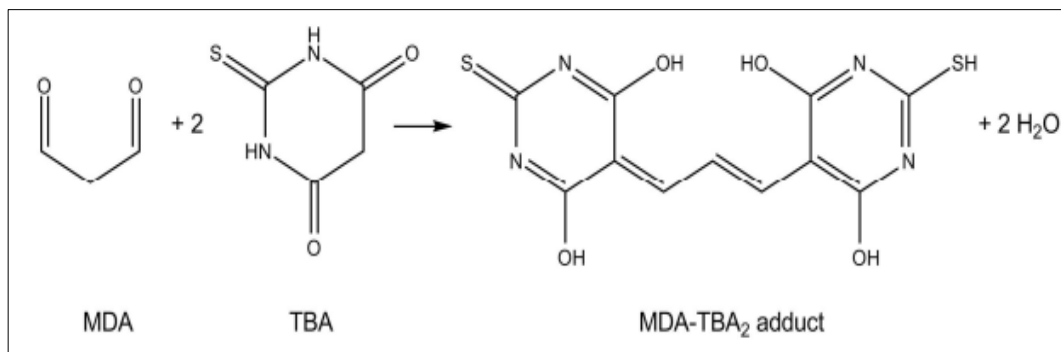


Figure 15: Réaction du malonaldehyde(MDA) avec l'acide trichloracétique (Weitner et al., 2016).

Mode opératoire

Pour ce dosage 500 µl d'homogénat sont mis dans des tubes en verre auxquels sont ajoutés 500µl de TCA 20 % et 500 µl de TBA (0.67 %). Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 min. une fois les tubes refroidis, 4 ml de n-butanol sont ajoutés. Le mélange est centrifugé à 3000 t.p.m. pendant 15 min, la densité optique du surnageant est déterminée par le spectrophotomètre à 532 nm.

2.4.3. Evaluation du statut antioxydant

2.4.3.1. Dosage du glutathion réduit

Principe

Le glutathion réduit (GSH) est un antioxydant intracellulaire dominant présent dans divers organismes. Il est composé d'un tripeptide de gamma-glutamyl-cystéinyglycine (Narayanankutty et al., 2019).

Le dosage du glutathion réduit (GSH) est réalisé par la méthode colorimétrique d'Ellman (Gergel' and Cederbaum, 1997), qui repose sur la réaction d'oxydation consistant à couper la molécule d'acide 5,5-dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH (figure 16), ce qui libère l'acide 2-nitro-5-mercapto-benzoïque (NMB) (Bahlil et al., 2020) ayant un pic d'absorption à 412 nm, indiquant ainsi une coloration jaune résultante de la réaction (Vuolo et al., 2022).

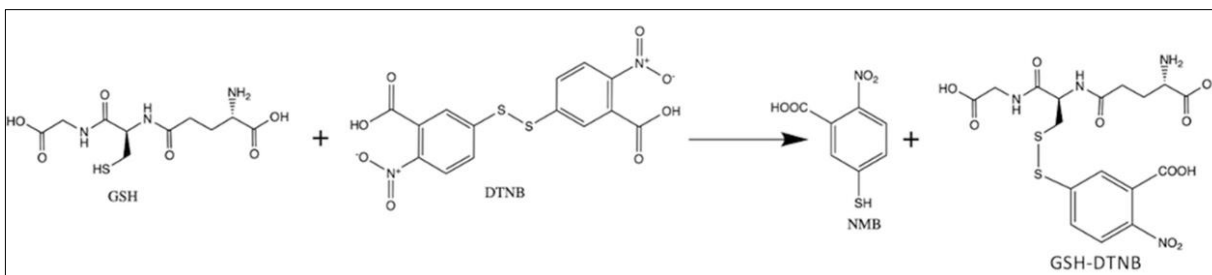


Figure 16: Réaction du glutathion (GSH) avec le réactif d'Ellman/DTNB ; Acide 2-nitro-5-mercapto-benzoïque (Jîtcă et al., 2021).

Mode opératoire

Le dosage du GSH a été effectué par spectrophotométrie selon la méthode décrite par (Lahouel et al., 2004).

1g de tissu cardiaque a été homogénéisé dans du TCA 5 % puis centrifugé à 4000 t.p.m. pendant 10 minutes. 200 µl du surnageant sont additionnés à 1700µl de tampon phosphate (0,1 M, pH = 7.4), puis 100 µl de DTNB (0,01 M) ont été ajoutés. Après une incubation de 5 minutes, la lecture des absorbances est faite à 412nm contre le blanc préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'homogénat par l'eau distillée. Une gamme étalon de GSH avec différentes concentrations (de 0,125 à 1 mM) a été faite en réalisant les mêmes étapes précédentes pour déterminer les concentrations en GSH.

La lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm. Les concentrations sont déduites à partir de la gamme étalon de glutathion et les résultats sont exprimés en µmoles de glutathion/g de tissus cardiaque.

2.4.3.2. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase

Principe

La mesure de l'activité de la catalase (CAT) a été réalisée en utilisant la méthode de Clairborne qui repose sur la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) mesurée à 240 nm (Greenwald, 2018).

Mode opératoire

A 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, PH 7.4), 950µl de la solution de H₂O₂ (0.019M) fraîchement préparée ont été ajoutés, 25µl d'homogénat ont été ajoutés en dernier, le mélange ainsi préparé dans une cuve en quartz est mis dans le spectrophotomètre pour un suivi cinétique (pendant 2 min) de la disparition du H₂O₂ à 240 nm.

Le résultat de l'activité enzymatique est exprimé en UI/g de protéines/g de tissu, et obtenu par la formule ci-dessous :

$$\text{Activité de la CAT} = (\Delta T \times \log \frac{DO1}{DO2}) \times \frac{Fd}{\epsilon \times L \times C \text{ protéines}}$$

DO1 : L'absorbance à 0 min.

DO2 : L'absorbance à 1 min.

ΔT : L'intervalle de temps en min.

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).

2.4.3.3. Dosage des protéines

Principe

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Biuret en utilisant un kit commercial prêt à l'emploi. En milieu alcalin, les ions cuivre (Cu²⁺) interagissent avec les liaisons peptidiques des protéines pour former un complexe bleu-violet dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines, ainsi un dosage colorimétrique peut être réalisé à 540 nm (Ndibualonji et al., 2017).

Mode opératoire

1 ml du réactif de Gornall est ajouté à 20 µl de la fraction cytosolique. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance à 540 nm est mesurée par un

spectrophotomètre. La densité optique du standard (solution de BSA) est mesurée dans les mêmes conditions. Le blanc représente le réactif de Gornall seul.

La concentration en protéine des échantillons est calculée selon le rapport suivant :

$$[\text{Protéines}] = (\text{DO}_E - \text{DO}_B / \text{DO}_S - \text{DO}_B) \times n,$$

Où : n= 5 g/dL ou 50 g/L

A_E : Absorbance de l'échantillon.

A_B : Absorbance du Blanc.

A_S : Absorbance du standard

La concentration en protéines est exprimée en g de protéines/g de tissu cardiaque qui sera utilisé pour exprimer l'activité enzymatique de la catalase.

2.5. Mesure de la taille de l'infarctus du myocarde par la coloration TTC

Principe

La zone infarctée a été détectée visuellement en utilisant le Tétrazolium de Triphénylchlorure (TTC). Le TTC est réduit en formazan de triphényl-tétrazolium (TTF), donnant ainsi une couleur rouge brique au myocarde intact (non infarcté), où l'activité déshydrogénase est conservée. En conséquence, le myocarde infarcté, dépourvu d'activité enzymatique, se manifeste comme une zone pâle non colorée. Par conséquent, la coloration TTC permet de distinguer clairement la zone normale de la zone ischémique (**Kakimoto et al., 2013**).

Mode opératoire

La méthode utilisée est celle adaptée des deux méthodes de (**Khalil et al., 2006**) et (**Csonka et al., 2010**).

Après le sacrifice le cœur est prélevé, rincé avec Na Cl et les oreillettes sont retirées. Le cœur a été congelé pendant 30 min, puis tranché avec une matrice de coupe de cœur, en tranches transversales de 1 mm, les tranches sont pesées et incubées à 37°C dans une solution de TTC 1% pendant 20 minutes. Les tranches humectées avec le TTC ont été séchées pour éviter les reflets lors de la prise de photo. Des vues apicales et basales de toutes les tranches ont été

photographiées. Les tranches ont été mis dans du formaldéhyde 10% puis photographiées de la même façon.

Résultats et Discussion

I. Evaluation de l'activité antioxydante de la propolis *in vitro*

1. Dosage des polyphénols

En se basant sur la courbe d'étalonnage représentée dans la figure 17, obtenue à partir de concentrations croissantes d'acide gallique (mg/ml), le taux de polyphénols présents dans l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) est évalué à $380 \pm 0,01$ mg EAG/g de propolis en utilisant la formule suivante ($Abs = 11,593 [AG] + 0,08$; $R^2=0.9974$).

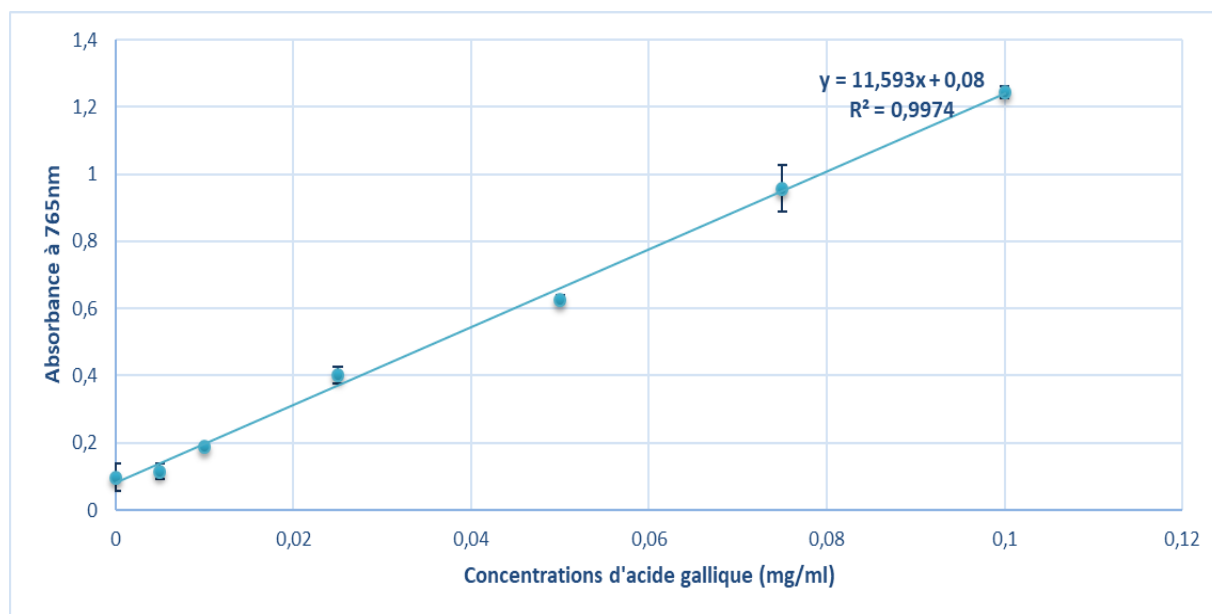


Figure 17: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols.

La propolis représente une excellente source d'antioxydants naturels, tels que les acides phénoliques et les flavonoïdes. Les métabolites secondaires les plus répandus dans le règne végétal sont les acides phénoliques, ces composants ont un rôle protecteur contre les maladies causées par le stress oxydatif (Gülçin et al., 2010).

Les résultats de notre étude indiquent que l'EEP présente une concentration plus importante de polyphénols totaux ($380 \pm 0,01$ mg EAG/g de propolis) par rapport à la propolis Portugaise (329 mg EAG/g de propolis) (El-Guendouz et al., 2017), Indonésienne de la région de Lampung (327.86 ± 38.15 mg EAG/ g de propolis) (Mulyati et al., 2020), Coréenne de la région de cheongju (283 ± 5 mg EAG/ g de propolis) (Ahn et al., 2004), Brésilienne (120 ± 5.6 mg

EAG/ g de propolis) (**Kumazawa et al., 2004**) et finalement celle de la Malaisie (15.93 ± 0.18 mg EAG/ g de propolis) (**Ahmed et al., 2017**).

Notre propolis contient néanmoins moins de polyphénols que la propolis de l'Argentine dont la concentration en polyphénols totaux est (593 ± 15 mg EAG/ g de propolis) (**Salas et al., 2016**), la propolis chinoise qui contient (537.9 ± 0.87 mg E acide chlorogénique/g de propolis) (**Wang et al., 2015**) et finalement la propolis Canadienne de la région Ontario ($429,61 \pm 3,71$ mg EAC/ g de propolis). Cette variation en teneur des polyphénols est peut-être due à plusieurs facteurs tels que la zone géographique, la flore, la saison et les conditions de production, les conditions environnementales (**Gargouri et al., 2019; Shehata et al., 2020**) et l'espèce de l'abeille productrice de la propolis. De nombreuses propriétés pharmacologiques et biologiques précieuses sont liées à la présence des composés phénoliques dans la propolis (**Nedji and Loucif-Ayad, 2014**). Par conséquent, la richesse de l'EEP en polyphénols indique qu'elle peut jouer un rôle très important dans la neutralisation des radicaux libres et delà la minimisation des dommages cellulaires.

2. Dosage des flavonoïdes

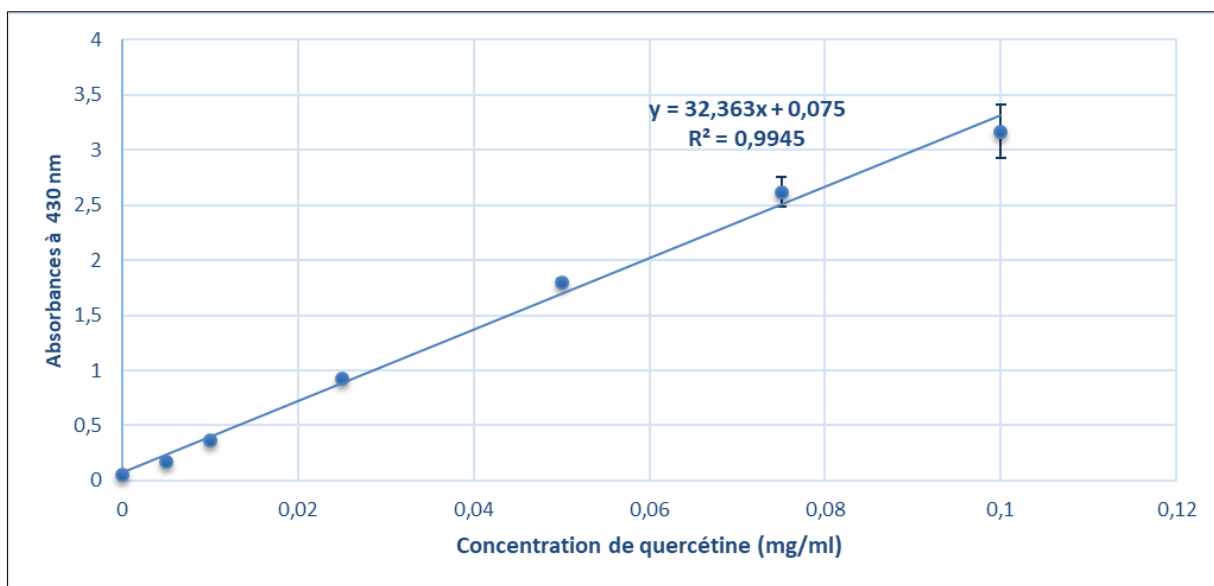


Figure 18: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

En se basant sur la courbe d'étalonnage (représentée dans la figure 18) obtenue à partir de concentrations croissantes de la quercétine (QRC) (mg/ml), le taux des flavonoïdes présents

dans la propolis algérienne est évalué à $30 \pm 0,02$ mg d'équivalent QRC/g de propolis en utilisant la formule suivante ($\text{Abs} = 32.363 [\text{QRC}] + 0,075$; $R^2 = 0.9945$).

Les flavonoïdes constituent la catégorie la plus répandue des composés polyphénoliques dans l'alimentation de l'homme et ont une distribution généralisée dans les végétaux (**Gülçin et al., 2010**). Ces métabolites sont des antioxydants très puissants qui ont la capacité de piéger les radicaux libres (**Wang et al., 2016**). Une très grande diversité des teneurs en flavonoïdes a été mise en évidence dans les propolis collectées à partir des différentes zones géographiques (l'Irlande : 2.86 ± 0.2 mg EQ/ g de propolis ; Malaisie : 1.65 ± 0.10 mg EQ/g de propolis et la région Lampung de l'Indonésie 17.08 ± 0.53 mg EQ/g de propolis) (**Ahmed et al., 2017**; **AL-Ani et al., 2018** ; **Mulyati et al., 2020**). Ces propolis montrent une faible teneur en flavonoïdes par rapport à notre propolis qui montre 30 ± 0.02 mg EQ/g de propolis. Cependant la propolis australienne, coréenne, ukrainienne et brésilienne qui contiennent respectivement (145 ± 6.5 ; 136 ± 9 ; 63.7 ± 3.2 et 51.9 ± 2.4 mg EQ/g de propolis) (**Ahn et al., 2004**; **Kumazawa et al., 2004**) sont plus riches en flavonoïdes par rapport à notre EEP.

Selon (**Boulechfar et al., 2019**), la concentration en flavonoïdes totaux dans la propolis algérienne obtenue de la région de Grarem-Mila est 60.43 ± 0.65 mg EQ/g de propolis. En plus, la teneur en flavonoïdes de la propolis de la région de Annaba varie de $58,99 \pm 2.49$ à $91,44 \pm 4.42$ mg EQ/g de propolis (**Nedji and Loucif-Ayad, 2014**). Cette variation de la teneur en flavonoïdes de la propolis est principalement due à la divergence des plantes régionales consommées par les abeilles mais aussi de la saison de récolte et de nombreux autres facteurs déjà mentionnés.

En se basant sur les résultats obtenus et les comparaisons avec les résultats d'études antérieures, il est évident que ce taux des flavonoïdes peut contribuer à la capacité de l'EEP à piéger les radicaux libres.

3. Mesure de l'activité antioxydante par le test DPPH

La capacité antioxydante de l'EEP mesurée à l'aide de la méthode de piégeage du radical DPPH^{*} est illustrée dans la figure 19.

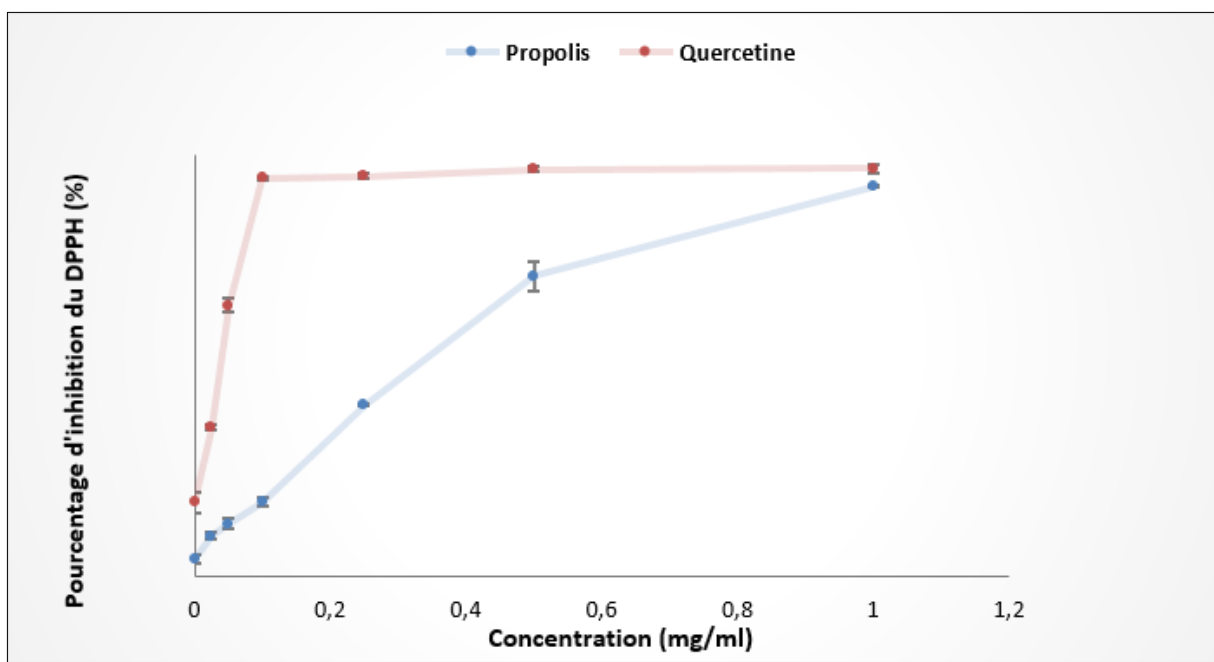


Figure 19: Pourcentage du piégeage du radical DPPH par la propolis et la quercétine.

À des concentrations de 0.001 à 0.25 mg/mL, l'EEP montre une faible capacité de piégeage s'étend de (4.1 ± 0.1 % à 40.7 ± 0.3 %), contrairement à la QRC qui montre une forte capacité de piégeage qui s'étend de (17.6 ± 2.5 % à 95 ± 0.5 %) dans le même intervalle des concentrations.

De plus, la capacité antioxydante de l'EEP augmente proportionnellement à la concentration, atteignant 92.5 % ± 0.2 à 1 mg/mL, contre 94.4 % ± 0.5 à 0,1 mg/mL pour la quercétine. En outre, la quantité de l'EEP requise pour inhiber 50 % du DPPH^{*} (IC₅₀), tel qu'indiqué dans le tableau 5, était de 0.33 ± 0.00 mg/mL, ce qui est quasiment dix fois plus forte que la IC₅₀ de la quercétine (0,0376 ± 0.00 mg/mL).

Par conséquent, l'EEP possède une faible activité antioxydante par rapport à la Quercétine, puisque :

$$IC_{50\text{ EEP}} > IC_{50\text{ Quercétine}}$$

Tableau 5: Pourcentages d'inhibition de la propolis et la quercétine.

Echantillon	Propolis	Quercétine
IC₅₀ (mg/ml)	0.33 ± 0.00	0.038 ± 0.00

La mesure de la capacité antioxydante des réactifs biologiques peut être évaluée en fonction de leur capacité à neutraliser le radical DPPH (**Aparadh et al., 2012**). Par comparaison de l'activité anti radicalaire de notre propolis avec celles de la Malaisie et de l'Inde obtenues par : (**Ahmed et al., 2017**), (**Laskar et al., 2010**) dont les valeurs de l'IC₅₀ sont estimées à (0.00108 mg/ml) et (0.07 mg/ml) respectivement, le pouvoir de piégeage des radicaux libres par notre EEP est plus faible. Par contre l'IC₅₀ de la propolis Indonésienne de la région de Kalimantan du Sud, la propolis turque de la région de Bodrum et la propolis algérienne de la région de Sidi Dahou représentent des IC₅₀ égales à 1,027 ± 6,37 mg/ml, 3.94 mg/ml et 19,95mg/ml respectivement (**Alç and Ceylan, 2020; Debab et al., 2017; Fikri et al., 2019**) possédant un effet anti radicalaire plus faible que notre EEP.

Selon (**Lahouel et al., 2011**), les flavonoïdes de l'extrait de propolis protègent les tissus cardiaques contre les maladies, cela revient à leur capacité à piéger les radicaux libres. Cette capacité est liée à la présence de multiples substitutions OH dans la structure des flavonoïdes, ces substitutions représentent un élément indispensable pour l'efficacité antioxydante d'un flavonoïde (**Lahouel et al., 2006**).

4. Mesure de l'activité antioxydante par le test FRAP

Le pouvoir antioxydant de l'EEP mesuré par la méthode de FRAP est illustré dans l'histogramme représenté dans la figure 20 réalisé à partir de la courbe étalon du $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Annexe 3).

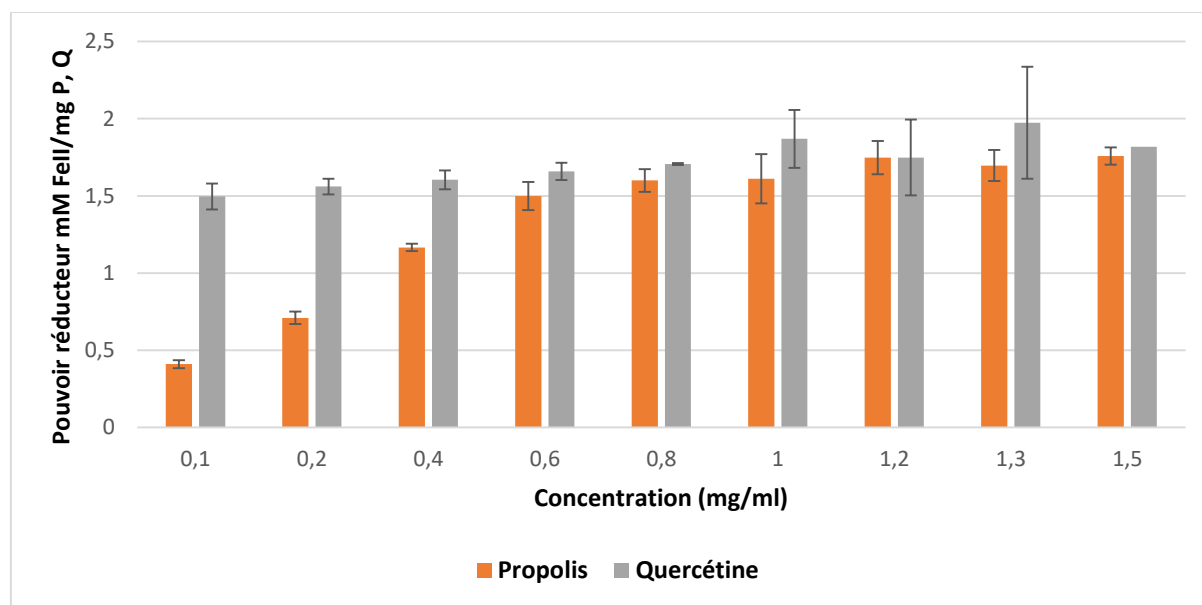


Figure 20: Activité antioxydante de la propolis et de la quercétine par le test FRAP.

Le pouvoir réducteur de l'EEP et de la quercétine augmente proportionnellement à la concentration. A des concentrations égales à 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL, l'EEP montre un pouvoir réducteur faible à celui de la quercétine, par contre à des concentrations supérieures à 0.6 mg/mL il montre un pouvoir réducteur proche à celui de la quercétine.

Le potentiel antioxydant réducteur du fer de la propolis a été mesuré par la réduction directe de $\text{Fe}^{3+}(\text{CN})_6$ en $\text{Fe}^{2+}(\text{CN})_6$ (Gülçin et al., 2010). Le dosage FRAP évalue principalement la capacité des antioxydants à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} (Ahmed et al., 2017). Il est clair que notre propolis possède un pouvoir réducteur puissant particulièrement à des concentrations supérieures à 0.6 mg/mL. Le test FRAP nous a confirmé que l'EEP possède une activité antioxydante puissante, cette propriété pourrait être due à la structure des flavonoïdes présents dans notre propolis. Car selon (Laskar et al., 2010) ces composés sont considérés comme de bons donneurs d'électrons et ont la capacité de convertir Fe^{3+} en Fe^{2+} grâce à leur structure caractéristique riche en groupements hydroxylés.

II. Evaluation de l'effet cardioprotecteur de la propolis *in vivo*

Durant la période de traitement (7 jours), aucun décès n'a été observé dans aucun des lots expérimentaux.

1. Indice d'hypertrophie cardiaque

Le rapport de poids du cœur par rapport au poids corporel a été déterminé pour évaluer l'ampleur de l'augmentation du poids du cœur due à l'injection d'isoprotérénol (Soraya et al., 2012).

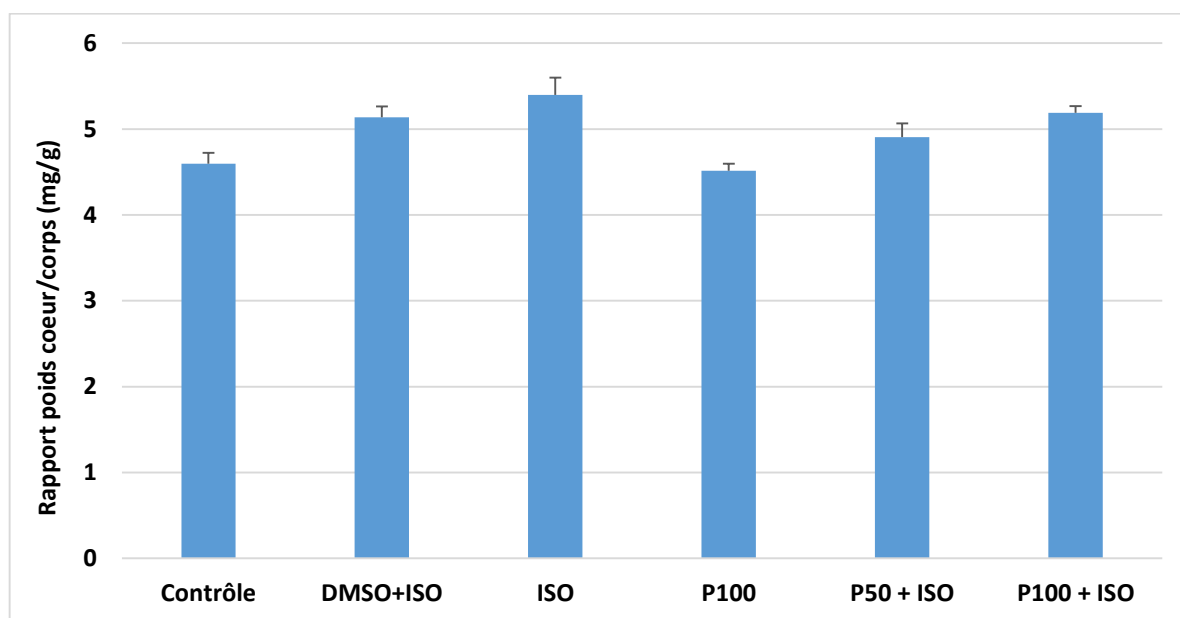


Figure 21: Variation des rapports de poids cœur/corps chez les différents lots.

D'après les résultats exprimés dans la figure 21, une augmentation considérable du rapport poids cœur/corps a été observée dans le groupe ISO (5.40 ± 0.20) par rapport au groupe contrôle (4.60 ± 0.13). Cependant, une légère diminution du rapport poids du cœur/corps a été observée à la fois dans les groupes DMSO+ISO (5.14 ± 0.13) et P100+ISO (5.19 ± 0.08) par rapport au groupe ISO. De plus, un prétraitement par la P50 a entraîné une diminution notable du ratio poids cœur/corps (4.91 ± 0.16) par rapport aux souris traitées par l'isoprotérénol. Le rapport poids de cœur/corps des souris traitées par la P100 seule (4.51 ± 0.08) est quasiment similaire à celui des souris contrôles (4.60 ± 0.13).

L'augmentation du rapport poids cœur/corps représente un indice d'hypertrophie cardiaque (Sahu et al., 2015). Cette dernière est caractérisée par une élévation de la masse du muscle cardiaque ainsi qu'une expansion de la teneur en eau, une plus grande accumulation de liquide dans l'espace intramusculaire et une nécrose des fibres musculaires cardiaques, entraînant une augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire. La réduction de la cavité ventriculaire représente aussi un signe d'hypertrophie (Neto et al., 2022; Paulino et al., 2019).

Le rapport poids cœur/corps nous a permis de savoir si le prétraitement avec les deux doses de la propolis (50 mg/kg et 100 mg/kg) préviendrait les changements des morphologies cardiaques causés par l'administration de l'isoprotérénol. En effet, le prétraitement pendant 7 jours aux deux doses de l'EEP a permis d'atténuer et de prévenir l'hypertrophie (effet anti hypertrophique). Finalement, en accord avec les études précédentes de (Ahmed et al., 2017; Neto et al., 2022) utilisant la propolis malaysienne et la propolis rouge brésilienne respectivement, la propolis possède des avantages thérapeutiques.

2. Evaluation des marqueurs biochimiques cardiaques

2.1. Dosage de l'activité de la Lactate déshydrogénase (LDH)

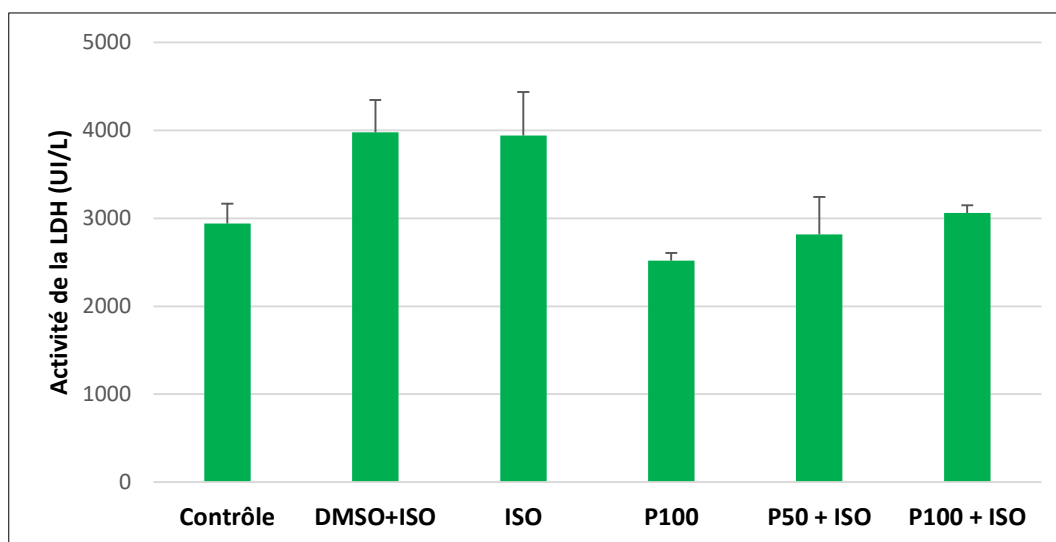


Figure 22: Variation de l'activité de la LDH plasmatique chez les souris des différents lots.

L'histogramme présenté dans la figure 22 démontre que l'administration de l'isoprotérénol a augmenté d'une manière remarquable le taux sérique de la LDH à $(3942 \pm 494 \text{ UI/L})$ en

comparaison avec la valeur du LDH trouvé dans le groupe contrôle (2941 ± 227 UI/L). Le groupe de souris traité par le DMSO+ISO a montré aussi un taux de LDH (3978 ± 367 UI/L) très proche que celui de l'isoprotérénol.

Le prétraitement avec les deux doses 50 mg/kg et 100 mg/kg a nettement réduit le taux de la LDH à 2818 ± 426 UI/L et 3061 ± 87 UI/L respectivement en comparaison avec le groupe ISO. En plus, le prétraitement par la P50 a diminué le taux de la LDH à une valeur inférieure à celle du groupe contrôle. L'administration de la P100 seule pendant 7 jours a réduit d'une manière considérable le taux de la LDH (2518 ± 89 UI/L) par rapport au groupe contrôle cela signifie un mécanisme de protection.

Un manque adéquat d'apport d'oxygène ou de nutriments aux tissus cardiaques ou des lésions cardiaques induits par des substances chimiques peuvent engendrer une perméabilité accrue voire une rupture de la membrane cardiaque, ce qui entraîne une libération de nombreuses enzymes cytosolique, comme la LDH et les transaminases...etc, dans la circulation sanguine et une augmentation subséquente de leur concentration sérique (**Ahmed et al., 2017**).

La LDH représente un indicateur de diagnostic de l'IM. Notre résultat montre que l'administration de l'Isoprotérénol a entraîné une augmentation remarquable du taux de la LDH sérique, en accord avec des études antérieures (**Ahmed et al., 2017; Allawadhi et al., 2018; Sahu et al., 2015**) ayant testé l'effet de la propolis malaisienne, l'effet de nombreuses substances végétales et l'effet de *lagerstroemia speciosa* sur la cardiotoxicité induite par l'isoprotérénol respectivement. Cette augmentation indique clairement des dommages cellulaires causés par l'isoprotérénol dans le myocarde. Cependant, le prétraitement avec les deux doses de propolis en particulier la dose 50 mg/kg a considérablement amélioré l'activité de la LDH, ce qui suggère que la propolis peut aider à maintenir l'intégrité de la membrane cellulaire, et à limiter la fuite des enzymes cytosolique. Cet effet protecteur contre les lésions cardiaques revient à la richesse de la propolis en polyphénols qui représentent des éléments antioxydants très puissants.

2.2. Dosage du Cholestérol sérique

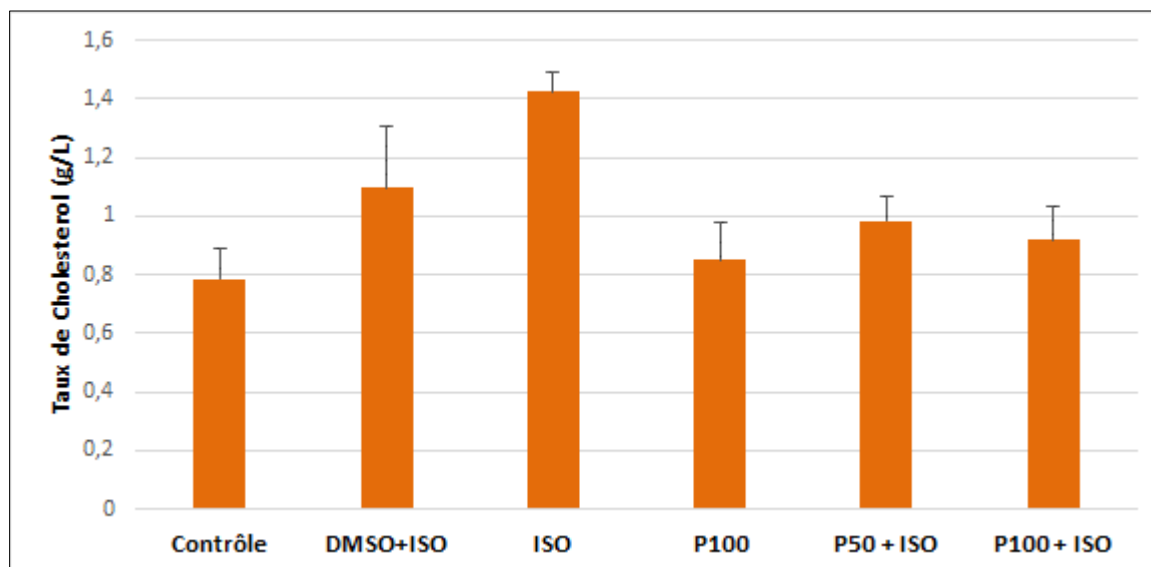


Figure 23: Variation des taux de cholestérol sérique chez les souris des différents lots.

D'après la figure 23, il est évident que le taux de cholestérol chez les souris traitées par l'Isoprotérénol est très élevé (1.42 ± 0.07 g/L) en comparaison avec celui chez les souris du groupe contrôle (0.78 ± 0.10 g/L). Cependant, le groupe DMSO+ISO a montré une diminution considérable (1.10 ± 0.21) par rapport au groupe Isoprotérénol. De plus, les souris prétraitées par les deux doses de la propolis (100 mg/kg) et (50 mg/kg) ont montré une diminution importante dans le taux de cholestérol (0.92 ± 0.12 g/L) et (0.98 ± 0.09 g/L) respectivement par rapport à ceux injectées par l'isoprotérénol seulement. Le niveau de cholestérol chez les souris traitées par la P100 seule (0.85 ± 0.13 g/L) est quasiment similaire à celui des souris contrôles (0.78 ± 0.10 g/L).

Le taux du cholestérol dans le sang est un facteur déterminant dans la survenue des maladies cardiovasculaires, non seulement en favorisant l'athérosclérose, mais également en altérant la composition, la structure et la stabilité des membranes cellulaires (Ahmed et al., 2017).

D'après nos résultats, l'administration des deux doses de la propolis a considérablement prévenu les altérations qui seraient survenues après l'administration de l'isoprotérénol. L'augmentation de la teneur en cholestérol myocardique observée chez les souris injectées par l'isoprotérénol est due à une absorption accrue de LDL-C (Lipoprotéines de basse densité-

Cholestérol) du sang par les membranes myocardiques (Saxena and Panjwani, 2014). Toutefois, elle pourrait être également le résultat d'une diminution du HDL-C, car le HDL-C est impliqué dans le transport du cholestérol vers le foie pour son catabolisme (Al-Yahya et al., 2013).

Ces résultats indiquent que la propolis possède un effet de cardioprotection qui contribue à l'inhibition de la progression de l'athérosclérose (Daleprane and Abdalla, 2013). On peut dire que la propolis régule le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, ce qui se traduit directement par une diminution du taux de cholestérol, cela revient à sa richesse en polyphénols et en flavonoïdes (Kurek-Górecka et al., 2013).

3. Evaluation des paramètres de stress oxydant dans le tissu cardiaque

3.1. Evaluation des dommages oxydatifs

3.1.1. Dosage du malondialdéhyde

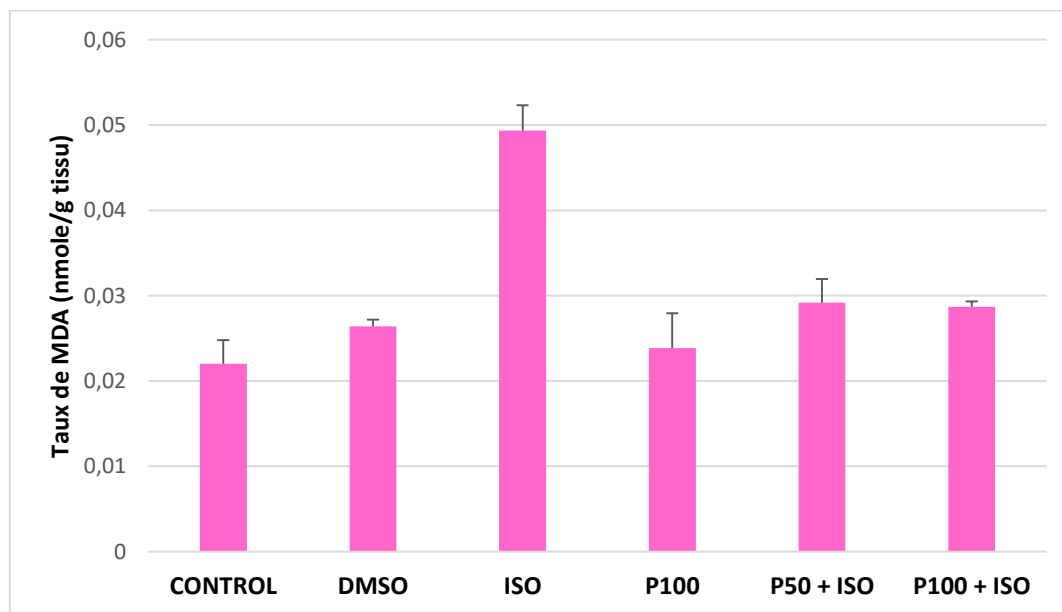


Figure 24 : Variation des taux de MDA chez les souris des différents lots.

Nos résultats représentés dans la figure 24 indiquent clairement une augmentation dans le taux de la MDA chez les souris injectées par l'Isoprotérénol (0.049 ± 0.003 nmole/g tissu) par rapport aux souris contrôles (0.022 ± 0.003 nmole/g tissu). On remarque une nette diminution

dans le niveau de la MDA chez les souris recevant la propolis 100 mg/kg et 50 mg/kg comme prétraitement (0.029 ± 0.001 nmole/g tissu) et 0.029 ± 0.003 nmole/g tissu respectivement) par rapport au souris isoprotérénol stressées. Sachant que, Les valeurs de la MDA des deux doses de la propolis sur sont très similaires. De plus, le groupe DMSO montre une diminution dans le taux de la MDA en comparant avec le groupe Isoprotérénol.

Cependant, les souris traitées par la propolis 100 mg/kg seule (0.024 ± 0.004 nmole/g tissu) représentent une valeur de MDA proche à celle du contrôle.

Le MDA est un produit final essentiel issu de la réaction de peroxydation des lipides. Une élévation de son taux provoque une augmentation des radicaux libres et diminue l'activité des antioxydants. L'augmentation de la concentration de MDA est associée à la nécrose du myocarde qui affecte le muscle cardiaque (**Yin et al., 2022**).

L'administration de l'isoprotérénol a provoqué une élévation marquée de la peroxydation des lipides (LPO), qui a été exprimée en teneur en MDA. L'isoproterenol provoque l'oxydation des lipides et la production de quantités importantes des ERO dans le tissu cardiaque. La LPO intense causée par l'ISO peut endommager les mitochondries et les membranes cellulaires, causant des dommages oxydatifs sévères dans le cœur et libérer du MDA dans la circulation sanguine. La présence accrue de MDA contribue à une augmentation de la production de radicaux libres et à une diminution de l'activité du système de défense antioxydant (**Ardjmand et al., 2019**).

Nos résultats sont similaires aux résultats menés par (**Kanbur et al., 2009**) qui ont trouvés qu'il n'existe pas une différence entre le groupe contrôle et le groupe qui a reçu de la propolis 100mg/kg seule. D'autres études ont signalée que la propolis a provoqué une réduction dans niveau de la MDA. La différence entre les résultats est due à plusieurs facteurs telle que l'origine, la composition, la dose administrée et la même la durée de l'administration de la propolis (**Kanbur et al., 2009**).

Notre étude a confirmé que le prétraitement avec les deux doses de la propolis 50mg/kg et 100mg/kg a entraîné une réduction du contenu myocardique en MDA, et aucune différence n'a été remarquée entre l'effet des deux doses. Cela est peut être attribué à la présence de flavonoïdes dans la propolis, qui peuvent piéger les produits de la peroxydation des lipides

générés de manière excessive par l'ISO, conférant ainsi une protection du tissu cardiaque (Ahmed et al., 2017).

3.1.2. Dosage du glutathione réduit

L'équation de la courbe d'étalonnage (*Annexe 4*) obtenue à partir de concentrations croissantes du glutathion (mg/ml) ($Abs = 32.363 [GSH] + 0,075$; $R^2 = 0.9945$) a été utilisée pour réaliser l'histogramme représenté dans la figure 25.

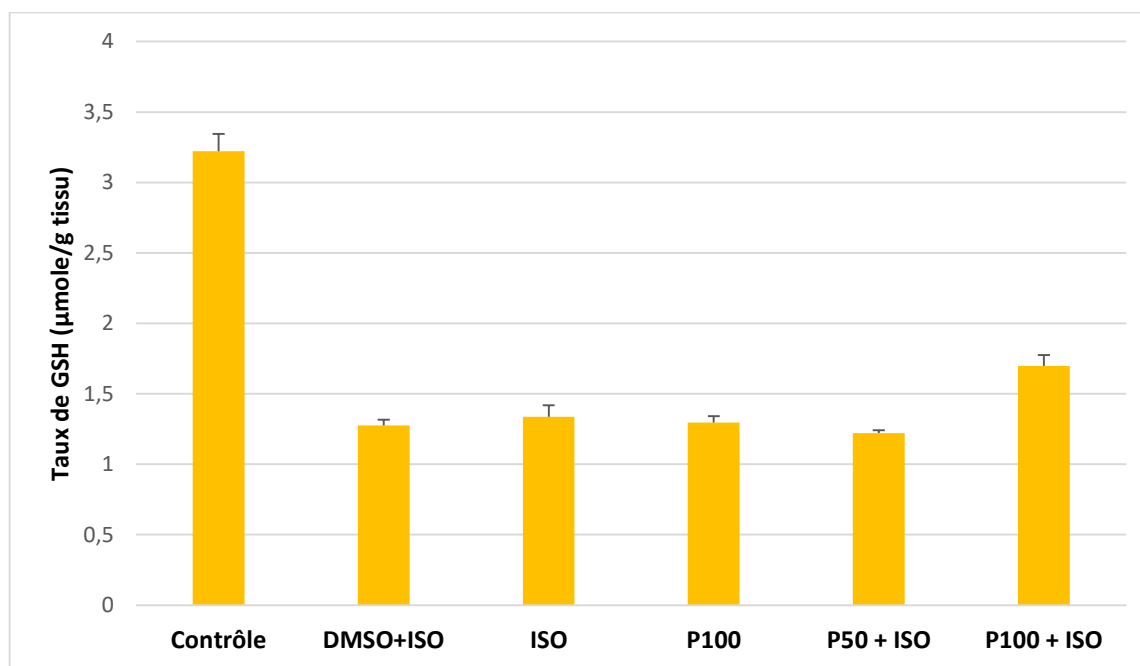


Figure 25: Variation des taux du glutathion réduit chez les souris des différents lots.

Comme le montre la figure 25, les souris traitées par l'isoprotérénol ont présenté une diminution considérable dans le taux du GSH ($1.34 \pm 0.08 \mu\text{mole/g}$) par rapport au groupe contrôle ($3.22 \pm 0.12 \mu\text{mole/g}$), d'autre part, le groupe prétraité par la propolis 100 mg/kg ($1.70 \pm 0.08 \mu\text{mole/g}$) représente une légère augmentation dans le taux du GSH en comparaison avec le groupe isoprotérénol. Par contre, les groupes prétraités par la propolis 50 mg/kg et le DMSO ont montré un taux de GSH légèrement inférieure ($1.22 \pm 0.02 \mu\text{mole/g}$ et $1.28 \pm 0.04 \mu\text{mole/g}$) à celui des souris injectées par l'isoprotérénol seul. Le traitement par la propolis 100 mg/kg ($1.30 \pm 0.05 \mu\text{mole/g}$) seule a montré une valeur de GSH très proche à celle de l'Isoprotérénol.

Les antioxydants ont un rôle crucial dans la neutralisation des ERO, empêchant ainsi les dommages cardiaques causés par le stress oxydatif. Le GSH est un des principaux antioxydants impliqués dans le processus d'élimination des ERO (Yin et al., 2022). Dans notre étude, le taux du GSH a diminué dans le tissu cardiaque du groupe Isoprotérénol par rapport au groupe non traité (contrôle) ce qui est en accord avec les travaux de (Sahu et al., 2015) et (Yin et al., 2022), révélant une production excessive des ERO. Le traitement préalable avec la propolis 100 mg/kg a empêché légèrement la diminution majeure dans le taux du GSH dans le tissu cardiaque, par contre le prétraitement par la dose 50 mg/kg n'a laissé aucun effet sur le niveau du GSH. Ces résultats suggèrent que la propolis (100mg/kg) peut aider à renforcer la défense antioxydante par le GSH. Ce renforcement est lié à la quantité de flavonoïdes de propolis arrivant à la cellule.

Les recherches menées par (Ishige et al., 2001) révèlent que les composés flavonoïdes peuvent indirectement réduire la quantité des ERO intracellulaires en augmentant la concentration du GSH intracellulaire. En outre, la propolis peut stimuler l'activité de la glutamate-cystéine ligase, une enzyme qui limite la vitesse de synthèse du GSH. Ainsi, la consommation de propolis est associée à une forte capacité de piégeage des radicaux libres et à une amélioration du système de défense antioxydant endogène (Mujica et al., 2017).

3.1.3. Evaluation de l'activité de la catalase

Comme il est montré dans la figure 26, l'activité de la catalase chez le groupe Isoprotérénol (0.060 ± 0.011 UI/g Prot/g Tissu) est assez réduite en comparaison avec le groupe contrôle (0.136 ± 0.021 UI/g Prot/g Tissu). Le groupe DMSO+ISO montre une activité (0.064 ± 0.027 UI/g Prot/g tissu) quasiment similaire à celle de l'isoprotérénol. Les souris ayant subi un prétraitement par la propolis à deux doses 100 mg/kg et 50 mg/kg ont connu une augmentation considérable de l'activité de la catalase (0.111 ± 0.026 UI/g Prot/g Tissu et 0.076 ± 0.005 UI/g Prot/g Tissu, respectivement) par rapport aux souris ayant reçu l'ISO. Sachant que l'effet de la P50 sur l'activité de la catalase est moindre que celui de la P100. Le traitement avec la propolis 100 mg/kg (0.105 ± 0.021 UI/g Prot/g) seule a diminué l'activité de la catalase.

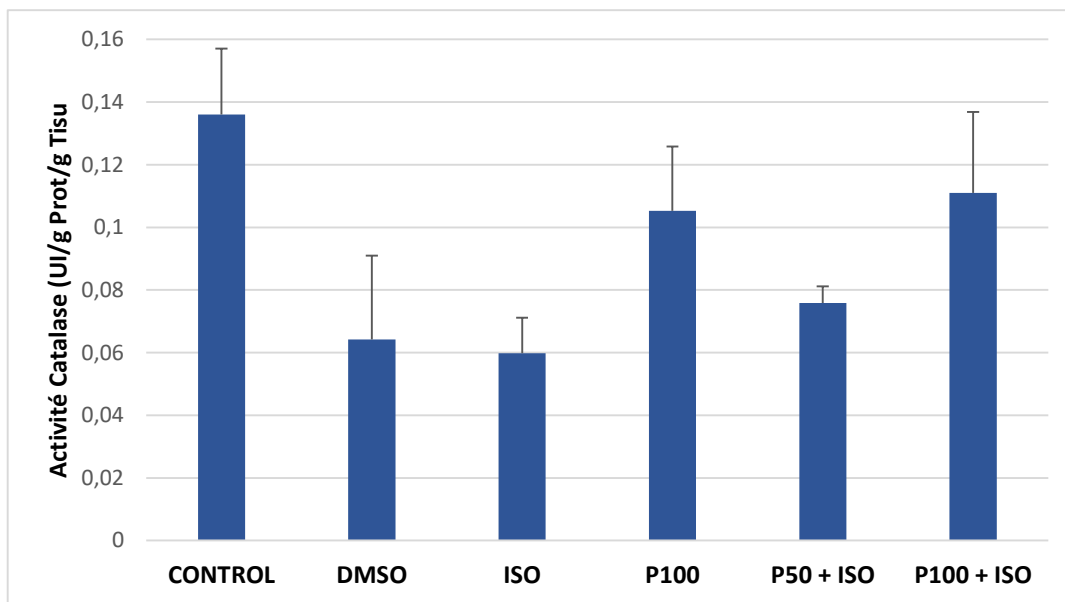


Figure 26: Variation de l'activité de la catalase chez les souris des différents lots.

La catalase (CAT) est une enzyme antioxydante ubiquitaire présente dans les peroxysomes de toutes les cellules, offrant une défense cellulaire contre les atteintes causées par le stress oxydatif en catalysant la réaction de dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène (**Barary et al., 2022**).

Dans notre étude, l'induction de l'IM par l'isoprotérénol a entraîné une réduction de l'activité de la catalase dans le tissu cardiaque, ce résultat concorde avec les résultats obtenus par (**Sahu et al., 2015**), (**Feriani et al., 2020**), (**Karthick and Prince, 2010**) et (**Chattopadhyay et al., 2002**). Cette réduction dans l'activité de la catalase est peut-être due à la production excessive d' $O_2^{\cdot-}$, provoquant ainsi l'inactivation de l'enzyme. L' $O_2^{\cdot-}$ possède une taille suffisamment petite pour accéder aux hèmes de la catalase et pourrait convertir l'enzyme au repos à l'état ferro-oxy (composé III) qui est connu pour être inactif cela indique une accumulation de radicaux superoxydes, causant des dommages au niveau du myocarde (**Chattopadhyay et al., 2002**; **Lobo Filho et al., 2011**).

En outre, le prétraitement avec propolis 100 mg/kg a prévenus la diminution de l'activité de la catalase dans le tissu cardiaque suite à l'administration de l'isoprotérénol. Tandis que le prétraitement par la dose 50 mg/kg de la propolis a laissé un effet préventif moindre que celui de la propolis 100 mg/kg. Ces résultats indiquent que la propolis (100mg/kg) peut aider à

prévenir la réduction de l'activité enzymatique de la catalase. Nos résultats pourraient être due à la capacité de piégeage direct des radicaux libres par les composés phénoliques présents dans la propolis en agissant directement sur la catalase causant ainsi leur activation ou leur expression ou en empêchant toute altération de leur activité due aux radicaux libres (**Lahouel et al., 2011**).

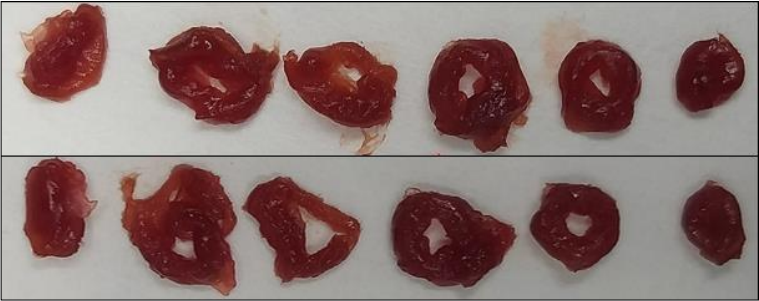
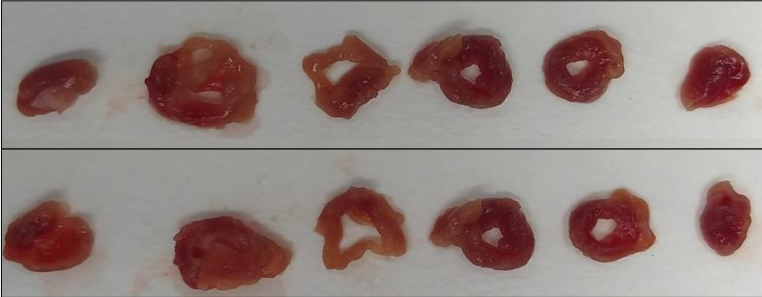
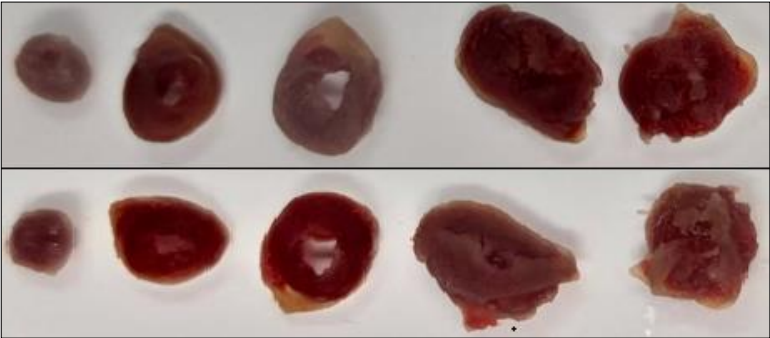
4. Mesure de la taille de l'infarctus

Nous avons essayé la méthode TTC, mais en raison du petit nombre de souris et du manque de temps pour les traiter, nous n'avons pas pu obtenir de résultats pouvant être présentés et discutés et permettant de tirer une conclusion fiable. Cependant, certains de nos résultats sont présentés dans le tableau 6.

Cette méthode a été utilisée comme un paramètre fiable et pertinent pour évaluer la sévérité de l'IM. D'après des résultats obtenus par (**Feriani et al., 2020**), (**Neto et al., 2022**) les rats atteints d'infarctus du myocarde induits par l'isoprotérénol (ISO) représente une zone nécrotiques (tache blanche) par rapport au groupe témoin.

(**Neto et al., 2022**) ont trouvés que le prétraitement orale par la propolis brésilienne rouge a réduit la taille de l'infarctus du myocarde. Et puisque notre propolis possède un pouvoir antioxydant fort dû à leur richesse en polyphénols et a abaissé le niveau des paramètres d'évaluation du stress oxydatif tissulaire, nous supposons qu'il est possible de réduire la taille de l'infarctus du myocarde.

Tableau 6: vue macroscopique du tissu myocardique des différents lots.

Lot	Vue macroscopique
Contrôle	
Isoprotérénol	
P100+ISO	

Conclusion

Conclusion

La présente étude a été menée dans le but d'évaluer l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis algérienne vis-à-vis de l'infarctus du myocarde provoqué chimiquement par l'isoprotérénol.

Nos résultats ont prouvé la toxicité cardiaque liée à l'isoprotérénol et ont démontré que notre propolis avait un effet préventif contre cette toxicité, comme le démontrent les dosages biochimiques et tissulaires. Il était clair que la propolis réduisait les effets de la peroxydation lipidique et améliorait les activités antioxydantes endogènes du myocarde. Cette capacité antioxydante de la propolis conduit à l'amélioration des biomarqueurs cardiaques et à la diminution du taux de LDH et de cholestérol dans le sang.

En outre, la propolis a exercé de meilleurs effets antioxydants sur l'IM grâce à sa richesse en polyphénols et à sa capacité à piéger les radicaux libres, ce qui peut entraîner une amélioration de la fonction cardiaque et atténuer les lésions myocardiques.

Ces résultats ont révélé de nouvelles perspectives dans le développement d'une cible thérapeutique innovante pour la prévention de l'infarctus du myocarde et également l'utilisation de la propolis comme une mesure prophylactique. Reste à dire qu'il serait judicieux de compléter cette étude par :

- Effectuer une étude histologique pour vérifier l'effet de l'EEP sur l'intégrité tissulaire du cœur.
- Effectuer le test TTC pour évaluer quantitativement l'effet de l'EEP sur la taille de l'infarctus du myocarde.
- Prolonger la durée du traitement avec l'EEP, afin de parvenir à une conclusion déterminée concernant l'effet préventif de l'extrait de la propolis sur l'infarctus du myocarde.
- Tester l'effet curatif de l'EEP en l'administrant après avoir provoqué l'IM chez la souris.

Références bibliographiques

- Agbor G.A., Vinson J.A., Donnelly P.E., 2014. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics (IJFS)* 3, 147–156.
- Aguilar Diaz De Leon, J., Borges, C.R., 2020. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *JoVE* 61122. <https://doi.org/10.3791/61122>
- 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. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/5370545>
- Ahn, M.-R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K.-S., Nakayama, T., 2004. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7286–7292. <https://doi.org/10.1021/jf048726s>
- Aimo, A., Castiglione, V., Borrelli, C., Saccaro, L.F., Franzini, M., Masi, S., Emdin, M., Giannoni, A., 2020. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies. *European Journal of Preventive Cardiology* 27, 494–510. <https://doi.org/10.1177/2047487319870344>
- Ainsworth, E.A., Gillespie, K.M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc* 2, 875–877. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>
- AL-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M., 2018. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines* 5, 2. <https://doi.org/10.3390/medicines5010002>
- Alıç, H., Ceylan, Ö., 2020. Antibiofilm, Antioxidant and Quorum Quenching Activities of Propolis Samples from Southwest Anatolia. *BSTD* 12, 49–55. <https://doi.org/10.51458/BSTD.2021.9>
- Allawadhi, P., Khurana, A., Sayed, N., Kumari, P., Godugu, C., 2018. Isoproterenol-induced cardiac ischemia and fibrosis: Plant-based approaches for intervention: Plant-based medicines for ISP-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research* 32, 1908–1932. <https://doi.org/10.1002/ptr.6152>

- Al-Yahya, M., Mothana, R., Al-Said, M., El-Tahir, K., Al-Sohaibani, M., Rafatullah, S., 2013. Citrus medica “Otroj”: Attenuates Oxidative Stress and Cardiac Dysrhythmia in Isoproterenol-Induced Cardiomyopathy in Rats. *Nutrients* 5, 4269–4283. <https://doi.org/10.3390/nu5114269>
- Alyane, M., Kebsa, L.B.W., Boussenane, H., Rouibah, H., Lahouel, M., 2008. Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak. J. Pharm. Sci.*
- Aparadh, V.T., Naik, V.V., Karadge, B.A., 2012. Antioxidative properties (tpc, dpph, frap, metal chelating ability, reducing power and tac) within some cleome species. *Annali di Botanica* 2, 49–56. <https://doi.org/10.4462/annbotrm-9958>
- Araujo, M.A.R., Libério, S.A., Guerra, R.N.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., 2012. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Rev. bras. farmacogn.* 22, 208–219. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000167>
- Ardjmand, A., Shahaboddin, M.E., Mazoochi, T., Ghavipankeh, G., 2019. Ameliorative effects of cerebrolysin against isoproterenol-induced myocardial injury in male rats. *Life Sciences* 227, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.056>
- Awad Hegazy, A., 2022. Myocardial Infarction: Risk Factors, Pathophysiology, Classification, Assessment and Management. *JCRR* 4, 01–11. <https://doi.org/10.31579/2692-9759/056>
- Aydın, Suleyman, Ugur, K., Aydın, Suna, Sahin, İ., Yardim, M., 2019. Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives. *Vasc Health Risk Manag* 15, 1–10. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S166157>
- Bahlil, Y., Krouf, D., Taleb-Dida, N., 2020. Zygophyllum album aqueous extract reduces oxidative damage in erythrocytes and attenuates pro-inflammatory markers in hypercholesterolemic-diabetic rats. *Nutr. Santé* 09, 106–116. <https://doi.org/10.30952/ns.9.2.6>
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C., Pinkas, M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung* 46, 1086–1089.

- 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. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 291, H1329–H1336. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01243.2005>
- Barary, M., Hosseinzadeh, R., Kazemi, S., Liang, J.J., Mansoori, R., Sio, T.T., Hosseini, M., Moghadamnia, A.A., 2022. The effect of propolis on 5-fluorouracil-induced cardiac toxicity in rats. *Sci Rep* 12, 8661. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12735-y>
- Barouki, R., 2006. Stress oxydant et vieillissement. *Med Sci (Paris)* 22, 266–272. <https://doi.org/10.1051/medsci/2006223266>
- Bhattacharya, S., Ahmed, K.K.M., Chakraborty, S., 2011. Free Radicals Cardiovascular Diseases: An Update. *Free Radicals and Antioxidants* 1, 17–22. <https://doi.org/10.5530/ax.2011.1.4>
- Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., Mahomoodally, M.F., 2020. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* 9, 709. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>
- Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J., Lackner, K.J., 2003. Glutathione Peroxidase 1 Activity and Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 349, 1605–1613. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030535>
- Boarescu, P.-M., Chirilă, I., Bulboacă, A.E., Bocşan, I.C., Pop, R.M., Gheban, D., Bolboacă, S.D., 2019. Effects of Curcumin Nanoparticles in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/7847142>
- Boulechfar, S., Zellagui, A., Chemsia, A.E., Bensouici, C., Segueni, N., Lahouel, M., Öztürk, M., Duru, M.E., 2019. Investigation of Antioxidant and Anticholinesterase Potential of Essential Oil and Methanolic Extract of Propolis from Mila Region. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 9, 434–444. <https://doi.org/10.1080/22311866.2019.1703816>

- Braakhuis, A., 2019. Evidence on the Health Benefits of Supplemental Propolis. *Nutrients* 11, 2705. <https://doi.org/10.3390/nu11112705>
- Braik, A., Lahouel, M., Merabet, R., Djebar, M.R., Morin, D., 2019. Myocardial protection by propolis during prolonged hypothermic preservation. *Cryobiology* 88, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.04.003>
- Cardinault, N., Cayeux, M.-O., Percie Du Sert, P., 2012a. La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytothérapie* 10, 298–304. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0733-y>
- Cardinault, N., Cayeux, M.-O., Percie Du Sert, P., 2012b. La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytothérapie* 10, 298–304. <https://doi.org/10.1007/s10298-012-0733-y>
- cdl-el-housseiniCD13.pdf, n.d.
- Chattopadhyay, A., Biswas, S., Sarkar, C., Datta, A.G., 2002. Effect of isoproterenol on lipid peroxidation and antioxidant enzymes of myocardial tissue of mice and protection by quinidine.
- Chavda, V.P., Chaudhari, A.Z., Teli, D., Balar, P., Vora, L., 2023. Propolis and Their Active Constituents for Chronic Diseases. *Biomedicines* 11, 259. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020259>
- Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C., Teissède, P.-L., 2008. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* 6, 75–82. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0293-3>
- Ciumărnean, L., Milaciu, M.V., Negrean, V., Orășan, O.H., Vesa, S.C., Sălăgean, O., Iluț, S., Vlaicu, S.I., 2021. Cardiovascular Risk Factors and Physical Activity for the Prevention of Cardiovascular Diseases in the Elderly. *IJERPH* 19, 207. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010207>
- Csonka, C., Kupai, K., Kocsis, G.F., Novák, G., Fekete, V., Bencsik, P., Csont, T., Ferdinandy, P., 2010. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 61, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.02.014>
- Daleprane, J.B., Abdalla, D.S., 2013. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/175135>
- Debab, M., Toumi-Benali, F., Dif, M.M., 2017. Antioxidant activity of propolis of West Algeria. *Phytothérapie* 15, 230–234. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1085-9>

- Dos Santos, L., Mello, A.F.S., Antonio, E.L., Tucci, P.J.F., 2008. Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications. *Braz J Med Biol Res* 41, 199–201. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2008005000007>
- Dubois-Deruy, E., Peugeot, V., Turkieh, A., Pinet, F., 2020. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants* 9, 864. <https://doi.org/10.3390/antiox9090864>
- Durand, D., Damon, M., Gobert, M., 2013. Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 48, 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.cnd.2013.04.005>
- El-Guendouz, S., Al-Waili, N., Aazza, S., Elamine, Y., Zizi, S., Al-Waili, T., Al-Waili, A., Lyoussi, B., 2017. Antioxidant and diuretic activity of co-administration of Capparis spinosa honey and propolis in comparison to furosemide. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 10, 974–980. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.09.009>
- Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872–879. [https://doi.org/10.1016/s0899-9007\(02\)00916-4](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(02)00916-4)
- Fatehi-Hassanabad, Z., Chan, C.B., Furman, B.L., 2010. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *European Journal of Pharmacology* 636, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.03.048>
- Favier, A., 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique.
- Feriani, A., Khdhiri, E., Tir, M., Elmufti, A., Tlili, N., Hajji, R., Ammar, H., Allouche, N., Abid, S., Ghazouani, L., Mnafigui, K., 2020. (E)-N'-(1-(7-Hydroxy-2-Oxo-2H-Chromen-3-Yl) Ethylidene) Benzohydrazide, a Novel Synthesized Coumarin, Ameliorates Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats through Attenuating Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2020/2432918>
- Fikri, A.M., Sulaeman, A., Marliyati, S.A., Fahrudin, M., 2019. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Stingless Bee Propolis from Indonesia. *Journal of Apicultural Science* 63, 139–147. <https://doi.org/10.2478/jas-2019-0012>

- Flonta, S.E., Arena, S., Pisacane, A., Michieli, P., Bardelli, A., 2009. Expression and Functional Regulation of Myoglobin in Epithelial Cancers. *The American Journal of Pathology* 175, 201–206. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.081124>
- Frangogiannis, N.G., 2015. Pathophysiology of Myocardial Infarction, in: Terjung, R. (Ed.), *Comprehensive Physiology*. Wiley, pp. 1841–1875. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150006>
- Fuentes, E., Moore-Carrasco, R., De Andrade Paes, A.M., Trostchansky, A., 2019. Role of Platelet Activation and Oxidative Stress in the Evolution of Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 24, 509–520. <https://doi.org/10.1177/1074248419861437>
- Gargouri, W., Osés, S.M., Fernández-Muiño, M.A., Sancho, M.T., Kechaou, N., 2019. Evaluation of bioactive compounds and biological activities of Tunisian propolis. *LWT* 111, 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.044>
- Gast, C., Mousny, R., Ray, P., 2015. Les biomarqueurs de l'infarctus du myocarde.
- Gergel', D., Cederbaum, A.I., 1997. Interaction of Nitric Oxide with 2-Thio-5-nitrobenzoic Acid: Implications for the Determination of Free Sulfhydryl Groups by Ellman's Reagent. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 347, 282–288. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0352>
- Ghani, U., 2020. Polyphenols, in: *Alpha-Glucosidase Inhibitors*. Elsevier, pp. 61–100. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102779-0.00003-4>
- Goudable, J., Favier, A., 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 11, 115–120. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(97\)80058-1](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(97)80058-1)
- Greenwald, R.A. (Ed.), 2018. *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gülçin, İ., Bursal, E., Şehitoğlu, M.H., Bilsel, M., Gören, A.C., 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2227–2238. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053>
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P., 2007. [Oxidative stress]. *Rev Med Liege* 62, 628–638.

- Halim, S.A.S.A., Ghafar, N.A., Jubri, Z., Das, S., 2018. Induction of Myocardial Infarction in Experimental Animals: A Review. JCDR. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2018/36997.12221>
- Hamma, S.A., 2016. Biologie des espèces réactives, stress oxydatif et diabète de type 2, 1. Auflage, neue Ausgabe. ed. Éditions universitaires européennes, Saarbrücken.
- Hearse, D.J., Sutherland, F.J., 2000. Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol Res* 41, 597–603. <https://doi.org/10.1006/phrs.1999.0651>
- Ho, E., Karimi Galoughi, K., Liu, C.-C., Bhindi, R., Figtree, G.A., 2013. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 1, 483–491. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>
- Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F.-L., 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules* 19, 19610–19632. <https://doi.org/10.3390/molecules191219610>
- Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y., 2001. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 433–446. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00498-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00498-6)
- Itatani, K. (Ed.), 2015. Advances in hemodynamics research, Cardiology research and clinical developments. Nova Biomedical, New York.
- Itatani, K., Miyazaki, S., Furusawa, T., Numata, S., Yamazaki, S., Morimoto, K., Makino, R., Morichi, H., Nishino, T., Yaku, H., 2017. New imaging tools in cardiovascular medicine: computational fluid dynamics and 4D flow MRI. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 65, 611–621. <https://doi.org/10.1007/s11748-017-0834-5>
- J. Ha l e n g (1), J. Pi n c e m a i l (2), J.O. De f r a i g n e (3), c. c H a r l i e r (4), J.P., 2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 629.
- Jebari-Benslaiman, S., Galicia-García, U., Larrea-Sebal, A., Olaetxea, J.R., Alloza, I., Vandenbroeck, K., Benito-Vicente, A., Martín, C., 2022. Pathophysiology of Atherosclerosis. *IJMS* 23, 3346. <https://doi.org/10.3390/ijms23063346>
- Jeong, S.-Y., Seol, D.-W., 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep* 41, 11–22. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.1.011>

- Jîtcă, G., Fogarasi, E., Ösz, B.-E., Vari, C.E., Fülöp, I., Croitoru, M.D., Ruzs, C.M., Dogaru, M.T., 2021. Profiling the Concentration of Reduced and Oxidized Glutathione in Rat Brain Using HPLC/DAD Chromatographic System. *Molecules* 26, 6590. <https://doi.org/10.3390/molecules26216590>
- Kakimoto, Y., Tsuruyama, T., Miyao, M., Abiru, H., Sumiyoshi, S., Kotani, H., Haga, H., Tamaki, K., 2013. The Effectiveness and Limitations of Triphenyltetrazolium Chloride to Detect Acute Myocardial Infarction at Forensic Autopsy. *American Journal of Forensic Medicine & Pathology* 34, 242–247. <https://doi.org/10.1097/PAF.0b013e31828879cd>
- Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S., 2009. Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 909–915. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.018>
- Karthick, M., Prince, P.S.M., 2010. Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 58, 701–707. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.5.0016>
- Kasiotis, K.M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A., Machera, K., 2017. Revisiting Greek Propolis: Chromatographic Analysis and Antioxidant Activity Study. *PLoS ONE* 12, e0170077. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170077>
- Khalil, P.N., Siebeck, M., Huss, R., Pollhammer, M., Khalil, M.N., Neuhofer, C., Fritz, H., 2006. Histochemical assessment of early myocardial infarction using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride in blood-perfused porcine hearts. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 54, 307–312. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.010>
- Koehlin-Ramonatxo, C., 2006a. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme, Insuffisance respiratoire et nutrition* 20, 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2006.10.178>
- Koehlin-Ramonatxo, C., 2006b. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 20, 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2006.10.178>

- Koleva, I.I., Van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., Groot, A.D., Evstatieva, L.N., 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem. Anal.* 13, 8–17. <https://doi.org/10.1002/pca.611>
- Kowara, M., Cudnoch-Jedrzejewska, A., 2021. Pathophysiology of Atherosclerotic Plaque Development-Contemporary Experience and New Directions in Research. *IJMS* 22, 3513. <https://doi.org/10.3390/ijms22073513>
- Kumar, M., Kasala, E.R., Bodduluru, L.N., Dahiya, V., Sharma, D., Kumar, V., Lahkar, M., 2016. Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 76, 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.03.005>
- Kumar Singh, A., Kumar Jat, R., 2022. Myocardial Infarction. *Himalayan J H Sci* 16–32. <https://doi.org/10.22270/hjhs.v6i4.116>
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004a. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84, 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004b. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84, 329–339. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., Świerczek-Zięba, G., 2013. Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Molecules* 19, 78–101. <https://doi.org/10.3390/molecules19010078>
- Lahouel, M., Amedah, S., Zellagui, A., Touil, A., Rhouati, S., Benyache, F., Leghouchi, E., Bousseboua, H., 2006. The Interaction of New Plant Flavonoids with Rat Liver Mitochondria: Relation between the Anti- and Pro-oxidant Effect and Flavonoids Concentration. *Therapies* 61, 347–355. <https://doi.org/10.2515/therapie:2006025>
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J.P., 2004a. 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. *Pathologie Biologie* 52, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.01.001>
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J.P., 2004b. 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. *Pathologie Biologie* 52, 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.01.001>
- 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. <https://doi.org/10.4103/0971-4065.82131>
- Laskar, R.A., Sk, I., Roy, N., Begum, N.A., 2010. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry* 122, 233–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.068>
- Lebeau, J., Neviere, R., Cotelle, N., 2001. Beneficial effects of different flavonoids, on functional recovery after ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 11, 23–27. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00589-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00589-8)
- Lecerf, J., Luc, G., Fruchart, J., 1994. Vitamine E, antioxydants et athérosclérose. *La Revue de Médecine Interne* 15, 641–649. [https://doi.org/10.1016/S0248-8663\(05\)82178-2](https://doi.org/10.1016/S0248-8663(05)82178-2)
- Lefer, D.J., Granger, D.N., 2000. Oxidative stress and cardiac disease. *The American Journal of Medicine* 109, 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(00\)00467-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00467-8)
- Leifert, W.R., Abeywardena, M.Y., 2008. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutrition Research* 28, 729–737. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.08.007>
- Li, H., Cheng, K., Wong, C., Fan, K., Chen, F., Jiang, Y., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102, 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- Li, J., Zhao, Z., Jiang, H., Jiang, M., Yu, G., Li, X., 2021. Predictive value of elevated alanine aminotransferase for in-hospital mortality in patients with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovascular Disorders* 21, 82. <https://doi.org/10.1186/s12872-021-01903-z>
- Li, X., Yuan, T., Chen, D., Chen, Y., Sun, S., Wang, D., Fang, L., Lu, Y., Du, G., 2018. Cardioprotective Effects of Puerarin-V on Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction Mice Is Associated with Regulation of PPAR- γ /NF- κ B Pathway. *Molecules* 23, 3322. <https://doi.org/10.3390/molecules23123322>
- Lobo Filho, H.G., Ferreira, N.L., Sousa, R.B.D., Carvalho, E.R.D., Lobo, P.L.D., Lobo Filho, J.G., 2011. Modelo experimental de infarto do miocárdio induzido por isoproterenol em

- ratos. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 26, 469–476. <https://doi.org/10.5935/1678-9741.20110024>
- Lu, L., Liu, M., Sun, R., Zheng, Y., Zhang, P., 2015. Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochem Biophys* 72, 865–867. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0553-4>
- Margaill, I., Plotkine, M., Lerouet, D., 2005. Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radical Biology and Medicine* 39, 429–443. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.003>
- Mărghitaș, L.A., Dezmirean, D.S., Bobiș, O., 2013. Important Developments in Romanian Propolis Research. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2013/159392>
- Marieke Mutsaers, Henk van Blitterswijk, Leen van 't Leven, Jaap Kerkvliet, Jan, van de Waerdt, 2005. produits de l'apiculture. Fondation Agromisa et CTA, Wageningen.
- Migdal, C., Serres, M., 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)* 27, 405–412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274017>
- Mnafgui, K., Khdhiri, E., Ghazouani, L., Ncir, M., Zaafour, Z., Allouche, N., Elfeki, A., Ammar, H., Abid, S., Hajji, R., 2021. Anti-embolic and anti-oxidative effects of a novel (E)-4-amino-N'-(1-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl) ethylidene) benzohydrazide against isoproterenol and vitamin-K induced ischemic stroke. *Archives of Physiology and Biochemistry* 127, 527–540. <https://doi.org/10.1080/13813455.2019.1657900>
- Molyneux, P., 2003. The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity 26.
- Mujica, V., Orrego, R., Pérez, J., Romero, P., Ovalle, P., Zúñiga-Hernández, J., Arredondo, M., Leiva, E., 2017. The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2017, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2017/4272940>
- Mulyati, A.H., Sulaeman, A., Marliyati, S.A., Rafi, M., Fikri, A.M., 2020. Phytochemical analysis and antioxidant activities of ethanol extract of stingless bee propolis from Indonesia. Presented at the The 8th international conference of the Indonesian chemical society (ICICS) 2019, Bogor, Indonesia, p. 030014. <https://doi.org/10.1063/5.0005567>

- Mythili, S., Malathi, N., 2015. Diagnostic markers of acute myocardial infarction (Review). *Biomedical Reports* 3, 743–748. <https://doi.org/10.3892/br.2015.500>
- Narayanankutty, A., Job, J.T., Narayanankutty, V., 2019. Glutathione, an Antioxidant Tripeptide: Dual Roles in Carcinogenesis and Chemoprevention. *CPPS* 20, 907–917. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190206130003>
- Ndibualonji, B.B., Maryabo, K., Ngulu, N., Ngoy, K., Kasereka, S., Kyeusi, A., 2017. Étude du métabolisme azote chez la chèvre gestante élevée en milieu tropical, chez le fœtus et au niveau du placenta. *J. App. Bioscience*. 112, 11066. <https://doi.org/10.4314/jab.v112i1.11>
- Nedji, N., Loucif-Ayad, W., 2014. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, 433–437. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60601-0](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60601-0)
- Neto, J.C., Paulino, E.T., Rodrigues, A.K.B.F., Silva, J.C.G.D., Bernardino, A.C., Oliveira, J.M.D.S., Nascimento, T.G.D., Oliveira, W.D.S., Santos, J.C.C., Smaniotto, S., Ribeiro, Ê.A.N., 2022. Cardioprotective effect of hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Phytomedicine Plus* 2, 100190. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100190>
- Oh, J.G., Kho, C., Hajjar, R.J., Ishikawa, K., 2019. Experimental models of cardiac physiology and pathology. *Heart Fail Rev* 24, 601–615. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09769-2>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Patel, D.K., Desai, S.N., Gandhi, H.P., Devkar, R.V., Ramachandran, A.V., 2012. Cardio protective effect of *Coriandrum sativum* L. on isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. *Food and Chemical Toxicology* 50, 3120–3125. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.033>
- Paulino, E.T., Barros Ferreira, A.K., Da Silva, J.C.G., Ferreira Costa, C.D., Smaniotto, S., De Araújo-Júnior, J.X., Silva Júnior, E.F., Bortoluzzi, J.H., Nogueira Ribeiro, Ê.A., 2019. Cardioprotective effects induced by hydroalcoholic extract of leaves of *Alpinia*

- zerumbet on myocardial infarction in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 242, 112037. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112037>
- Peyroux, J., Sternberg, M., 2006. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie Biologie* 54, 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.07.006>
- Philipp, S., Cohen, M.V., Downey, J.M., 2005. Animal models for the study of myocardial protection against ischemia. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2005.08.006>
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.-O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16, 233–239. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(02\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(02)00166-8)
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Popova, M.P., Bankova, V.S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcuzzan, G.L., Sabatini, A.-G., 2007. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie* 38, 306–306. <https://doi.org/10.1051/apido:2007013>
- Przybyłek, I., Karpiński, T.M., 2019. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 24, 2047. <https://doi.org/10.3390/molecules24112047>
- Puteri, M.U., Azmi, N.U., Kato, M., Saputri, F.C., 2022. PCSK9 Promotes Cardiovascular Diseases: Recent Evidence about Its Association with Platelet Activation-Induced Myocardial Infarction. *Life* 12, 190. <https://doi.org/10.3390/life12020190>
- Şahin, B., İlgün, G., 2022. Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries. *Health Soc Care Community* 30, 73–80. <https://doi.org/10.1111/hsc.13156>
- Sahu, B.D., Kuncha, M., Rachamalla, S.S., Sistla, R., 2015. Lagerstroemia speciosa L. Attenuates Apoptosis in Isoproterenol-Induced Cardiotoxic Mice by Inhibiting Oxidative Stress: Possible Role of Nrf2/HO-1. *Cardiovasc Toxicol* 15, 10–22. <https://doi.org/10.1007/s12012-014-9263-1>

- Salas, A.L., Alberto, M.R., Zampini, I.C., Cuello, A.S., Maldonado, L., Ríos, J.L., Schmeda-Hirschmann, G., Isla, M.I., 2016. Biological activities of polyphenols-enriched propolis from Argentina arid regions. *Phytomedicine* 23, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.007>
- Santos, L.M., Fonseca, M.S., Sokolonski, A.R., Deegan, K.R., Araújo, R.P., Umsza-Guez, M.A., Barbosa, J.D., Portela, R.D., Machado, B.A., 2020. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J. Sci. Food Agric.* 100, 1369–1382. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10024>
- Saxena, P., Panjwani, D., 2014. Cardioprotective potential of hydro-alcoholic fruit extract of *Ananas comosus* against isoproterenol induced myocardial infraction in Wistar Albino rats. *Journal of Acute Disease* 3, 228–234. [https://doi.org/10.1016/S2221-6189\(14\)60051-2](https://doi.org/10.1016/S2221-6189(14)60051-2)
- Sforcin, J.M., 2016. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis: Properties and Applications of Propolis. *Phytother. Res.* 30, 894–905. <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>
- Shehata, M.G., Ahmad, F.T., Badr, A.N., Masry, S.H., El-Sohaimy, S.A., 2020. Chemical analysis, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of propolis from different geographic regions. *Annals of Agricultural Sciences* 65, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.aogas.2020.12.001>
- Sies, H., 2020. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants* 9, 852. <https://doi.org/10.3390/antiox9090852>
- Silva, H., Francisco, R., Saraiva, A., Francisco, S., Carrascosa, C., Raposo, A., 2021. The Cardiovascular Therapeutic Potential of Propolis—A Comprehensive Review. *Biology* 10, 27. <https://doi.org/10.3390/biology10010027>
- Srivibulkovit, K., Nouanthavong, S., Sameenoi, Y., 2018. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *ANAL. SCI.* 34, 795–800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>
- Soraya, H., Khorrami, A., Garjani, Afagh, Maleki-Dizaji, N., Garjani, Alireza, 2012. Acute treatment with metformin improves cardiac function following isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Pharmacological Reports* 64, 1476–1484. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70945-3](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70945-3)

- Tariq, M., Al-Badr, A.A., 1985. Isoproterenol, in: Analytical Profiles of Drug Substances. Elsevier, pp. 391–422. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60586-9](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60586-9)
- Taufik, F.F., Natzir, R., Patellongi, I., Santoso, A., Hatta, M., Junita, A.R., Syukri, A., Primaguna, M.R., Dwiyantri, R., Febrianti, A., 2022. In vivo and in vitro inhibition effect of propolis on *Klebsiella pneumoniae* : A review. *Annals of Medicine & Surgery* 81. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.104388>
- Therond, P., 2006. Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 64, 383–389. [https://doi.org/10.1016/S0003-4509\(06\)75333-0](https://doi.org/10.1016/S0003-4509(06)75333-0)
- Tilea, I., Varga, A., Serban, R.C., 2021. Past, Present, and Future of Blood Biomarkers for the Diagnosis of Acute Myocardial Infarction—Promises and Challenges. *Diagnostics* 11, 881. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11050881>
- Tine, D., Fall, A.D., Dieng, S.I.M., Sarr, A., Bassene, E., 2019. Total polyphenol, tannin and flavonoid contents of *Combretum micranthum* leaves harvested in three regions of Senegal: Diass, Sandiara and Essyl. *Int. J. Bio. Chem. Sci* 13, 1817. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v13i3.48>
- Tiwari, R.P., Jain, A., Khan, Z., Kohli, V., Bharmal, R.N., Kartikeyan, S., Bisen, P.S., 2012. Cardiac Troponins I and T: Molecular Markers for Early Diagnosis, Prognosis, and Accurate Triaging of Patients with Acute Myocardial Infarction. *Mol Diagn Ther* 16, 371–381. <https://doi.org/10.1007/s40291-012-0011-6>
- Trpkovic, A., Resanovic, I., Stanimirovic, J., Radak, D., Mousa, S.A., Cenic-Milosevic, D., Jevremovic, D., Isenovic, E.R., 2015. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 52, 70–85. <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.992063>
- Urios, P., Grigorova-Borsoss, A.-M., Peyroux, J., Sternberg, M., 2007. Inhibition de la glycation avancée par les flavonoïdes. Implication nutritionnelle dans la prévention des complications du diabète ? *J. Soc. Biol.* 201, 189–198. <https://doi.org/10.1051/jbio:2007024>
- Velasco, C., 2019. Advanced Imaging Techniques for Cardiovascular Research. Instituto de Salud Carlos III. <https://doi.org/10.4321/repisalud.9027>

- Velikova, M., Bankova, V., Sorkun, K., Houcine, S., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., 2000. Propolis from the Mediterranean Region: Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Zeitschrift für Naturforschung C* 55, 790–793. <https://doi.org/10.1515/znc-2000-9-1019>
- Vogel, B., Claessen, B.E., Arnold, S.V., Chan, D., Cohen, D.J., Giannitsis, E., Gibson, C.M., Goto, S., Katus, H.A., Kerneis, M., Kimura, T., Kunadian, V., Pinto, D.S., Shiomi, H., Spertus, J.A., Steg, P.G., Mehran, R., 2019. ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Primers* 5, 39. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0090-3>
- Vuolo, M.M., Da Silva-Maia, J.K., Batista, Â.G., 2022. The GSH Colorimetric Method as Measurement of Antioxidant Status in Serum and Rodent Tissues, in: Betim Cazarin, C.B. (Ed.), *Basic Protocols in Foods and Nutrition, Methods and Protocols in Food Science*. Springer US, New York, NY, pp. 187–194. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2345-9_12
- Wang, K., Hu, L., Jin, X.-L., Ma, Q.-X., Marcucci, M.C., Netto, A.A.L., Sawaya, A.C.H.F., 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. *Journal of Functional Foods* 19, 464–478. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.009>
- Wang, X., Sankarapandian, K., Cheng, Y., Woo, S.O., Kwon, H.W., Perumalsamy, H., Ahn, Y.-J., 2016. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complement Altern Med* 16, 65. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1043-y>
- Wautier, M.-P., Tessier, F.J., Wautier, J.-L., 2014. Les produits de glycation avancée : un risque pour la santé humaine. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 72, 400–408. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2014.05.002>
- Weitner, T., Inić, S., Jablan, J., Gabričević, M., Domijan, A.-M., 2016. Spectrophotometric Determination of Malondialdehyde in Urine Suitable for Epidemiological Studies. *Croat. Chem. Acta* 89, 133–139. <https://doi.org/10.5562/cca2902>
- Wong, Z.W., Thanikachalam, P.V., Ramamurthy, S., 2017. Molecular understanding of the protective role of natural products on isoproterenol-induced myocardial infarction: A

- review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 94, 1145–1166. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.009>
- Xu, T., Ding, W., Tariq, M.A., Wang, Y., Wan, Q., Li, M., Wang, J., 2018. Molecular mechanism and therapy application of necrosis during myocardial injury. *J Cell Mol Med* 22, 2547–2557. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13575>
- Yang, B., Chen, Y., Shi, J., 2019. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chem. Rev.* 119, 4881–4985. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626>
- Yin, Y., Wang, L., Chen, G., You, H., 2022. Effect of Fraxetin on Oxidative Damage Caused by Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction in Rats. *Appl Biochem Biotechnol* 194, 5666–5679. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04019-y>
- Zaragoza, C., Gomez-Guerrero, C., Martin-Ventura, J.L., Blanco-Colio, L., Lavin, B., Mallavia, B., Tarin, C., Mas, S., Ortiz, A., Egido, J., 2011. Animal Models of Cardiovascular Diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2011/497841>
- Zbadi, R., Mohti, H., Moussaoui, F., 2018. Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales 24.
- Zhong, Y., Shahidi, F., 2015. Methods for the assessment of antioxidant activity in foods11This chapter is reproduced to a large extent from an article in press by the authors in the *Journal of Functional Foods.*, in: *Handbook of Antioxidants for Food Preservation.* Elsevier, pp. 287–333. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-089-7.00012-9>
- Zhu, H., Toan, S., Mui, D., Zhou, H., 2021. Mitochondrial quality surveillance as a therapeutic target in myocardial infarction. *Acta Physiol.* 231. <https://doi.org/10.1111/apha.13590>
- Zullkiflee, N., Taha, H., Usman, A., 2022. Propolis: Its Role and Efficacy in Human Health and Diseases. *Molecules* 27, 6120. <https://doi.org/10.3390/molecules27186120>

Annexes

Annexe 1 : Fiche technique du kit de dosage de la LDH



LDH-L SL

LLSL-0230
LLSL-0400
LLSL-0420

LLSL

R1 4 x 20 mL + R2 4 x 5 mL
R1 2 x 50 mL + R2 1 x 25 mL
R1 4 x 50 mL + R2 2 x 25 mL

PIT-LLSL-4v14 (11/2020)

Français - FR

● **USAGE PRÉVU**

ELITech Clinical Systems LDH-L SL est un réactif de diagnostic in vitro, destiné au dosage quantitatif du lactate déshydrogénase (LDH) dans les échantillons de sérum et de plasma humains sur des automates ou semi-automates.

Ce dispositif de diagnostic in vitro est uniquement destiné aux professionnels.

● **SIGNIFICATION CLINIQUE** (1,4)

La lactate déshydrogénase (LDH) est présente dans de nombreux tissus et plus particulièrement au niveau du myocarde, du foie, des reins, des muscles squelettiques et des érythrocytes. C'est un tétramère présent dans le sérum sous forme de cinq isoenzymes principales.

Le taux en LDH total augmente en cas d'infarctus du myocarde, de pathologies hépatiques (hépatite virale, cirrhose), d'anémie (hémolytique, mégaloblastique), de certains cancers et lors de toute maladie induisant des dommages tissulaires. Par conséquent, une élévation de la LDH n'est pas spécifique.

Le dosage de la LDH est indiqué pour l'aide au diagnostic des dommages tissulaires dans l'organisme et parfois pour l'aide au suivi de l'évolution de certaines pathologies.

● **LIMITE D'UTILISATION**

Le dosage du lactate déshydrogénase (LDH) ne peut être utilisé seul pour diagnostiquer une maladie ou une pathologie spécifique. Les résultats doivent toujours être confrontés aux résultats d'autres tests diagnostiques, aux examens cliniques, et à l'histoire médicale du patient.

● **MÉTHODE & PRINCIPE** (4)

Méthode IFCC - Cinétique.

● **COMPOSITION**

Réactif 1 : R1

N-Méthyl-D-Glucamine pH 9,4 (37 °C)

L-Lactate de lithium 68 mmol/L

Acide de sodium < 0,1 % (p/p)

Réactif 2 : R2

NAD 50 mmol/L

● **MATÉRIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS**

- CALI-0590 ELICAL 2

- CONT-0060 ELITROL I

- CONT-0160 ELITROL II

- Solution saline normale (NaCl 9 g/L)

- Automates ou semi-automates

- Équipement général de laboratoire (ex. pipette).

- Ne pas utiliser de matériel ne figurant pas ci-dessus.

● **PRÉCAUTIONS D'EMPLOI ET MISES EN GARDE**

- Consulter la fiche de données de sécurité (FDS) pour une manipulation appropriée.

- Le réactif R1 contient de l'acide de sodium qui peut réagir avec le plomb ou le cuivre et former des azides métalliques potentiellement explosifs. Lors de l'élimination de ces réactifs toujours rincer abondamment avec de l'eau pour éviter l'accumulation d'azides.

- Respecter les précautions d'usage et les bonnes pratiques de laboratoire.

- Utiliser du matériel de laboratoire propre ou à usage unique afin d'éviter toute contamination.

- Ne pas échanger les flacons réactifs de différents kits.

● **STABILITÉ**

Stocké à 2-8 °C et à l'abri de la lumière. Ne pas congeler.

Ne pas utiliser après la date d'expiration indiquée sur les étiquettes des flacons.

Stabilité à bord :
La stabilité à bord est spécifique à chaque automate. (Se référer au § PERFORMANCES).

● **PRÉPARATION**

Le réactif est prêt à l'emploi.

● **DÉTÉRIORATION DU PRODUIT**

- Le produit doit être limpide. Tout trouble serait le signe d'une détérioration du produit.

- Ne pas utiliser le produit s'il y a des signes évidents de contamination ou de détérioration (ex. : particules).

- Un flacon endommagé peut avoir un impact sur les performances du produit. Ne pas utiliser le produit si les flacons présentent des signes physiques de détérioration (par exemple, fuite, flacon percé).

● **ÉCHANTILLONS**

Echantillons requis (1,4,9)

- Sérum

- Plasma (héparine de lithium).

- L'utilisation de toute autre type d'échantillon doit être validée par le laboratoire.

● **AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS**

Les échantillons ne doivent pas être hémolysés. (1,4)
Les échantillons doivent être séparés des cellules rapidement (la présence de cellules peut faussement augmenter le résultat). (1,4)

Les échantillons doivent être prélevés selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire et les guides appropriés qui sont mis en place.

● **STOCKAGE ET STABILITÉ** (4)

- 7 jours à température ambiante

- 4 jours à 2-8 °C

- 6 semaines à -20 °C

Dans certaines pathologies pour lesquelles les isoenzymes LDH-4 et LDH-5 sont augmentées, il est préférable de stocker les échantillons à température ambiante, ces isoenzymes étant sensibles au froid. (2)

● **VALEURS DE RÉFÉRENCE** (2,3)Sérum/plasma U/L μ kat/L

Adultes 125 - 220 2,08 - 3,67

Des concentrations plus importantes sont observées chez les enfants et les nouveau-nés.

Remarque : Les valeurs ci-dessus ne sont données qu'à titre indicatif. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir et de maintenir ses propres valeurs de référence par rapport à la population visée.

● **PROCÉDURE**● **Procédure manuelle**

Longueur d'onde : 340 nm

Trajet optique : 1 cm

Ratio échantillon/réactif : 1:26

Température : 37 °C

Lire contre le blanc réactif.

	BILANC	DOSAGE
Réactif R1	1000 μ L	1000 μ L
Eau distillée	35 μ L	-
Echantillon	-	35 μ L

Mélanger, attendre 3 minutes et puis ajouter :

Réactif R2	250 μ L	250 μ L
------------	-------------	-------------

Mélanger et après 100 secondes d'incubation, lire l'absorbance toutes les minutes pendant 3 minutes.

Mesurer la variation d'absorbance par minute ($\Delta A/min$).

Procédure sur automate
Ces réactifs peuvent être utilisés sur différents automates. Pour les automates ELITech Selectra, les applications validées sont disponibles sur demande. Avec le logiciel Selectra TouchPro, utilisez l'application incluse dans le code barre disponible à la fin de cette notice.

● **CALCUL**Activité (U/L) = $\Delta A/min \times 5 \times 828$ Facteur de conversion : U/L $\times 0,0167$ = μ kat/L● **CALIBRATION**

ELICAL 2 est traçable par rapport à la méthode IFCC.

Fréquence de calibration : La fréquence de calibration est spécifique à chaque automate (se référer au § PERFORMANCES).

● **CONTRÔLE QUALITÉ**

Il est recommandé d'utiliser des sérums de contrôle tels que ELITROL I et ELITROL II pour surveiller les performances du dosage.

Ces contrôles doivent être effectués :

- avant que les échantillons de patients soient testés,

- au moins une fois par jour,

- après chaque calibration,

- et/ou en accord avec les requis du laboratoire et des exigences réglementaires.

Les résultats doivent être dans les intervalles définis. Si les valeurs se situent en dehors des plages définies, chaque laboratoire devra prendre les mesures correctives nécessaires.

● **TRAITEMENT DES DÉCHETS**

L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux exigences réglementaires locales, d'état et fédérales (veuillez vous référer à la fiche de données de sécurité (FDS)).

● **PERFORMANCES**

Les performances ont été obtenues sur l'automate Selectra ProM, en suivant les recommandations CLSI, dans des conditions environnementales contrôlées.

● **Domaine de mesure**50 - 800 U/L (0,83 - 13,33 μ kat/L)

Les échantillons ayant des concentrations supérieures doivent être dilués au 1/10 dans une solution de NaCl 9 g/L et redosés. Cette procédure étend le domaine de mesure jusqu'à 8000 U/L (133,33 μ kat/L).

Ne pas communiquer de résultats en dehors du domaine de mesure étendu.

Pour les utilisateurs du logiciel Selectra TouchPro, la fonction « diluer » réalise la dilution des échantillons automatiquement. Les résultats tiennent compte de la dilution.

● **Limite de Détection (LoD) et Limite de Quantification (LoQ)**LoD = 4 U/L (0,07 μ kat/L)LoQ = 10 U/L (0,17 μ kat/L)● **Précision**

Les données d'imprécision ont été obtenues sur 2 automates Selectra ProM sur 20 jours (2 routines par jour, tests effectués en double).

Des résultats représentatifs sont présentés ci-dessous :

	n	Moyenne		Intra-série	Total
		U/L	μ kat/L		
Niveau 1	80	168	2,80	0,7	4,1
Niveau 2	80	309	5,15	0,7	2,8
Niveau 3	80	712	11,87	0,5	3,0

● **Corrélation**

Une étude comparative a été réalisée entre le réactif LDH-L SL sur un automate Selectra ProM et un système similaire disponible sur le marché sur 99 échantillons sériques.

Les concentrations des échantillons s'échelonnent de 45 à 780 U/L (0,75 - 13,00 μ kat/L).

Les résultats sont les suivants :

Coefficient de corrélation : (r) = 0,997

Droite de régression : $y = 1,010x + 3 \text{ U/L } (0,05 \mu\text{kat/L})$.

● **Limitations/Interférences**

- L'utilisation d'échantillons hémolysés peut induire une surestimation du résultat en raison de la forte teneur en LDH provenant des érythrocytes. (1,4)

- Des tests ont été réalisés pour déterminer le niveau d'interférence de différents composés.

Les niveaux suivants de lactate déshydrogénase (LDH) ont été testés : 200 U/L et 700 U/L.

L'absence d'interférence significative est définie par un recouvrement $\geq 10\%$ de la valeur initiale.

Bilirubine non-conjuguée : Aucune interférence significative jusqu'à 30,0 mg/dL (513 μ mol/L).

Bilirubine conjuguée : Aucune interférence significative jusqu'à 29,5 mg/dL (505 μ mol/L).

Triphosphides : Aucune interférence significative jusqu'à 3146 mg/dL (35,6 mmol/L).

Acide ascorbique : Aucune interférence significative jusqu'à 20,0 mg/dL.

Acide acétylsalicylique : Aucune interférence significative jusqu'à 200 mg/dL.

Acétaminophène : Aucune interférence significative jusqu'à 30 mg/dL.

- Dans des cas très rares, les gammopathies monoclonales (myélome multiple), en particulier de type IgM (Macroglobulinémie de Waldenström) peuvent être à l'origine de résultats peu fiables. (8)

- D'autres substances et médicaments peuvent interférer. Certains d'entre eux sont répertoriés dans les revues publiées par Young. (14)

- Stabilité à bord / fréquence de calibration

Stabilité à bord : 28 jours

Fréquence de calibration : 6 jours

Une nouvelle calibration doit être effectuée après chaque changement de lot de réactif, lorsque les résultats du ou des contrôles de qualité sont hors de l'intervalle établi, et après une opération de maintenance.

Ces performances ont été définies sur un automate ELITech Selectra ProM. Les résultats peuvent varier si le réactif est utilisé sur un automate différent ou en méthode manuelle.

Les performances obtenues à partir d'applications non validées par ELITech ne peuvent être garanties et doivent être définies par l'utilisateur.

● **DECLARATION DES INCIDENTS GRAVES**

Veuillez notifier au fabricant (par l'intermédiaire de votre distributeur) et à l'autorité compétente de l'état membre de l'union européenne dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi, les cas d'incident grave survenu en lien avec le dispositif.

Pour les autres juridictions, la déclaration d'incident grave doit être effectuée conformément aux exigences réglementaires locales, d'état et fédérales.

En signalant les incidents graves, vous contribuez à fournir davantage d'informations sur la sécurité des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro.

● **ASSISTANCE TECHNIQUE**

Contactez votre distributeur local ou ELITech Clinical Systems SAS (CSupport@elitechgroup.com).

● **English - EN**● **INTENDED USE**

ELITech Clinical Systems LDH-L SL is an in vitro diagnostic reagent intended for the quantitative determination of Lactate dehydrogenase (LDH) in human serum and plasma samples on analyzers or semi-automatic analyzers.

This in vitro diagnostic device is for professional use only.

● **CLINICAL SIGNIFICANCE** (1-3)

Lactate dehydrogenase (LDH) can be found in nearly all cells of the body with highest activities in myocardium, liver, kidneys, skeletal muscles and erythrocytes. It is a tetramer present in the serum in the form of five main isoenzymes.

LDH increases in case of acute myocardial infarction, hepatic disorders (viral hepatitis, cirrhosis), anemia (hemolytic, megaloblastic), some cancers and in all diseases involving tissue damage. Consequently, elevations of LDH in the serum are nonspecific.

LDH measurement is indicated to help diagnose tissue damage in the body and sometimes to help monitor the progress of some pathologies.

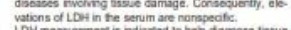
● **LIMITATION OF USE**

The quantitative assay of Lactate dehydrogenase (LDH) alone can not be used to diagnose a disease or a specific pathology.

The results must be interpreted in conjunction with other diagnostic test results, clinical findings and the patient's medical history.

● **METHOD & PRINCIPLE** (4)

IFCC method - Kinetic.

● **COMPOSITION**

Reagent 1: R1
N-Methyl-D-Glucamine pH 9,4 (37 °C)

Lithium L-Lactate 68 mmol/L

Sodium azide < 0,1 % (p/w)

Reagent 2: R2

NAD 50 mmol/L

● **MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- CALI-0590 ELICAL 2

- CONT-0060 ELITROL I

- CONT-0160 ELITROL II

- Normal saline solution (NaCl 9 g/L)

- Analyzers or semi-automatic analyzers.

- General Laboratory equipment (e.g. pipette).

- Do not use materials that are not required as indicated above.

● **PRECAUTIONS FOR USE AND WARNINGS**

- Consult Safety Data Sheet (SDS) for a proper handling.

- Reagent R1 contains sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. When disposing of these reagents always flush with copious amounts of water to prevent azide buildup.

- Take normal precautions and adhere to good laboratory practice.

- Use clean or single use laboratory equipment only to avoid contamination.

- Do not interchange reagent vials from different kits.

● **STABILITY**

Store at 2-8 °C and protect from light. Do not freeze. Do not use after expiration dates indicated on the vial labels.

On board stability :
The on-board stability is specific for each analyzer. (Refer to § PERFORMANCE DATA).

PREPARATION

The reagent is ready to use.

PRODUCT DETERIORATION

- The product should be clear. Cloudiness would indicate deterioration.
- Do not use the product if there is visible evidence of contamination or damage (e.g. particle matter).
- Damage to the product container may impact on product performance. Do not use the product if there is physical evidence of deterioration (e.g. leakage or punctured container).

SAMPLES

Specimen (14)

- Serum
- Plasma (lithium heparin)
- Using any other specimen type should be validated by the laboratory.

Warnings and precautions

Samples must be free from hemolysis (15). Samples must be separated from cells and clot promptly (the presence of cells can falsely increase the result) (16).

Samples should be collected in accordance with Good Laboratory Practice and appropriate guidelines that may be in place.

Storage and stability (16)

- 7 days at room temperature
- 4 days at 2-8°C
- 6 weeks at -20°C
- In some pathologies involving LDH-4 or LDH-5 isoenzyme increase, it is preferred to store the samples at room temperature, these isoenzymes being sensitive to cold (16)

REFERENCE VALUES (21)

Serum/plasma	U/L	µkat/L
Adults	125 - 220	2.08 - 3.67

Higher concentrations are observed in children and newborn.

Note: The quoted range should serve as a guide only, it is recommended that each laboratory verifies this range or establishes a reference interval for the intended population.

PROCEDURE

Manual Procedure

Wavelength: 340 nm
Optical path: 1 cm
Sample/ Reagent ratio: 1:36
Temperature: 37 °C
Read against reagent blank.

	BLANK	SAMPLE
Reagent R1	1000 µL	1000 µL
Distilled water	35 µL	-
Sample	-	35 µL

Mix, wait 3 minutes and add:

Reagent R2	250 µL	250 µL
------------	--------	--------

Mix and after a 100 second incubation, read absorbance at 1 minute intervals during 3 minutes. Calculate the change of absorbance per minute (ΔA/min).

Automatic Procedure

These reagents may be used on several automatic analyzers. For ELTech Selectra Analyzers, validated applications are available on request. For Selectra TouchPro software, use the application included in the barcode available at the end of this insert.

CALCULATION

Activity (U/L) = ΔA/min x 5828

Conversion factor: U/L x 0.0167 = µkat/L

CALIBRATION

ELICAL 2 is traceable to IFCC reference method.

Calibration frequency: The calibration is specific for each analyzer. (Refer to § PERFORMANCE DATA).

QUALITY CONTROL

It is recommended that quality control sera such as ELITROL 1 and ELITROL II be used to monitor the performance of the assay.

- Controls have to be performed:
- prior to assaying patient samples,
- at least once per day,
- after every calibration,
- and/or in accordance with laboratory and regulatory requirements.

Results should be within the defined ranges. If values fall outside of the defined ranges, each laboratory should take necessary corrective measures.

WASTE MANAGEMENT

Disposal of all waste material should be in accordance with local, state and federal regulatory requirements (please refer to the Safety Data Sheet (SDS)).

PERFORMANCES

Performances were obtained on Selectra ProM, following CLSI technical recommendations, under controlled environmental conditions.

- Measuring range

50 - 800 U/L (0.83 - 13.33 µkat/L)
Samples having greater concentrations should be diluted 1:10 with NaCl 9 g/L solution and re-assayed. This procedure extends the measuring range up to 8000 U/L (133.33 µkat/L).

Do not report results outside this extended range.

For users with Selectra TouchPro software, the «dilute» function performs the sample dilution automatically. Results take the dilution into account.

Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantification (LoQ)

LoD = 4 U/L (0.07 µkat/L)

LoQ = 10 U/L (0.17 µkat/L)

- Precision

Imprecision data has been obtained on 2 Selectra ProM analyzers over 20 days (2 runs per day, tests performed in duplicate).

Representative results are presented below.

	n	Mean		Within-run		Total
		U/L	µkat/L	CV (%)	CV (%)	
Level 1	80	168	2.80	0.7	4.1	
Level 2	80	309	5.15	0.7	2.8	
Level 3	80	712	11.87	0.5	3.0	

- Correlation

A comparative study has been performed between LDH-L SL reagent on a Selectra ProM analyzer and a similar commercially available system on 99 human serum samples.

The sample concentrations ranged from 45 to 780 U/L (0.75 - 13.00 µkat/L).

The results are as follows:

Correlation coefficient: (r) = 0.997

Linear regression: y = 1.010 x + 3 U/L (0.05 µkat/L)

Limitations/interferences

- Hemolyzed samples should not be used since significant hemolysis may lead to falsely increased results due to high levels of LDH originating from erythrocytes (14).

- Studies have been performed to determine the level of interference from different compounds. The following Lactate dehydrogenase (LDH) levels were tested: 200 U/L and 700 U/L. No significant interference is defined by a recovery ≤±10% of the initial value.

Unconjugated bilirubin: No significant interference up to 30.0 mg/dL (513 µmol/L).

Conjugated bilirubin: No significant interference up to 29.5 mg/dL (505 µmol/L).

Urobilinogen: No significant interference up to 3146 mg/dL (35.6 mmol/L).

Ascorbic acid: No significant interference up to 20.0 mg/dL.

Acetylsalicylic Acid: No significant interference up to 200 mg/dL.

Acetaminophen: No significant interference up to 30 mg/dL.

- In very rare cases, monoclonal gammopathies (multiple myeloma), in particular IgM type (Waldenström's macroglobulinemia) can cause unreliable results (14).

- Many other substances and drugs may interfere. Some of them are listed in reviews published by Young (14).

- On board stability/Calibration frequency
On Board Stability: 28 days
Calibration frequency: 8 days

Recalibrate when reagent lots change, when quality control results fall outside the established range and after a maintenance operation.

These performances have been obtained using ELTech Selectra ProM analyzer. Results may vary if a different instrument or a manual procedure is used.

The performances of applications not validated by ELTech are not warranted and must be defined by the user.

DECLARATION OF SERIOUS INCIDENT

Please notify the manufacturer (through your distributor) and competent authority of the Member State of the European Union in which the user and/or the patient is established, of any serious incident that has occurred in relation to the device. For other jurisdictions, the declaration of serious incident should be in accordance with local, state and federal regulatory requirements.

By reporting a serious incident, you provide information that can contribute to the safety of in vitro medical devices.

TECHNICAL ASSISTANCE

Contact your local distributor or ELTech Clinical Systems SAs (CSsupport@eltechgroup.com).

Español - ES

USO PREVISTO

ELTech Clinical Systems LDH-L SL es un reactivo de diagnóstico in vitro diseñado para la determinación cuantitativa de la lactato deshidrogenasa (LDH) en muestras de suero y plasma humanos en equipos automatizados o equipos semiautomáticos. Este dispositivo de diagnóstico in vitro está diseñado únicamente para los profesionales.

SIGNIFICADO CLÍNICO (14-16)

La lactato deshidrogenasa (LDH) está presente en numerosos tejidos y más particularmente en el miocardio, el hígado, los riñones, los músculos esqueléticos y los eritrocitos. Es un tetrámero presente en el suero en forma de cinco isoenzimas principales.

El alza de LDH total aumenta en caso de infarto de miocardio, patologías hepáticas (hepatitis viral, cirrosis), anemia (hemolítica, megaloblástica), ciertos cánceres y durante cualquier enfermedad que induzca daño tisular. Por lo tanto, la elevación de LDH no es específica.

La cuantificación de LDH sérica para ayudar en el diagnóstico de daño tisular en el cuerpo y, a veces, para ayudar a seguir la evolución de ciertas patologías.

LÍMITE DE UTILIZACIÓN

La cuantificación de la lactato deshidrogenasa (LDH) no puede ser utilizado solo para diagnosticar una enfermedad o patología específica.

Los resultados siempre deben compararse con los resultados de otras pruebas de diagnóstico, exámenes clínicos y el historial médico del paciente.

MÉTODO & PRINCIPIO (16)

Método IFCC - Cinético



COMPOSICIÓN

- Reactivo 1: R1**
N-Metil-D-Glucamino pH 9.4 (37 °C)
L-Lactato de litio 68 mmol/L
Azida sódica < 0.1 % (p/p)
- Reactivo 2: R2**
NAD 50 mmol/L

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS

- CALI-0550 ELICAL 2
- CONT-0060 ELITROL I
- CONT-0160 ELITROL II
- Solución salina normal (NaCl 9 g/L)
- Equipos automatizados o equipos semiautomáticos.
- Equipamiento general de laboratorio (p. ej. pipeta).
- No utilice materiales que no se requieren, tal como se indica anteriormente.

PRECAUCIONES DE USO Y ADVERTENCIAS

- Consulte la Hoja de Datos de Seguridad (SDS) para un manejo adecuado.

- El reactivo R1 contiene azida sódica que puede reaccionar con el plomo o el cobre de la tubería y formar potencialmente azidas metálicas explosivas. Cuando se elimine el reactivo enjuague con agua abundantemente para prevenir la acumulación de azidas.

- Tome las precauciones normales y respete las buenas prácticas de laboratorio.

- Para evitar contaminación utilizar equipo nuevo o completamente limpio.

- No intercambie los frascos de reactivos de diferentes kits.

ESTABILIDAD

Conservar a 2-8 °C y protegidos de la luz. No congelar.

- No utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de los frascos.

Estabilidad en el equipo:

La estabilidad es específica para cada equipo. (Referirse al § DATOS DE RENDIMIENTO).

PREPARACIÓN

El reactivo está listo para su uso.

DETERIORACIÓN DEL PRODUCTO

- El producto debe ser claro. Turbidez indicaría deterioro.

- No utilice el producto si este presenta signos evidentes de contaminación o deterioro (p. ej. partículas).

- Un frasco dañado puede tener un impacto en el rendimiento del producto. No utilice el producto si este tiene signos físicos de deterioro (p. ej. fugas, frasco perforado).

MUESTRAS

Muestras requeridas (14)

- Suero.
- Plasma heparina de litio.

- El uso de cualquier otro tipo de muestra debe ser validado por el laboratorio.

Advertencias y precauciones

Las muestras no deben ser hemolizadas. (14)

Las muestras deben separarse de las células rápidamente (la presencia de células puede aumentar falsamente el resultado) (14)

Las muestras deben tomarse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio y las guías apropiadas establecidas.

Conservación y estabilidad (16)

- 7 días a temperatura ambiente.

- 4 días a 2-8 °C

- 6 semanas a -20 °C

En ciertas patologías en las cuales se incrementan las isoenzimas LDH-4 y LDH-5, se recomienda almacenar las muestras a temperatura ambiente, ya que estas isoenzimas son sensibles al frío (16)

VALORES DE REFERENCIA (14-16)

Suero/plasma	U/L	µkat/L
Adultos	125 - 220	2.08 - 3.67

Se observan concentraciones mayores en niños y recién nacidos.

Note: Los valores anteriores son solo indicativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca y mantenga sus propios valores de referencia en relación con la población destinataria.

PROCEDIMIENTO

Procedimiento manual

Longitud de onda: 340 nm
Trayectoria óptica: 1 cm
Ratío muestra/reactivo: 1:36
Temperatura: 37 °C
Leer contra blanco reactivo

	BLANK	PRUEBA
Reactivo R1	1000 µL	1000 µL
Agua destilada	35 µL	-
Muestra	-	35 µL

Mezclar, espera 3 minutos y luego añadir:

Reactivo R2	250 µL	250 µL
-------------	--------	--------

Mezclar después de incubación 100 segundos, leer la absorbancia a intervalos de 1 minuto durante 3 minutos. Calcule el cambio de absorbancia por minuto (ΔA/min).

Procedimiento automático

Estos reactivos pueden ser utilizados en varios equipos. Para los equipos ELTech Selectra, las aplicaciones validadas están disponibles sobre pedido. Para el software Selectra TouchPro, use la aplicación incluida en el código de barras disponible al final de este inserto.

CÁLCULO

Actividad (U/L) = ΔA/min x 5 828

Factor de conversión: U/L x 0.0167 = µkat/L

CALIBRACIÓN

ELICAL 2 es trazable al método de referencia IFCC.

Frecuencia de calibración: la frecuencia de calibración es específica para cada equipo (referirse al § DATOS DE RENDIMIENTO).

CONTROL DE CALIDAD

Es recomendado que sueros de control tales como ELITROL I y ELITROL II sean usados para monitorear el rendimiento de las pruebas.

Los controles deben realizarse:

- antes que las muestras del paciente sean evaluadas,

- por lo menos una vez al día,

- después de cada calibración,

- y/o en acuerdo con el laboratorio y los requerimientos regulatorios.

Los resultados deben de encontrarse en el rango definido. Si los valores se encuentran fuera del mismo, cada laboratorio deberá tomar las medidas correctivas necesarias.

TRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS

Todos los materiales de desecho deben eliminarse de acuerdo con los requisitos regulatorios locales, estatales y federales. (diríjase a la hoja de seguridad (SDS)).

RENDIMIENTO

El rendimiento fue obtenido en un Selectra ProM, siguiendo las recomendaciones técnicas del CLSI, bajo condiciones ambientales controladas.

- Rango analítico

50 - 800 U/L (0.83 - 13.33 µkat/L)

Las muestras que tengan concentraciones mayores deben diluirse 1:10 con una solución de NaCl 9 g/L y volver a analizarlas.

Este procedimiento extiende el rango analítico hasta 8000 U/L (133.33 µkat/L).

No tome en cuenta resultados fuera del rango analítico extendido.

Para los usuarios del software Selectra TouchPro, la función «dilute» realiza la dilución de las muestras automáticamente. Los resultados toman en cuenta la dilución.

- Limite de detección (LoD), limite de Cuantificación (LoQ)

LoD = 4 U/L (0,07 µkat/L)
LoQ = 10 U/L (0,17 µkat/L)

- Precisión

Los datos de precisión fueron obtenidos en 2 equipos Selecta ProM durante 20 días (2 corridas por día, pruebas efectuadas en duplicado).

Resultados representativos se presentan a continuación.

	n	Media	Intra-série	Total
		U/L	µkat/L	CV (%)
Nivel 1	80	168	2,80	0,7 4,1
Nivel 2	80	309	5,15	0,7 2,8
Nivel 3	80	712	11,87	0,5 3,0

- Correlación

Un estudio comparativo se llevó a cabo entre el reactivo LDH-L, SL en el equipo Selecta ProM y un sistema comercial similar en 99 muestras séricas. Las concentraciones de las muestras se encuentran entre 45 y 750 U/L (0,75 - 13,05 µkat/L). Los resultados son los siguientes:
Coeficiente de correlación: (r) = 0,997
Regresión lineal: y = 1,010 x + 3 U/L (0,05 µkat/L).

• Limitaciones/interferencias

- El uso de muestras hemolizadas puede subestimar el resultado debido al alto contenido de LDH de los eritrocitos.^{1, 2}

- Estudios fueron llevados a cabo para determinar el nivel de interferencia de diferentes componentes. Los niveles superiores de lactato deshidrogenasa (LDH) fueron probados: 200 U/L y 750 U/L. Definimos una interferencia no significativa cuando se obtiene una recuperación de $\pm 10\%$ con respecto al valor inicial.
Hemolina no conjugada: No hay interferencia significativa hasta 30,0 mg/dL (513 µmol/L).
Hemolina conjugada: No hay interferencia significativa hasta 29,5 mg/dL (505 µmol/L).
Triglicéridos: No hay interferencia significativa hasta 3146 mg/dL (35,8 mmol/L).
Acido ascórbico: No hay interferencia significativa hasta 20,0 mg/dL.
Acido acetilsalicílico: No hay interferencia significativa hasta 200 mg/dL.
Galactosidasa: No hay interferencia significativa hasta 30 mg/dL.

- En casos muy raros, las gamopatas monoclonales (mieloma múltiple), en particular el tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström) pueden producir resultados poco confiables.³

- Muchas otras sustancias y fármacos pueden interferir. Algunos de estos están listados en los artículos publicados por Young.^{3, 4}

- **Estabilidad en el equipo / frecuencia de calibración**
Estabilidad en el equipo: 28 días
Frecuencia de calibración: 6 días
Recalcular cuando los lotes de reactivo cambian, cuando los controles de calidad no se encuentran dentro del rango establecido, y después de operaciones de mantenimiento.

El rendimiento se ha obtenido utilizando el equipo ELiTech Selecta ProM. Los resultados pueden variar si se utiliza un instrumento diferente o un procedimiento manual.
El rendimiento obtenido a partir de aplicaciones no validadas por ELiTech no se garantiza y deben ser definidos por el usuario.

• DECLARACIÓN DE INCIDENTES GRAVES

Por favor notifique al fabricante (por medio de su distribuidor) y autoridad competente del Estado miembro de la Unión Europea en donde el usuario o paciente radique, de cualquier incidente grave que se produzca con relación al dispositivo. Para otras jurisdicciones, la declaración de incidentes graves debe realizarse de acuerdo con los requisitos regulatorios locales, estatales y federales. Reportando incidentes graves usted contribuye a proporcionar más información sobre la seguridad del dispositivo médico de diagnóstico in vitro.

• ASISTENCIA TÉCNICA

Contacte a su distribuidor local o con ELiTech Clinical Systems SAS (CCSupport@elitechgroup.com)

Português – PT

• UTILIZAÇÃO PREVISTA

ELiTech Clinical Systems LDH4, SL é um reagente para diagnóstico in vitro destinado à determinação quantitativa do lactato desidrogenase (LDH) em amostras de soro e plasma humanos em analisadores automáticos ou semi-automáticos. Este dispositivo de diagnóstico in vitro é apenas para uso profissional.

• SIGNIFICADO CLÍNICO ^(1, 2)

A lactato desidrogenase (LDH) pode ser encontrada em quase todas as células do corpo com atividades mais altas no miocárdio, fígado, rim, músculos esqueléticos e eritócitos. É um tetramero presente no soro na forma de cinco isoenzimas principais. A LDH aumenta em caso de infarto agudo do miocárdio, distúrbios hepáticos (hepatite viral, cirrose), anemia (hemolítica, megaloblástica), alguns tipos de câncer e em todas as doenças que envolvem danos nos tecidos. Consequentemente, elevações de LDH no soro são inespecíficas. A medição de LDH é indicada para ajudar a diagnosticar danos nos tecidos do corpo e, às vezes, para ajudar a monitorar o progresso de algumas patologias.

• LIMITAÇÃO DE USO

O ensaio quantitativo de lactato desidrogenase (LDH) sozinho não pode ser usado para diagnosticar uma doença ou uma patologia específica. Os resultados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados de testes de diagnóstico, achados clínicos e histórico médico do paciente.

• MÉTODO & PRINCÍPIO ⁽⁴⁾

Método IFCC - Cinético.
LDH
L-lactato + NAD⁺ → Piruvato + NADH + H⁺

• COMPOSIÇÃO

Reagente R1
N-Metil-D-Glicamina pH 9,4 (37 °C)
L-lactato de lítio 68 mmol/L
Azida de sódio < 0,1 % (ip)
Reagente R2
NAD 60 mmol/L

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- CALI-050 ELICAL 2
- CONT-0060 ELITROL I
- CONT-0160 ELITROL II
- Solução salina normal (NaCl 9 g/L).
- Analisador automático ou semi-automático.
- Equipamento geral de laboratório (por exemplo, pipeta, ...).
- Não utilize materiais que não são necessários, tal como indicado acima.

PRECAUÇÕES DE USO E AVISOS

- Consulte a ficha de dados de segurança (SDS) para obter um manual adequado.
- O reagente R1 contém azida de sódio que pode reagir com o chumbo ou cobre das canalizações formando azidas metálicas explosivas. Ao manusear estes reagentes lave as mãos sempre com grandes quantidades de água para evitar a produção de azida.
- Utilize as precauções normais e siga as boas práticas de laboratório.
- Utilizar material de laboratório limpo ou destinado a uma única utilização de modo a evitar qualquer contaminação.
- Não trocar os frascos de reagentes de diferentes kits.

ESTABILIDADE

Conservar a 2-8 °C e ao abrigo da luz. Não congelar. Não utilizar após as datas de validade indicadas nos rótulos dos frascos.
Estabilidade em equipamentos:
A estabilidade a bordo é específica a cada equipamento (Consultar § DESEMPENHO).

PREPARAÇÃO

O reagente está pronto para uso.

DETERIORAÇÃO DO PRODUTO

- O produto deve ser claro. Qualquer turbidez seria sinal de deterioração do produto.
- Não use o produto se houver evidência visível de contaminação ou dano (por exemplo, partículas).
- Danos ao recipiente de produto podem afetar o desempenho do produto. Não use o produto se houver evidência física de deterioração (por exemplo, vazamentos ou recipiente perfurado).

• AMOSTRAS

Amostras ^(1, 2)
- Soro.
- Plasma (heparina de lítio)
- O uso de qualquer outro tipo de amostra deve ser validado pelo laboratório.
Aviso e precauções
As amostras devem estar livres de hemólise.^{1, 2} As amostras devem ser separadas das células e coaguladas imediatamente (a presença de células pode aumentar falsamente o resultado).^{1, 2} As amostras devem ser coletadas de acordo com as Boas Práticas de Laboratório e com as diretrizes apropriadas que podem estar em vigor.
Armazenamento e estabilidade ⁽³⁾
- 7 dias em temperatura ambiente
- 4 dias a 2-8 °C
- 6 semanas a - 20 °C.
Em algumas patologias que envolvem o aumento da isoenzima LDH-4 ou LDH-5, é preferível armazenar as amostras à temperatura ambiente, sendo essas isoenzimas sensíveis ao frio.²

• VALORES DE REFERÊNCIAS ^(2, 3)

Soro/plasma	U/L	µkat/L
Adultos	125 - 220	2,08 - 3,67

Maiores concentrações são observadas em crianças e recém-nascidos.

Observação: O intervalo citado deve servir apenas como guia. Recomenda-se que cada laboratório verifique esse intervalo ou estabeleça um intervalo de referência para a população pretendida.

PROCEDIMENTO

Procedimento manual
Comprimento de onda: 340 nm
Curso óptico: 1 cm
Relação Amostra/Reagente: 7:36
Temperatura: 37 °C
 Ler comparando com o branco de reagente

	BRANCO	DOAGEM
Reagente R1	1000 µL	1000 µL
Água destilada	35 µL	-
Amostra	-	35 µL

Misture, aguarde 3 minutos e acrescentar:

Reagente R2	250 µL	250 µL
-------------	--------	--------

Misture e após 100 segundos de incubação, leia a absorbância em intervalos de 1 minuto durante 3 minutos. Calcule a mudança de absorbância por minuto ($\Delta A/min$).

Procedimento automático

Estes reagentes podem ser utilizados em vários analisadores automáticos. Para os analisadores ELiTech Selecta, as aplicações validadas estão disponíveis mediante solicitação. Com o Selecta TouchPro, utilize a aplicação incluída no código de barras disponível no final de cada folha.

CÁLCULO

Atividade [U/L] = $\Delta A/min \times 5,828$

Fator de conversão U/L x 0,0167 = µkat/L

CALIBRAÇÃO

ELICAL 2 0 é rastreável ao método de referência IFCC.

Frequência de calibrção: A frequência de calibrção é específica a cada equipamento (consultar § DESEMPENHO).

CONTROLE DE QUALIDADE

Recomenda-se o uso de soros de controle de qualidade, como ELITROL I e ELITROL II, para monitorar o desempenho do ensaio. Os controles devem ser executados:
- antes de analisar amostras de pacientes,
- pelo menos uma vez por dia,
- após cada calibrção,
- de acordo com os requisitos laboratoriais e regulamentares.
Os resultados devem estar dentro dos intervalos definidos. Se os valores ficarem fora dos intervalos definidos, cada laboratório deve tomar as medidas corretivas necessárias.

TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

O descarte de todo material residual deve estar de acordo com os requisitos regulamentares locais, estaduais e federais (consulte a Ficha de dados de segurança (SDS)).

DESEMPENHO

Os desempenhos foram obtidos no Selecta ProM, seguindo as recomendações técnicas do CLSI, sob condições ambientais controladas.

- Precisão de medição

50 - 800 U/L (0,83 - 13,33 µkat/L)
As amostras com maiores concentrações devem ser diluídas 1:10 com solução de NaCl 9 g/L e ensaiado novamente. Este procedimento estende a faixa de medição até 8000 U/L (133,33 µkat/L). Não relatar resultados fora do intervalo de medição.

Para utilizadores do Selecta TouchPro, a função de «diluir» realiza a diluição de amostras automática. Os resultados são tomados em consideração na diluição.

- Limite de detección (LoD) e limite de quantificação (LoQ)

LoD = 4 U/L (0,07 µkat/L)
LoQ = 10 U/L (0,17 µkat/L)

- Precisão

Dados de precisão foram obtidos em 2 analisadores Selecta ProM ao longo de 20 dias (2 corridas por dia, testes realizados em duplicata). Os resultados representativos são apresentados abaixo.

	n	Média		Intra-série	Total
		U/L	µkat/L	CV (%)	CV (%)
Nivel 1	80	168	2,80	0,7	4,1
Nivel 2	80	309	5,15	0,7	2,8
Nivel 3	80	712	11,87	0,5	3,0

- Correlação

Foi realizado um estudo comparativo entre o reagente LDH-L, SL em um analisador Selecta ProM e um sistema similar disponível comercialmente em 99 amostras de soro humano. As concentrações da amostra variaram de 45 para 750 U/L (0,75 - 13,05 µkat/L). Os resultados são os seguintes:
Coeficiente de correlação: (r) = 0,997
Regresión lineal: y = 1,010 x + 3 U/L (0,05 µkat/L).

• Limitaciones/interferencias

- As amostras hemolizadas não devem ser usadas, pois a hemólise significativa pode levar a resultados falsamente aumentados devido aos altos níveis de LDH originários dos eritócitos.

- Estudos foram realizados para determinar o nível de interferência de diferentes compostos. Os seguintes níveis de lactato desidrogenasa (LDH) foram testados: 200 U/L e 750 U/L. Uma interferência não significativa é definida por uma recuperação de $\pm 10\%$ do valor inicial.
Hemolina não conjugada: Nenhuma interferência significativa até 30,0 mg/dL (513 µmol/L).
Hemolina conjugada: Nenhuma interferência significativa até 29,5 mg/dL (505 µmol/L).
Triglicéridos: Nenhuma interferência significativa até 3146 mg/dL (35,8 mmol/L).
Acido ascórbico: Nenhuma interferência significativa até 20,0 mg/dL.
Acido acetilsalicílico: Nenhuma interferência significativa até 200 mg/dL.
Galactosidasa: Nenhuma interferência significativa até 30 mg/dL.

- Em casos muito raros, as gamopatas monoclonais (mieloma múltiplo), em particular, tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström) podem causar resultados não confiáveis.³

- Muitas outras substâncias e drogas podem interferir. Alguns deles estão referenciados em análises publicadas por Young.^{3, 4}

- Estabilidade a bordo / frequência de calibrção

Estabilidade a bordo: 28 dias
Frequência de calibrção: 6 dias
Recalcular quando os lotes de reagentes mudarem, quando os resultados do controle de qualidade estiverem fora da faixa estabelecida e após uma operação de manutenção.

Estes desempenhos foram obtidos utilizando o analisador ELiTech Selecta ProM. Os resultados podem variar se um instrumento diferente ou um procedimento manual for usado. Os desempenhos de aplicações não validadas pelo ELiTech não são garantidos e devem ser definidos pelo usuário.

• DECLARACIÓN DE INCIDENTE GRAVE

Notifique o fabricante (através do seu distribuidor) e a autoridade competente do Estado-Membro da União Europeia em que o usuário e / ou o paciente está estabelecido, de qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação ao dispositivo. Para outras jurisdições, a declaração de incidente grave deve estar de acordo com os requisitos regulamentares locais, estaduais e federais. Ao relatar um incidente grave, você fornece informações que podem contribuir para a segurança de dispositivos médicos in vitro.

• ASISTENCIA TÉCNICA

Entre em contato com o seu distribuidor local ou com a ELiTech Clinical Systems SAS (CCSupport@elitechgroup.com).

**BIBLIOGRAPHIE/BIBLIOGRAPHY
BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAFIA**

1. Wu, A.H.B., *Clinical guide to laboratory tests*, 4th Ed. (W.B. Saunders eds.), (2006), 648.
2. Saiki W. R., Protein isoforms : Isoenzymes and isoforms, *Clinical Chemistry: Theory Analysis Correlation*, 5th Ed. Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Mosby Inc. eds.), (2010), 302 and appendix.
3. Partridge, M. D., Enzymes, *Textbook of Clinical Chemistry*, 9th Ed. Burts, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (W.B. Saunders eds.), (2008), 317.
4. Schunam, G. et al. *Clin. Chem. Lab. Med.* (2002), **40**, 643.
5. Oulter, W.G., et al. *Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples*. (2002). WHO/DE/ LAB/99.1 Rev.2.
6. Berth, M. & Delanghe, J., Protein precipitation as a possible important pitfall in the clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobulins: 2 case reports and a review of literature, *Acta Clin. Belg.*, (2004), **59**, 263.
7. Young, D. S., *Effect of preanalytical variables on clinical laboratory tests*, 7th Ed. AACCC Press, (1997).
8. Young, D. S., *Effect of drugs on clinical laboratory tests*, 4th Ed., AACCC Press, (1995).

**SYMBOLS/SYMBOLS/
SIMBOLOS/SIMBOLOS**

- Les symboles utilisés sont décrits dans la norme ISO 15223-1 hormis ceux présentés ci-dessous.
- Symbols used are defined on ISO 15223-1 standard, except those presented below.
- Los símbolos utilizados son descritos en la norma ISO 15223-1 a la excepción de los presentados a continuación.
- Os símbolos utilizados são definidos na norma ISO 15223-1, exceto os apresentados abaixo.

CONT	Content Content Contiene Conteúdo
R1	Reactif R1 Reagent R1 Reactivo R1 Reagente R1
R2	Reactif R2 Reagent R2 Reactivo R2 Reagente R2
•	Modification par rapport à la version précédente Modification from previous version Modificación con respecto a la versión anterior Modificação relativamente à versão anterior
CE	Conformité Européenne European Conformity Conformidad Europea Conformidade Europeia

Nota/Note

- Uniquement pour la réf. **LLSL-0230**, utilisé avec le logiciel Selectra TouchPro.
- Only for ref. **LLSL-0230**, used with Selectra TouchPro software.
- Únicamente para la ref. **LLSL-0230**, utilizado con el software Selectra TouchPro.
- Somente para ref. **LLSL-0230**, usado com o Selectra TouchPro.

LLSL



LDH
720
0
FET-LLSL



Annexe 2 : Fiche technique du kit de dosage du cholestérol



CHOLESTEROL SL

CHSL-0497
CHSL-0507
CHSL-0707
CHSL-0230
CHSL-0455
CHSL-0500
CHSL-0700

CHSL

R 1 x 100 mL + Std 1 x 5 mL
R 6 x 100 mL + Std 1 x 5 mL
R 4 x 250 mL + Std 1 x 5 mL
R 12 x 20 mL
R 6 x 45 mL
R 6 x 100 mL
R 4 x 250 mL



PIT-CHSL-4-v28 (10/2021)

Français - FR

USAGE PRÉVU

ELITech Clinical Systems CHOLESTEROL SL est un réactif de diagnostic *in vitro*, destiné au dosage quantitatif du cholestérol total dans les échantillons de sérum et de plasma humains sur des automates ou semi-automates.

Le standard est destiné à la calibration du réactif. Ces dispositifs de diagnostic *in vitro* sont uniquement destinés aux professionnels.

SIGNIFICATION CLINIQUE (1-3)

Le cholestérol total dans le sérum est issu de l'alimentation et est synthétisé de façon endogène, principalement dans les cellules hépatiques et intestinales. Le cholestérol est un composant structural important des membranes des cellules et organelles. Le cholestérol est également un précurseur des acides biliaires, de la vitamine D et des hormones stéroïdiennes. Le cholestérol, étant une molécule insoluble dans l'eau, circule en étant associé à des lipoprotéines (HDL, LDL, VLDL et chylomicrons). En pratique le dosage du cholestérol total est effectué pour évaluer la prédisposition des patients aux risques cardiovasculaires dans le cadre du bilan lipidique ainsi que pour le suivi de stratégies thérapeutiques associées. La mesure du cholestérol total est également importante pour l'aide au diagnostic des hyperlipoprotéinémies.

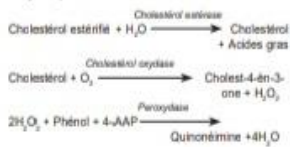
LIMITE D'UTILISATION

Le dosage du cholestérol total ne peut être utilisé seul pour diagnostiquer une maladie ou une pathologie spécifique.

Les résultats doivent toujours être confrontés aux résultats d'autres tests diagnostiques, aux examens cliniques, et à l'historique médical du patient.

MÉTHODE & PRINCIPE (4)

Enzymatique / PAP - Point final



4-AAP = Amino-4-antipyrine

COMPOSITION

Réactif : R

Tampon de Good, pH 6.7	
Phénol	24 mmol/L
Amino-4-antipyrine	0.5 mmol/L
Cholestérol estérifié	≥ 180 U/L
Cholestérol oxydase	≥ 200 U/L
Péroxydase	≥ 1 000 U/L
Azide de sodium	< 0.1 % (p/p)
Contient aussi des surfactants et des sels de magnésium pour des performances optimales.	
Standard : Std (Ref. : CHSL-0497/0507/0707)	
Cholestérol	200 mg/dL
	5.17 mmol/L

MATÉRIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- CALJ-0550 ELICAL 2
- CONT-0080 ELITROL I
- CONT-0100 ELITROL II
- Solution saline normale (NaCl 0.9 g/L).
- Automates ou semi-automates.
- Equipement général de laboratoire (ex. pipette).
- Ne pas utiliser de matériel ne figurant pas ci-dessus.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI ET MISES EN GARDE

- Consulter la fiche de données de sécurité (FDS) pour une manipulation appropriée.
- Le réactif R contient de l'azide de sodium qui peut réagir avec le plomb ou le cuivre et former des azides métalliques potentiellement explosifs. Lors de l'élimination de ces réactifs toujours rincer abondamment avec de l'eau pour éviter l'accumulation d'azides.
- Respecter les précautions d'usage et les bonnes pratiques de laboratoire.
- Utiliser du matériel de laboratoire propre ou à usage unique afin d'éviter toute contamination.

STABILITÉ

Stockier à 2-8 °C et à l'abri de la lumière. Ne pas congeler.

Ne pas utiliser après la date d'expiration indiquée sur les étiquettes des flacons. Le standard doit être immédiatement et correctement refermé afin d'éviter toute contamination ou évaporation.

Stabilité à bord :

Le réactif est stable à bord est spécifique à chaque automate. (Se référer au § PERFORMANCES).

PRÉPARATION

Le réactif et le standard sont prêts à l'emploi.

DÉTÉRIORATION DU PRODUIT

- Le produit doit être limpide. Tout trouble serait le signe d'une détérioration du produit.
- Ne pas utiliser le produit s'il y a des signes évidents de contamination ou de détérioration (ex : particules).
- Un flacon endommagé peut avoir un impact sur les performances du produit. Ne pas utiliser le produit si les flacons présentent des signes physiques de détérioration (par exemple, fuite, flacon percé).

ÉCHANTILLONS

Échantillons requis (1,4)

- Sérum
- Plasma (héparine de lithium)
- L'utilisation de toute autre type d'échantillon doit être validée par le laboratoire.

Avertissements et précautions

- Les échantillons stockés doivent être suffisamment vortexés avant dosage.
- Le prélèvement des échantillons réalisés pour la réalisation d'un bilan lipidique peut être gâché par des patients à jeun ou non à jeun. Un bilan sur échantillon de patient à jeun peut être répété lorsqu'un dosage sur échantillon prélevé non à jeun a conduit à une triglycéridémie > 400 mg/dL (4.5 mmol/L) ou lorsqu'une hypertriglycéridémie est connue.
- Les échantillons doivent être prélevés selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire et les guides appropriés qui sont mis en place.

Stockage et stabilité (1)

- 7 jours à 2-8 °C
- 3 mois à -20 °C

VALEURS DE RÉFÉRENCE (2)

Les publications les plus récentes recommandent d'adapter les seuls décisionnels de cholestérol total dans le cadre d'une évaluation globale des risques. Au niveau des laboratoires, IFELM (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) recommande de signaler les concentrations suivantes comme anormales.

Sérum/plasma	mg/dL	mmol/L
	≥ 190	≥ 5.0

Remarque : Les laboratoires doivent suivre les recommandations applicables localement pour les seuils lipidiques s'ils diffèrent de ceux indiqués ci-dessus.

PROCÉDURE

Procédure manuelle

Longueur d'onde : 505 nm
Tuyau optique : 7 cm
Ratio échantillon/réactif : 1:100
Température : 37 °C
Lire contre le blanc réactif.

	CALIBRATION	DOSSAGE
Réactif R	1 000 µL	1 000 µL
Standard/Calibrant	10 µL	-
Échantillon	-	10 µL

Mélanger et lire les absorbances (A) après 5 minutes d'incubation.

Procédure sur automate

Ces réactifs peuvent être utilisés sur différents automates. Pour les automates ELITech Selectra, les applications validées sont disponibles sur demande. Avec le logiciel Selectra TouchPro, utilisez l'application incluse dans le code barre disponible à la fin de cette notice.

Information importante de programmation : Le réactif CHOLESTEROL SL peut être faiblement contaminé par le réactif MAGNESIUM XB sur les Selectra ProM et ProXL.

Afin d'éviter une contamination sur ces instruments, programmer les incompatibilités suivantes :

Logiciel	Menu	Paramètre
TouchPro	Incompatibilités Aiguille	Incompatibilité CHOLESTEROL - MAGNESIUM
Autres	Incompatibilités Aiguille	CHOLESTEROL - MAGNESIUM

Pour les autres instruments Selectra Pro : répétez les résultats aberrants après avoir programmé un lavage d'aiguille.

CALCUL

$$(A) \frac{\text{Echantillon}}{\text{Standard/Calibrant}} \times n \quad n = \text{concentration du standard/Calibrant}$$

Facteur de conversion : mg/dL x 0.0259 = mmol/L
mg/dL x 0.01 = g/L

CALIBRATION

Pour les références CHSL-0497/0507/0707 : ELICAL 2 et Cholestérol Standard 200 mg/dL sont traçables par rapport à la méthode de référence ID-GC-MS (Dilution Isotopique - Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de Masse).
Pour les références CHSL-0250/0455/0500/0700 : ELICAL 2 est traçable par rapport à la méthode de référence ID-GC-MS (Dilution Isotopique - Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de Masse).
Étape de calibration : La fréquence de calibration est spécifique à chaque automate (se référer au § PERFORMANCES).

CONTRÔLE QUALITÉ

Il est recommandé d'utiliser des sérums de contrôle tels que ELITROL I et ELITROL II pour surveiller les performances du dosage. Ces contrôles doivent être effectués :
- avant que les échantillons de patients soient testés,
- au moins une fois par jour,
- après chaque calibration,
- et/ou en accord avec les requis du laboratoire et des exigences réglementaires.
Les résultats doivent être dans les intervalles définis. Si les valeurs se situent en dehors des plages définies, chaque laboratoire devra prendre les mesures correctives nécessaires.

TRAITEMENT DES DÉCHETS

L'élimination de tous les déchets doit être effectuée conformément aux exigences réglementaires locales, d'état et fédérales (veuillez vous référer à la fiche de données de sécurité (FDS)).

PERFORMANCES

Les performances ont été obtenues sur l'automate ELITech Selectra ProM. Les résultats peuvent varier si le réactif est utilisé sur un automate différent ou en méthode manuelle.

Les performances obtenues à partir d'applications non validées par ELITech ne peuvent être garanties et doivent être définies par l'utilisateur.
Domaine de mesure
20 - 600 mg/dL (0.52 - 15.52 mmol/L).
Les échantillons ayant des concentrations supérieures devront être dilués au 1/5 dans une solution de NaCl 9 g/L et redosés. Cette procédure étend le domaine de mesure jusqu'à 3000 mg/dL (77.59 mmol/L).
Ne pas communiquer de résultats en dehors du domaine de mesure étendu.

Pour les utilisateurs du logiciel Selectra TouchPro, la fonction « diluer » réalise la dilution des échantillons automatiquement. Les résultats tiennent compte de la dilution.

Limite de Détection (LoD) et Limite de Quantification (LoQ)
LoD = 1 mg/dL (0.03 mmol/L)
LoQ = 10 mg/dL (0.26 mmol/L)

Précision

Les données d'imprécision ont été obtenues sur 2 automates Selectra ProM sur 20 jours (2 routines par jour, tests effectués en double).

Des résultats représentatifs sont présentés ci-dessous :

	n	Moyenne		Intra-série CV (%)	Total
		mg/dL	mmol/L		
Niveau 1	80	115	2.97	1.1	2.1
Niveau 2	80	184	4.76	0.7	1.9
Niveau 3	80	292	7.55	1.9	2.7

Corrélation

Une étude comparative a été réalisée entre le réactif CHOLESTEROL SL sur un automate Selectra ProM et un système similaire certifié par le CRMLN, sur 100 échantillons sériques. Les concentrations des échantillons s'échelonnent de 20 à 575 mg/dL (0.52 - 14.87 mmol/L). Les résultats sont les suivants :
Coefficient de corrélation : (r) = 0.999
Droite de régression : y = 1.016 x + 0 mg/dL.

Limitations/Interférences

- Des tests ont été réalisés pour déterminer le niveau d'interférence de différents composés. Les niveaux suivants du cholestérol total ont été testés : 116 et 308 mg/dL. L'absence d'interférence significative est définie par un recouvrement ≥ 10% de la valeur initiale.
- **Bilirubine non-conjugée :** Aucune interférence significative jusqu'à 6.0 mg/dL (103 µmol/L).
- **Bilirubine conjuguée :** Aucune interférence significative jusqu'à 5.9 mg/dL (101 µmol/L).
- **Hémoglobine :** Aucune interférence significative jusqu'à 300 mg/dL.
- **Turbidité :** Aucune interférence significative jusqu'à 614 mg/dL (6.94 mmol/L) équivalent Triglycérides.
- **Acide ascorbique :** Aucune interférence significative jusqu'à 4.0 mg/dL.
- **Méthyl-Dopa :** Aucune interférence significative jusqu'à 1.6 mg/dL.
- **Acide urique :** Aucune interférence significative jusqu'à 23.7 mg/dL (1410 µmol/L).
- Ne pas utiliser d'échantillons icteriques ou hémolysés.

- Dans des cas très rares, les gammaphaties monoclonales (myélome multiple), en particulier de type IgM (Macroglobulinémie de Waldenström) peuvent être à l'origine de résultats peu fiables.

- Les résultats peuvent être faussement abaissés dans les échantillons contenant des niveaux significatifs de NAC (N-Acetyl-Cystéine), de NAPQI (métabolite de l'acétaminophène (paracétamol)) ou de méfénazole.

- D'autres substances et médicaments peuvent interférer. Certains d'entre eux sont répertoriés dans les revues publiées par Young.

Stabilité à bord / fréquence de calibration

Stabilité à bord : 28 jours
Fréquence de calibration : 28 jours
Une nouvelle calibration doit être effectuée après chaque changement de lot de réactif, lorsque les résultats du ou des contrôles de qualité sont hors de l'intervalle établi, et après une opération de maintenance.

Ces performances ont été définies sur un automate ELITech Selectra ProM. Les résultats peuvent varier si le réactif est utilisé sur un automate différent ou en méthode manuelle.

Les performances obtenues à partir d'applications non validées par ELITech ne peuvent être garanties et doivent être définies par l'utilisateur.

DECLARATION DES INCIDENTS GRAVES

Veuillez notifier au fabricant (par l'intermédiaire de votre distributeur) et à l'autorité compétente de l'Etat membre de l'union européenne dans lequel l'utilisateur et/ou le patient est établi, les cas d'incident grave survenu en lien avec le dispositif.

Pour les autres juridictions, la déclaration d'incident grave doit être effectuée conformément aux exigences réglementaires locales, d'état et fédérales. En signalant les incidents graves, vous contribuez à fournir davantage d'informations sur la sécurité des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*.

ASSISTANCE TECHNIQUE

Contactez votre distributeur local ou ELITech Clinical Systems SAS (CCSupport@elittechgroup.com).

English - EN

INTENDED USE

ELITech Clinical Systems CHOLESTEROL SL is an *in vitro* diagnostic reagent intended for the quantitative determination of total cholesterol in human serum and plasma samples on analyzers or semi-automatic analyzers.

The standard is intended for the calibration of reagent. These *in vitro* diagnostic devices are for professional use only.

CLINICAL SIGNIFICANCE (1-3)

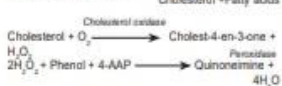
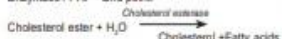
Total cholesterol in the serum is derived from dietary sources or is synthesized endogenously, mainly in hepatic and intestinal cells. Cholesterol is an important structural component of cell and organelle membranes. It is a precursor of bile acids, vitamin D and steroid hormones. Cholesterol, being insoluble in water, circulates in association with lipoproteins (HDL, LDL, VLDL and chylomicrons). In practice, total cholesterol measurement is requested to assess predisposition of patients to cardiovascular risk as part of a lipid profile and to monitor associated therapeutic strategies. Total Cholesterol measurement is also important to help diagnose hyperlipoproteinemias.

LIMITATION OF USE

The quantitative assay of total cholesterol alone can not be used to diagnose a disease or a specific pathology.
The results must be interpreted in conjunction with other diagnostic test results, clinical findings and the patient's medical history.

METHOD & PRINCIPLE ⁽¹⁾

Enzymatic / PAP - End point.



4-AAP = 4-Aminoantipyrine

COMPOSITION**Reagent: R**

Good's buffer, pH 6.7

4-Aminoantipyrine	34 mmol/L
Cholesterol esterase	≥ 180 U/L
Cholesterol oxidase	≥ 200 U/L
Peroxidase	≥ 1 000 U/L
Sodium azide	< 0.1 % (w/w)
Also contains surfactants and magnesium salts for optimal performance.	
Standard: Std (Ref.: CHSL-04970607/0707)	
Cholesterol	200 mg/dL
	5.17 mmol/L

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- CALL-0550 ELICAL 2
- CONT-0060 ELITROL I
- CONT-0160 ELITROL II
- Normal saline solution (NaCl 9 g/L)
- Analyzers or semi-automatic analyzers.
- General Laboratory equipment (e.g. pipette).
- Do not use materials that are not required as indicated above.

PRECAUTIONS FOR USE AND WARNINGS

- Consult Safety Data Sheet (SDS) for a proper handling.
- Reagent R contains sodium azide which may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. When disposing of these reagents always flush with copious amounts of water to prevent azide buildup.
- Take normal precautions and adhere to good laboratory practice.
- Use clean or single use laboratory equipment only to avoid contamination.

STABILITY

Store at 2-8 °C and protect from light. Do not freeze. Do not use after expiration dates indicated on the vial labels.
The standard should be immediately and lightly capped to prevent contamination and evaporation.

On-board stability:

The on-board stability is specific for each analyzer. (Refer to § PERFORMANCE DATA).

PREPARATION

The reagent and standard are ready to use.

PRODUCT DETERIORATION

- The product should be clear. Cloudiness would indicate deterioration.
- Do not use the product if there is visible evidence of contamination or damage (e.g. particle matter).
- Damage to the product container may impact on product performance. Do not use the product if there is physical evidence of deterioration (e.g. leakage or punctured container).

SAMPLES**Specimen ⁽¹⁴⁾**

- Serum.
- Plasma (lithium heparin).
- Using any other specimen type should be validated by the laboratory.

Warnings and precautions

- Stored samples must be adequately mixed on a vortex mixer before being tested.⁽¹⁾

- A non-fasting or fasting sample is suitable for the determination of a lipid profile. A repeat of lipid profile on a fasting sample could be performed in cases where a non-fasting Triglyceride result > 400 mg/dL (4.5 mmol/L) or hypertriglyceridemia is known.⁽¹⁵⁾

- Samples should be collected in accordance with Good Laboratory Practice and appropriate guidelines that may be in place.

Storage and stability ⁽¹⁶⁾

- 7 days at 2-8 °C.
- 3 months at -20 °C.

REFERENCE VALUES ⁽²⁾

Most recent publications recommend adapting total cholesterol thresholds as part of an overall risk assessment. At the laboratory level, the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)

recommends that the following concentrations be reported as abnormal:

Serum/plasma	mg/dL	mmol/L
	≥ 190	≥ 5.0

Note: Laboratories should follow locally applicable recommendations for lipid targets if they differ from those reported above.

PROCEDURE**Manual Procedure**

Wavelength: 505 nm
Optical path: 1 cm
Sample/Reagent ratio: 1:100
Temperature: 37 °C
Read against reagent blank.

	CALIBRATION	TEST
Reagent R	1 000 µL	1 000 µL
Standard/Calibrator	10 µL	-
Sample	-	10 µL

Mix and read the absorbances (A) after an incubation of 5 minutes.

Automatic Procedure

These reagents may be used on several automatic analyzers. For ELITEch Selectra Analyzers, validated applications are available on request. For Selectra TouchPro software, use the application included in the barcode available at the end of this insert.

Important set-up information:

CHOLESTEROL SL reagent can be weakly contaminated by MAGNESIUM XB on Selectra ProM and ProXL.

In order to avoid contamination on these instruments, program the following incompatibilities:

Software	Menu	Parameter
TouchPro	Probe incompatibilities	incompatibility/ CHOLESTEROL - MAGNESIUM
Other	Needle incompatibility	CHOLESTEROL/ MAGNESIUM

For other Selectra Pro instruments: repeat any absurd results after programming a needle wash.

CALCULATION

$$\frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Calibrator/Standard}} \times n = \frac{\text{Calibrator/standard}}{\text{concentration}}$$

Conversion factor: mg/dL x 0.0259 = mmol/L
mg/dL x 0.01 = g/L

CALIBRATION

For the references CHSL-04970607/0707: ELICAL 2 and Cholesterol Standard 200 mg/dL are traceable to ID-GC-MS (Isotope Dilution - Gas Chromatography - Mass Spectrometry) reference method.

For the references CHSL-02550445/0500/0700: ELICAL 2 is traceable ID-GC-MS (Isotope Dilution - Gas Chromatography - Mass Spectrometry) reference method.

Calibration frequency: The calibration is specific for each analyzer. (Refer to § PERFORMANCE DATA).

QUALITY CONTROL

It is recommended that quality control sera such as ELITROL I and ELITROL II be used to monitor the performance of the assay.

- Controls have to be performed:
- prior to assaying patient samples,
- at least once per day,
- after every calibration,
- and/or in accordance with laboratory and regulatory requirements.

Results should be within the defined ranges. If values fall outside of the defined ranges, each laboratory should take necessary corrective measures.

WASTE MANAGEMENT

Disposal of all waste material should be in accordance with local, state and federal regulatory requirements (please refer to the Safety Data Sheet (SDS)).

PERFORMANCES

Performances were obtained on Selectra ProM, following CLSI technical recommendations, under controlled environmental conditions.

- **Measuring range**
20 - 600 mg/dL (0.52 - 15.52 mmol/L).
Samples having greater concentrations should be diluted 1:5 with NaCl 9 g/L solution and re-assayed. This procedure extends the measuring range up to 3000 mg/dL (77.59 mmol/L).

Do not report results outside this extended range.

For users with Selectra TouchPro software, the «dilu» function performs the sample dilution automatically. Results take the dilution into account.

- Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantification (LoQ)

LoD = 1 mg/dL (0.03 mmol/L)
LoQ = 10 mg/dL (0.26 mmol/L)

- Precision

Imprecision data has been obtained on 2 Selectra ProM analyzers over 20 days (2 runs per day, tests performed in duplicate). Representative results are presented below.

	n	Mean		Within-run CV (%)	Total
		mg/dL	mmol/L		
Level 1	80	115	2.97	1.1	2.1
Level 2	80	184	4.76	0.7	1.9
Level 3	80	252	7.55	1.9	2.7

- Correlation

A comparative study has been performed between CHOLESTEROL SL reagent on a Selectra ProM analyzer and a similar available system CRMLN certified on 100 human serum samples.

The sample concentrations ranged from 20 to 575 mg/dL (0.52 - 14.87 mmol/L).

The results are as follows:
Correlation coefficient: (r) = 0.999
Linear regression: y = 1.016 x + 0 mg/dL.

- Limitations/Interferences

- Studies have been performed to determine the level of interference from different compounds.

The following total cholesterol levels were tested: 116 and 309 mg/dL.

No significant interference is defined by a recovery ≥ 10% of the initial value.

Unconjugated Bilirubin: No significant interference up to 8.0 mg/dL (103 µmol/L).

Conjugated Bilirubin: No significant interference up to 5.9 mg/dL (101 µmol/L).

Hemoglobin: No significant interference up to 300 mg/dL.

Turbidity: No significant interference up to 614 mg/dL (6.94 mmol/L) Inglycende equivalent.

Ascorbic acid: No significant interference up to 4.0 mg/dL.

Methylxanthine: No significant interference up to 1.6 mg/dL.

Urea acid: No significant interference up to 23.7 mg/dL (1410 µmol/L).

- Do not use icteric or hemolyzed samples.

- In very rare cases, monoclonal gammopathies (multiple myeloma), in particular IgM type (Waldenström's macroglobulinemia) can cause unreliable results.⁽⁸⁾

- Results can be falsely lowered by significant levels in the sample of NAC (N-Acetyl-Cysteine), NAPQI (metabolite of acetaminophene (paracetamol)) or metanzole.

- Many other substances and drugs may interfere. Some of them are listed in reviews published by Young^(17,18)

- **On board stability/Calibration frequency**

On Board Stability: 28 days

Calibration frequency: 28 days

Recalibrate when reagent lots change, when quality control results fall outside the established range and after a maintenance operation.

These performances have been obtained using ELITEch Selectra ProM analyzer. Results may vary if a different instrument or a manual procedure is used.

The performances of applications not validated by ELITEch are not warranted and must be defined by the user.

DECLARATION OF SERIOUS INCIDENT

Please notify the manufacturer (through your distributor) and competent authority of the Member State of the European Union in which the user and/or the patient is established, of any serious incident that has occurred in relation to the device. For other jurisdictions, the declaration of serious incident should be in accordance with local, state and federal regulatory requirements. By reporting a serious incident, you provide information that can contribute to the safety of in vitro medical devices.

TECHNICAL ASSISTANCE

Contact your local distributor or ELITEch Clinical Systems SAS (CCsupport@elitechgroup.com).

Español - ES**USO PREVISTO**

ELITEch Clinical Systems CHOLESTEROL SL es un reactivo de diagnóstico in vitro diseñado para la determinación cuantitativa de colesterol total en muestras de suero y plasma humanas en equipos automatizados o equipos semiautomatizados.

El estándar está diseñado para la calibración del reactivo.

Estos dispositivos de diagnóstico in vitro están destinados únicamente para los profesionales.

SIGNIFICADO CLÍNICO ⁽¹⁻³⁾

El colesterol total sérico se deriva de la dieta o se sintetiza endógenamente, principalmente en las células hepáticas e intestinales. El colesterol es un componente estructural importante de las membranas de las células y los orgánulos. El colesterol también es un precursor de los ácidos biliares, la vitamina D y las hormonas esteroideas. El colesterol, al ser una molécula insoluble en el agua, circula en asociación con las lipoproteínas (HDL, LDL, VLDL y quilomicrones).

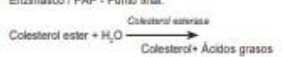
En la práctica, la determinación del colesterol total se lleva a cabo para evaluar la susceptibilidad de los pacientes a los riesgos cardiovasculares como parte de la evaluación de los lípidos, así como para controlar las estrategias terapéuticas asociadas. La medición del colesterol total también es importante en el diagnóstico de hiperlipoproteinemias.

LÍMITE DE UTILIZACIÓN

La cuantificación de colesterol total no puede ser utilizado solo para diagnosticar una enfermedad o patología específica. Los resultados siempre deben compararse con los resultados de otras pruebas de diagnóstico, exámenes clínicos y el historial médico del paciente.

MÉTODO & PRINCIPIO ⁽⁴⁾

Enzimático / PAP - Punto final.



4-AAP = Amino-4-antipirina

COMPOSICIÓN**Reactivo: R**

Tampón de Good, pH 6.7

Fenol	24 mmol/L
Amino-4-antipirina	0.5 mmol/L
Colesterol esterase	≥ 180 U/L
Colesterol oxidasa	≥ 200 U/L
Peroxidasa	≥ 1 000 U/L
Azida sódica	< 0.1 (pp)
También contiene surfactantes y sales de magnesio para un rendimiento óptimo.	
Estándar: Std (Ref.: CHSL-04970607/0707)	
Cholesterol	200 mg/dL
	5.17 mmol/L

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS

- CALL-0550 ELICAL 2
- CONT-0060 ELITROL I
- CONT-0160 ELITROL II
- Solución salina normal (NaCl 9 g/L).
- Equipos automatizados o equipos semiautomatizados.
- Equipamiento general de laboratorio (p. ej. pipeta).
- No utilice materiales que no se requieren, tal como se indica anteriormente.

PRECAUCIONES DE USO Y ADVERTENCIAS

- Consulte la Hoja de Datos de Seguridad (SDS) para un manejo adecuado.
- El reactivo R contiene azida sódica que puede reaccionar con el plomo o el cobre de la tubería y formar potencialmente azidas metálicas explosivas. Cuando se elimine el reactivo enjuague con agua abundantemente para prevenir la acumulación de azidas.
- Tome las precauciones normales y respete las buenas prácticas de laboratorio.
- Para evitar contaminaciones utilizar equipo nuevo o completamente limpio.

ESTABILIDAD

Conservar a 2-8 °C y protegidos de la luz. No congelar.

No utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de los frascos. El estándar debe cerrarse inmediatamente y correctamente para evitar contaminación y evaporación.

Estabilidad en el equipo:

La estabilidad es específica para cada equipo. (Referirse al § DATOS DE RENDIMIENTO).

PREPARACIÓN

El reactivo y el estándar están listos para su uso.

DETERIORACIÓN DEL PRODUCTO

- El producto debe ser claro. Turbidez indicaría deterioro.

- No utilice el producto si este presenta signos evidentes de contaminación o deterioro (p. ej. partículas).

- Un frasco dañado puede tener un impacto en el rendimiento del producto. No utilice el producto si este tiene signos físicos de deterioro (p. ej. fugas, frasco perforado).

MUESTRAS

Muestras requeridas (1,2)

- Suero.
- Plasma (heparina de litio).
- El uso de cualquier otro tipo de muestra debe ser validado por el laboratorio.

Advertencias y precauciones

- Las muestras almacenadas deben agitarse lo suficiente antes de la dosificación. (3)
- Una muestra en ayunas o no en ayunas es adecuada para la determinación de un perfil lipídico. Se podría repetir el perfil lipídico en una muestra en ayunas en los casos en que se encuentre un resultado de triglicéridos sin ayuno > 400 mg/dL (4.5 mmol/L) o hipertrigliceridemia. (4)

- Las muestras deben de formarse de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio y las guías apropiadas establecidas.

Conservación y estabilidad (5)

- 7 días a 2-8 °C.
- 3 meses a -20 °C.

VALORES DE REFERENCIA (3)

Las publicaciones más recientes recomiendan adaptar los umbrales de colesterol total como parte de una evaluación general del riesgo. A nivel de laboratorio, la Federación Europea de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (EFLM) recomienda que las siguientes concentraciones se notifiquen como anormales.

Suero/plasma	mg/dL	mmol/L
	≥ 190	≥ 5.0

Nota: Los laboratorios deben seguir las recomendaciones localmente aplicables para los valores de lípidos si difieren de los informados anteriormente.

PROCEDIMIENTO

Procedimiento manual

- Longitud de onda : 505 nm
- Trayectoria óptica : 7 cm
- Ratio muestra/reactivo : 1:100
- Temperatura : 37 °C
- Leer contra blanco reactivo.

	CALIBRACIÓN	PRUEBA
Reactivo R	1 000 µL	1 000 µL
Estándar/Calibrador	10 µL	-
Muestra	-	10 µL

Mezcle y lee las absorbancias (A) después de una incubación de 5 minutos.

Procedimiento automático

Estos reactivos pueden ser utilizados en varios equipos. Para los equipos ELITech Selectra, las aplicaciones validadas están disponibles sobre pedido. Para el software Selectra TouchPro, use la aplicación incluida en el código de barras disponible al final de este inserto.

Información importante de programación: El reactivo CHOLESTEROL SL puede ser ligeramente contaminado con el reactivo MAGNESIUM XB en Selectra ProM y ProXL. Con el fin de evitar contaminaciones en estos analizadores, programe incompatibilidades de la siguiente manera :

Software	Menú	Parámetro
TouchPre	compatibilidades de las sondas	Incompatibilidad/ CHOLESTEROL - MAGNESIUM
Otros	Incompatibilidad de agua	CHOLESTEROL MAGNESIUM

Para otros equipos Selectra Pro: repita cualquier resultado aberrante después de programar un lavado de agua.

CÁLCULO

(A) Muestra x n = concentración del estándar / (A) Estándar / Calibrador

Factor de conversión: mg/dL x 0.0259 = mmol/L
mg/dL x 0.01 = g/L

CALIBRACIÓN

Para las referencias CHSL-0497/0507/0707 : ELICAL 2 o el estándar Cholesterol Standard 200 mg/dL son trazables al método de referencia ID-GC-MS (Dilución isotópica - Cromatografía en fase gaseosa - Espectrometría de masas).

Para las referencias CHSL-0250/0455/0501/0700 : ELICAL 2 es trazable al método de referencia ID-GC-MS (Dilución isotópica - Cromatografía en fase gaseosa - Espectrometría de masas).

Frecuencia de calibración: la frecuencia de calibración es específica para cada equipo (referirse al § DATOS DE RENDIMIENTO).

CONTROL DE CALIDAD

Es recomendado que sueros de control tales como ELITROL L y ELITROL II sean usados para monitorear el rendimiento de las pruebas.

Los controles deben realizarse :

- antes que las muestras del paciente sean evaluadas,
- por lo menos una vez al día,
- después de cada calibración,
- y/o en acuerdo con el laboratorio y los requerimientos regulatorios.

Los resultados deben de encontrarse en el rango definido. Si los valores se encuentran fuera del mismo, cada laboratorio deberá tomar las medidas correctivas necesarias.

TRATAMIENTO DE LOS RESIDUOS

Todos los materiales de desecho deben eliminarse de acuerdo con los requisitos regulatorios locales, estatales y federales. (diríjase a la hoja de seguridad (SDS)).

RENDIMIENTO

El rendimiento fue obtenido en un Selectra ProM, siguiendo las recomendaciones técnicas del CLSI, bajo condiciones ambientales controladas.

- Rango analítico

20 - 600 mg/dL (0.52 - 15.62 mmol/L).
Las muestras que tengan concentraciones mayores deben diluirse 1:5 con una solución de NaCl 9 g/L y volver a analizarse.
Este procedimiento extiende el rango analítico hasta 3000 mg/dL (77.58 mmol/L).
No tome en cuenta resultados fuera del rango analítico extendido.

Para los usuarios del software Selectra TouchPro, la función editIn realiza la dilución de las muestras automáticamente. Los resultados toman en cuenta la dilución.

- Límite de detección (LoD), límite de Cuantificación (LoQ)

LoD = 1 mg/dL (0.03 mmol/L)
LoQ = 10 mg/dL (0.26 mmol/L)

- Precisión

Los datos de precisión fueron obtenidos en 2 equipos Selectra ProM durante 20 días (2 corridas por día, pruebas efectuadas en duplicado).

Resultados representativos se presentan a continuación :

	Media		Intra-serio CV (%)	Total
	n	mg/dL mmol/L		
Nivel 1	80	115 2.97	1.1	2.1
Nivel 2	80	184 4.76	0.7	1.9
Nivel 3	80	292 7.55	1.9	2.7

- Correlación

Un estudio comparativo se llevó a cabo entre el reactivo CHOLESTEROL SL en el equipo Selectra ProM y un sistema comercial similar certificado por el CRMN en 100 muestras séricas.

Las concentraciones de las muestras se encuentran entre 20 y 575 mg/dL (0.52 - 14.87 mmol/L)

Los resultados son los siguientes :
Coeficiente de correlación: (r) = 0.999
Regresión lineal : y = 1.016 x + 0 mg/dL

- Limitaciones/interferencias

Estudios fueron llevados a cabo para determinar el nivel de interferencia de diferentes componentes.

Los niveles siguientes de colesterol total fueron probados: 116 y 309 mg/dL.

Definimos una interferencia no significativa cuando se obtiene una recuperación de ±10% con respecto al valor inicial.

Bilirrubina no conjugada: No hay interferencia significativa hasta 6.0 mg/dL (103 µmol/L).

Bilirrubina conjugada: No hay interferencia significativa hasta 5.9 mg/dL (101 µmol/L).

Hemoglobina: No hay interferencia significativa hasta 300 mg/dL.

Uricosa: No hay interferencia significativa hasta 614 mg/dL (6.94 mmol/L) de triglicéridos equivalente.

Ácido ascórbico: No hay interferencia significativa hasta 4.0 mg/dL.

Metildopa: No hay interferencia significativa hasta 1.6 mg/dL.

Ácido úrico: No hay interferencia significativa hasta 23.7 mg/dL (1410 µmol/L).

- No utilizar muestras ictericas o hemolizadas.

- En casos muy raros, las gammopatías monoclonales (meioma múltiple), en particular el tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström) pueden producir resultados poco confiables. (6)

- Los resultados de dosificaciones pueden ser fal-

samente bajos cuando la muestra contiene niveles importantes de NAC (N-Acetil-cisteína), NAPQI (metabolito del acetaminofén (paracetamol)) o de Metamizol.

- Muchas otras sustancias y fármacos pueden interferir. Algunos de estos están listados en los artículos publicados por Young. (7,8)

- Estabilidad en el equipo / frecuencia de calibración

Estabilidad en el equipo : 28 días

Frecuencia de calibración : 28 días

Recalibrar cuando los lotes de reactivo cambien, cuando los controles de calidad no se encuentren dentro del rango establecido, y después de operaciones de mantenimiento.

El rendimiento se ha obtenido utilizando el equipo ELITech Selectra ProM. Los resultados varían si se utiliza un instrumento diferente o un procedimiento manual.

El rendimiento obtenido a partir de aplicaciones no validadas por ELITech no se garantiza y deben ser definidas por el usuario.

DECLARACIÓN DE INCIDENTES GRAVES

Por favor notifique al fabricante (por medio de su distribuidor) y autoridad competente del Estado miembro de la Unión Europea en donde el usuario o paciente radique, de cualquier incidente grave que se produzca con relación al dispositivo. Para otras jurisdicciones, la declaración de incidentes graves debe realizarse de acuerdo con los requisitos regulatorios locales, estatales y federales. Reportando incidentes graves usted contribuye a proporcionar más información sobre la seguridad del dispositivo médico de diagnóstico in vitro.

ASISTENCIA TÉCNICA

Contacte a su distribuidor local o con ELITech Clinical Systems SAS (CCsupport@elitechgroup.com)

Português – PT

UTILIZACIÓN PREVISTA

ELITech Clinical Systems CHOLESTEROL SL es un reactivo para diagnóstico in vitro destinado a determinación cuantitativa de colesterol total en muestras de suero y plasma humanos en analizadores automáticos o semi-automáticos.

El patrón es destinado a calibración del reactivo. Estos dispositivos de diagnóstico in vitro são apenas para uso profissional.

SIGNIFICADO CLÍNICO (1,2)

El colesterol total no suero es derivado de fuentes alimentares o sintetizado endogenamente, principalmente en células hepáticas e intestinales. El colesterol es un componente estructural importante das membranas celulares e organelares. É un precursor dos ácidos biliares, vitamina D e hormônios esteróides. O colesterol, sendo insolúvel em água, circula em associação com lipoproteínas (HDL, LDL, VLDL e quilomícrons).

Na prática, a medição do colesterol total é solicitada para avaliar a predisposição dos pacientes ao risco cardiovascular como parte de um perfil lipídico e para monitorar estratégias terapêuticas associadas. A medição total do colesterol também é importante para ajudar a diagnosticar hiperlipoproteinemias.

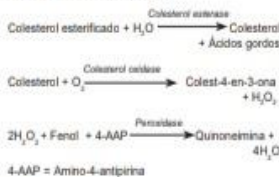
LIMITAÇÃO DE USO

O ensaio quantitativo de colesterol total sozinho não pode ser usado para diagnosticar uma doença ou uma patologia específica.

Os resultados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados de testes de diagnóstico, achados clínicos e histórico médico do paciente.

MÉTODO & PRINCIPIO (9)

Enzimático / PAP – Ponto final.



COMPOSICIÓN

Reactivo : R

Tampón de Good, pH 6.7

Fenol 24 mmol/L

Amino-4-antipirina 0.5 mmol/L

Colesterol esterase ≥ 180 U/L

Colesterol oxidase ≥ 200 U/L

Peroxidase ≥ 1 000 U/L

Ácido de sódio < 0.1 % (p/p)

También contém surfactantes e sais de magnésio para um ótimo desempenho.

Padro: Std (Ref : CHSL-0497/0507/0707)

Colesterol 200 mg/dL

5.17 mmol/L

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- CALI-0590 ELICAL 2
- CONT-0060 ELITROL I
- CONT-0160 ELITROL II
- Solução salina normal (NaCl 9 g/L).
- Analisador automático ou semi-automático.
- Equipamento geral de laboratório (por exemplo, pipeta...).
- Não utilize materiais que não são necessários, tal como indicado acima.

PRECAUÇÕES DE USO E AVISOS

- Consulte a ficha de dados de segurança (SDS) para obter um manuseio adequado.

- O reagente R contém ácido de sódio que pode reagir com o chumbo ou cobre das canalizações formando ácidos metálicos explosivos. Ao manusear estes reagentes lave as mãos sempre com grandes quantidades de água para evitar a produção de ácido.

- Utilize as precauções normais e siga as boas práticas de laboratório.

- Utilizar material de laboratório limpo ou destinado a uma única utilização de modo a evitar qualquer contaminação.

ESTABILIDADE

Conservar a 2-8 °C e ao abrigo da luz. Não congelar. Não utilizar após as datas de validade indicadas nos rótulos dos frascos.

O padrão deve ser imediatamente tampado para evitar a contaminação e evaporação.

Estabilidade em equipamentos:

A estabilidade a bordo é específica a cada equipamento (Consultar § DESEMPENHO)

PREPARAÇÃO

O reagente e o padrão estão prontos a usar.

DETERIORAÇÃO DO PRODUTO

- O produto deve ser claro. Qualquer turbidez seria sinal de deterioração do produto.

- Não use o produto se houver evidência visível de contaminação ou dano (por exemplo, partículas).

- Danos ao recipiente de produto podem afetar o desempenho do produto. Não use o produto se houver evidência física de deterioração (por exemplo, vazamentos ou recipientes perfurados).

AMOSTRAS

Amostras (1,2)

- Suero.

- Plasma (heparina de litio).

- O uso de qualquer outro tipo de amostra deve ser validado pelo laboratório.

Aviso e precauções

- As amostras armazenadas devem ser adequadamente misturadas em um misturador de vórtice antes de serem testadas. (1)

- Uma repetição do perfil lipídico em uma amostra de jejum pode ser realizada nos casos em que um resultado de triglicéridos sem jejum > 400 mg/dL (4.5 mmol/L) ou hipertrigliceridemia é conhecido. (4)

- As amostras devem ser coletadas de acordo com as Boas Práticas de Laboratório e com as diretrizes apropriadas que podem estar em vigor.

Armazenamento e estabilidade (5)

- 7 dias a 2-8 °C.

- 3 meses a -20 °C.

VALORES DE REFERÊNCIAS (3)

As publicações mais recentes recomendam a adaptação dos limites de colesterol total como parte de uma avaliação de risco geral. A nível laboratorial, a Federação Europeia de Química Clínica e Medicina Laboratorial (EFLM) recomenda que as seguintes concentrações sejam comunicadas como anormais:

Soro/plasma	mg/dL	mmol/L
	≥ 190	≥ 5.0

Nota: Os laboratórios devem seguir as recomendações aplicáveis localmente para valores lipídicos, caso sejam diferentes dos relatados acima.

PROCEDIMIENTO

Procedimiento manual

- Comprimento de onda : 505 nm
- Percurso óptico : 7 cm
- Relação Amostra/Reagente : 1:100
- Temperatura : 37 °C
- Ler comparando com o branco de reagente

	CALIBRAÇÃO	DOSAÇÃO
Reagente R	1 000 µL	1 000 µL
Padro/Calibrador	10 µL	-
Amostra	-	10 µL

Misturar e ler as absorbâncias (A) após 5 minutos.

Procedimiento automático

Estes reagentes podem ser utilizados em vários analisadores automáticos. Para os analisadores ELITech Selectra, as aplicações validadas estão disponíveis mediante solitação. Com o Selectra TouchPro, utilize a aplicação incluída no código de barras disponível no final deste folheto.

Informação de configuração importante:
O Reagente CHOLESTEROL SL pode ser levemente contaminado pela MAGNÉSÍUM XB em Selectra ProM e ProXL.
Para evitar a contaminação nestes equipamentos, programe as seguintes incompatibilidades:

Logiciel	Menu	Paramètre
TouchPro	Incompatibilidades de Água	Incompatibilidade/ CHOLESTEROL - MAGNÉSÍUM
Autres	Incompatibilidade de Água	CHOLESTEROL - MAGNÉSÍUM

Para outros analisadores Selectra Pro: repita qualquer resultado muito fora do intervalo esperado após programar uma lavagem com água.

CÁLCULO

(A) Amostra x n n = concentração do padrão/ Calibrador
(A) Padrão/ Calibrador
Fator de conversão: mg/dL x 0,0259 = mmol/L
mg/dL x 0,01 = g/L

CALIBRAÇÃO

Para referências CHSL-0497/0607/0707: ELICAL 2 ou o padrão Cholesterol Standard 200 mg/dL são rastreáveis relativamente ao método de referência ID-GC-MS (Diluição de Isótopos + Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa).
Para referências CHSL-0250/0455/0500/0700: ELICAL 2, e é rastreável relativamente ao método de referência ID-GC-MS (Diluição de Isótopos + Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa).

Frequência de calibração: A frequência de calibração é específica a cada equipamento (consultar § DESEMPENHO).

CONTROLE DE QUALIDADE

Recomenda-se o uso de soros de controle de qualidade, como ELITROL I e ELITROL II, para monitorar o desempenho do ensaio.
Os controles devem ser executados:
- antes de analisar amostras de pacientes,
- pelo menos uma vez por dia,
- após cada calibração,
- e/ou de acordo com os requisitos laboratoriais e regulamentares.

Os resultados devem estar dentro dos intervalos definidos. Se os valores ficarem fora dos intervalos definidos, cada laboratório deve tomar as medidas corretivas necessárias.

TRATAMENTO DOS RESÍDUOS

O descarte de todo material residual deve estar de acordo com os requisitos regulamentares locais, estaduais e federais (consulte a Ficha de dados de segurança (SDS)).

DESEMPENHO

Os desempenhos foram obtidos no Selectra ProM, segundo as recomendações técnicas do CLSI, sob condições ambientais controladas.

- Precisão de medição
20 - 600 mg/dL (0,52 - 16,52 mmol/L).
As amostras com maiores concentrações devem ser diluídas 1:5 com solução de NaCl 9 g/L e ensaiado novamente. Este procedimento estende a faixa de medição até 3000 mg/dL (77,59 mmol/L).
Não relatar resultados fora do intervalo de medição.

Para utilizadores do Selectra TouchPro, a função de «diluir» realiza a diluição de amostras automaticamente. Os resultados são tomados em consideração na diluição.

- Limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ)

LoD = 1 mg/dL (0,03 mmol/L)
LoQ = 10 mg/dL (0,26 mmol/L)

- Precisão
Dados de imprecisão foram obtidos em 2 analisadores Selectra ProM ao longo de 20 dias (2 corridas por dia, testes realizados em duplicata).
Os resultados representativos são apresentados abaixo.

	n	Média		Intra-série CV (%)	Total
		mg/dL	mmol/L		
Nível 1	80	115	2,97	1,1	2,1
Nível 2	80	184	4,76	0,7	1,9
Nível 3	80	292	7,55	1,9	2,7

- Correlação
Foi realizado um estudo comparativo entre o reagente CHOLESTEROL SL em um analisador Selectra ProM e um sistema semelhante disponível com o certificado CRMLN em 100 amostras de soro humano.
As concentrações da amostra variaram de 20 para 575 mg/dL (0,52 - 14,87 mmol/L).
Os resultados são os seguintes:
Coeficiente de correlação: (r) = 0,999
Regressão linear: y = 1,016 x + 0 mg/dL.

- Limitações/interferências
Estudos foram realizados para determinar o nível de interferência de diferentes compostos.
Os seguintes níveis de colesterol total foram testados: 116 e 309 mg/dL.
Uma interferência não significativa é definida por uma recuperação \pm 10% do valor inicial.
Bilirrubina não conjugada: Nenhuma interferência significativa até 6,0 mg/dL (103 μ mol/L).
Bilirrubina conjugada: Nenhuma interferência significativa até 5,9 mg/dL (101 μ mol/L).
Hemoglobina: Nenhuma interferência significativa até 300 mg/dL.
Turvação: Nenhuma interferência significativa até 614 mg/dL (6,94 mmol/L) equivalente de triglicéidos.
Ácido ascórbico: Nenhuma interferência significativa até 4,0 mg/dL.
Metilopa: Nenhuma interferência significativa até 1,6 mg/dL.
Ácido úrico: Nenhuma interferência significativa até 23,7 mg/dL (141,0 μ mol/L).
- Não use amostras ictericas ou hemolisadas.

- Em casos muito raros, as gamopatias monoclonais (mieloma múltiplo), em particular, tipo IgM (macroglobulinemia de Waldenström) podem causar resultados não confiáveis.⁶⁶

- Os resultados podem ser falsamente reduzidos em níveis significativos na amostra de NAC (N-acetilcisteína), NAPQI (metabólito do acetaminofeno (paracetamol)) ou metanzolol.

- Muitas outras substâncias e drogas podem interferir. Alguns deles estão referenciados em análises publicadas por Young.⁶⁶

- Estabilidade a bordo / frequência de calibração
Estabilidade a bordo: 28 dias
Frequência de calibração: 28 dias
Recalibre quando os lotes de reagentes mudarem, quando os resultados do controle de qualidade estiverem fora da faixa estabelecida e após uma operação de manutenção.

Estes desempenhos foram obtidos utilizando o analisador ELITech Selectra ProM. Os resultados podem variar se um instrumento diferente ou um procedimento manual for usado.
Os desempenhos de aplicações não validados pela ELITech não são garantidos e devem ser definidos pelo usuário.

DECLARAÇÃO DE INCIDENTE GRAVE

Notifique o fabricante (através do seu distribuidor) e a autoridade competente do Estado-Membro da união europeia em que o usuário e / ou o paciente está estabelecido, de qualquer incidente grave que tenha ocorrido em relação ao dispositivo.
Para outras jurisdições, a declaração de incidente grave deve estar de acordo com os requisitos regulamentares locais, estaduais e federais.
Ao relatar um incidente grave, você fornece informações que podem contribuir para a segurança de dispositivos médicos in vitro.

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Entre em contato com o seu distribuidor local ou com a ELITech Clinical Systems SAS.
(CSsupport@elitechgroup.com).

BIBLIOGRAPHIE/BIBLIOGRAPHY

BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAFIA

- Ritai, N., Wamick, G.R., Remaley, A.T. Lipids, lipoproteins, apolipoproteins and other cardiovascular risk factors. *Text Fundamentals of Clinical Chemistry*, 6th Ed., Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E. (W.B. Saunders eds.) (2008), 402.
- Burnett, J.R. Coronary Artery Disease: Lipid metabolism. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*, 5th Ed., Kaplan, L.A., Pesce, A.J., (Mosby Inc. eds.) (2010), 691 and appendix.
- Langlois, M.R., et al. for the European Atherosclerosis Society (EAS) and the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Joint Consensus Initiative. *Clin Chem Lab Med.* (2020), 58, 496.
- Alain, C.C., et al. *Clin. Chem.*, (1974), 20, 470.
- Guder, W.G., et al. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations and stability of blood, plasma and serum samples. (2002). WHO/DE/ LAB/99.1 Rev.2.

- Berth, M. & Delanghe, J. Protein precipitation as a possible important pitfall in the clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobulins: 2 case reports and a review of literature. *Acta Clin Belg.* (2004), 59, 263.
- Young, D.S. *Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests*, 2nd Ed., AACC Press, (1997).
- Young D.S., *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 4th Ed., AACC Press, (1995).

SYMBOLS/SYMBOLS/ SIMBOLOS/SIMBOLOS

- Les symboles utilisés sont décrits dans la norme ISO 15223-1 hormis ceux présentés ci-dessous.
- Symbols used are defined on ISO 15223-1 standard, except those presented below.
- Los símbolos utilizados son descritos en la norma ISO 15223-1 a la excepción de los presentados a continuación.
- Os símbolos utilizados são definidos na norma ISO 15223-1, exceto os apresentados abaixo.

CONT	Content Content Contiene Conteúdo
R	Réactif Reagent Reactivo Reagente
Std	Standard Standard Estándar Padrão
•	Modification par rapport à la version précédente Modification from previous version Modificación con respecto a la versión anterior Modificação relativamente à versão anterior
CE	Conformité Européenne European Conformity Conformidad Europea Conformidade Europeia

Importante Note /Nota importante

- Uniquement pour les ref. CHSL-0250/0455, utilisée(s) avec le logiciel Selectra TouchPro.
- voir § PROCÉDURE: Risque de contamination

- Only for ref. CHSL-0250/0455, used with Selectra TouchPro software.
- see § PROCEDURE: Contamination risk

- Únicamente para la (las) ref. CHSL-0250/0455, utilizada(s) con el software Selectra TouchPro.
- vea § PROCEDIMIENTO: Riesgo de contaminación

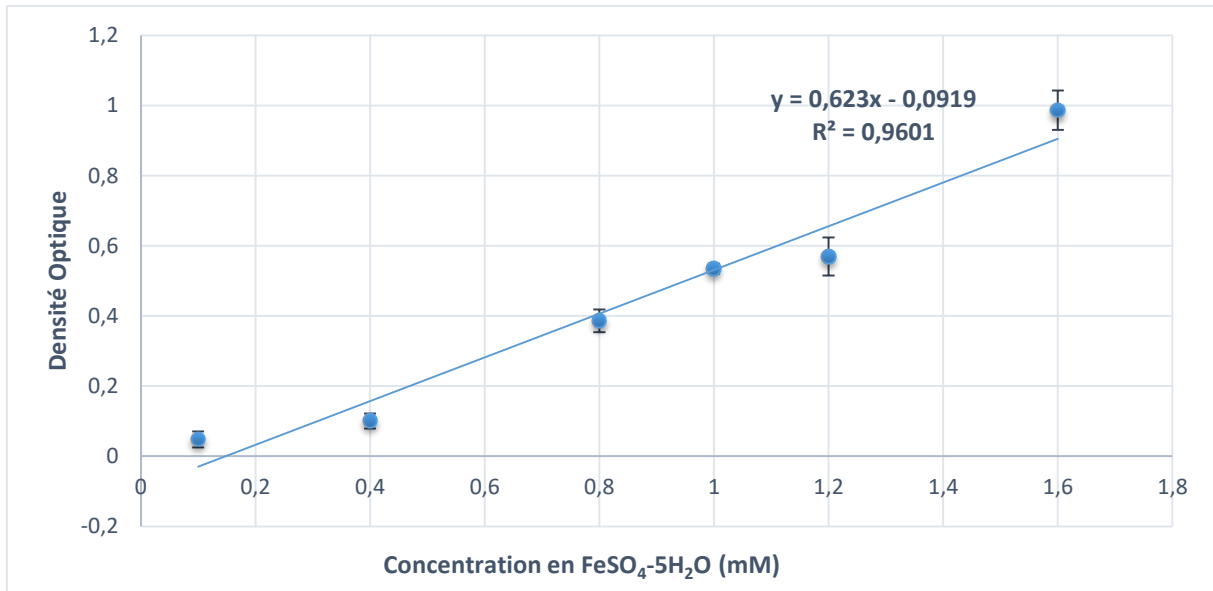
- Somente para ref. CHSL-0250/0455, usado(s) com o Selectra TouchPro.
- verificar § PROCEDIMENTO: Risco de contaminação

CHSL



Cholesterol 0
280 FIT-CHSL

Annexe 3 : Courbe étalon du $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.



Annexe 4 : Courbe étalon du GSH

