الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالى و البحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

جــامعــة محمد الصديق بن يحيـ جيجلــ Université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire



كلية علوم الطبيعة و الحياة قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en biologie

Option : Pharmacologie Expérimentale

Thème

Effet de la propolis sur l'hépatotoxicité de l'association taxotère-doxorubicine

Membres de Jury

Présidente : M^{me} MEZAHEM

Encadreur : M^{me} ROUIBAH Hassiba **Examinatrice :** M^{elle} DERAÏ El Hadjla

Invité: Pr. LAHOUEL Mesbah

Présenté par :

BOUCHELIT Bouchra

KEMEL Amira

SAYOUD Fayza

Session Juin 2017

Remerciements

Au terme de ce travail:

D'abord, nous remercions **Dieu** le tout puissant. C'est grâce à lui qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail et qui nous a toujours guider vers le bon chemin.

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à M ^{me} Rouibah Hassiba notre encadreur et Mr. Lahouel Masbah, Professeur à l'université de Jijel, pour leurs précieux conseils, leurs incessants encouragements et surtout leurs grande disponibilité

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury M ^{elle} **Derai Elhadjela** et Mme **Mezahem** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous remercions vivement M^{me} **Kebsa Widad**, pour son aide précieuse sans oublier tous ceux qui nous ont aidés au niveau du laboratoire de pharmacologie et pour sa grande gentillesse et sa disponibilité.

Nous remercions aussi tous les collègues et l'équipe qui nous accompagne dans le laboratoire de Toxicologie Moléculaire, pour leurs remarques et conseils, mais aussi pour l'ambiance amicale et studieuse qu'ils ont su créer.

Amira

Bouchra

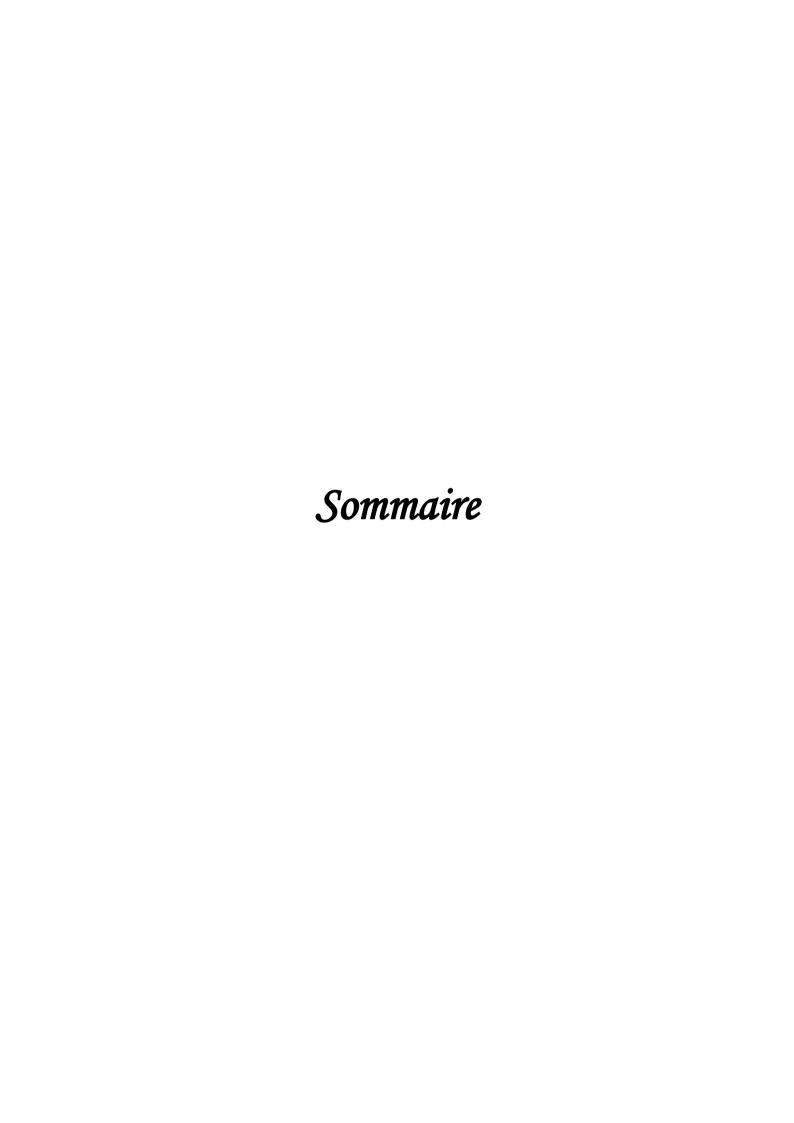
Fayza

Abréviations

- **ABCB1:** ATP Binding Cassette Subfamily B member 1.
- ABCC2: ATP Binding Cassette
 Subfamily C member 2.
- ADN: Acide Désoxyribonucléique.
- **ALAT:** Alanine Aminotransférase.
- **AMPc:** Adénosine Monophosphate cyclique.
- **ARN:** Acide Ribonucléique.
- **ASAT:** Aspartate Aminotransférase.
- **ATP:** Adénosine Triphosphate.
- **Bax:** Protéine Bcl-2–associated X.
- **Bcl2:** B-cell lymphoma 2(lymphome à cellules B).
- **Bcl-xl:** B-cell lymphoma-extra-large.
- **BSA:** Serum Albumin Bovine.
- **BVR**: Biliverdine Réductase.
- **CAT:** Catalase.
- **CCl4**: Carbon Tetrachloride.
- **CDNB:**1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene.
- **CREB3L1:** cAMP Responsive Element Binding protein 3 Like 1.
- **CYP450:** Cytochrom P450.
- **CYP3A4**: Cytochrome P450 3A4.
- **CYP3A5**: Cytochrome P450 3A5.
- **Cyt c:** Cytochrome c.
- **DMSO:** Diméthyl sulfoxide.
- **DO:** Densité optique.
- **DOX:** Doxorubicin.
- **DPPH**°:2,2-Diphenyl-1-picrylhyd.
- **DTX:**Docetaxel.

- **DTNB**: Acide 5,5'-Dithiobis -2 Nitrobenzoique.
- **EEP**: Extrait Ethanolique de Propolis.
- **EDTA**: Ethylène Diamine Tétra Acétique.
- **ERO**: Espèce Réactifs de l'Oxygène.
- **GDP**: Guanosine Diphosphate.
- **GOT**: Glutamate-oxaloacétate transaminase
- **GPT**: Glutamate-Pyruvate Transaminase.
- **GSH**: Glutathion réduit.
- **GSSG**: Glutathion oxydé.
- **GST**: Glutathion-S-Transferase.
- **GTP:** Guanosine Triphosphate.
- **H2O2:** Peroxide d'Hydrogène.
- **HO**⁻: Radicale Hydroxyle.
- **IV**: Voie Intraveineuse.
- **KCL**: Chlorure de Potassium.
- **LDH**: Lactate Déshydrogénase.
- LDL: Lipoprotéines de Densité Légère.
- MDA: Malondialdéhyde.
- **MDH**: Malate Déshydrogénase.
- **NADPH**: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit.
- **NBT:** Nitro Blue Tetrazolium.
- **NO:** Oxide Nitrique.
- **O2•-:** Anion superoxyde.
- **PARP1:** Poly [ADP-ribose] Polymerase 1
- **PAL:** Phosphatase Alcaline.
- POL: Péroxidationlipidique.
- **P53**: Protéine P53.
- **ROS:** Reactive Oxygen Species.
- **RNS**: Espèce Réactif d'Azote.

- **SOD**: Superoxyde Dismutase.
- **TBA**: Acide Thiobarbéturique
- **TBARS**: Acide Thiobarbiturique.
- TCA: Acide Trichloroacétique
- **TEP**: Tetraetoxypropane.
- **TNB**: Acide Thionitrobenzoique.
- **TX**: Taxotère.
- $\bullet \quad \gamma\text{-}GT: \text{Gamma-Glutamyl-Transférase} \\$



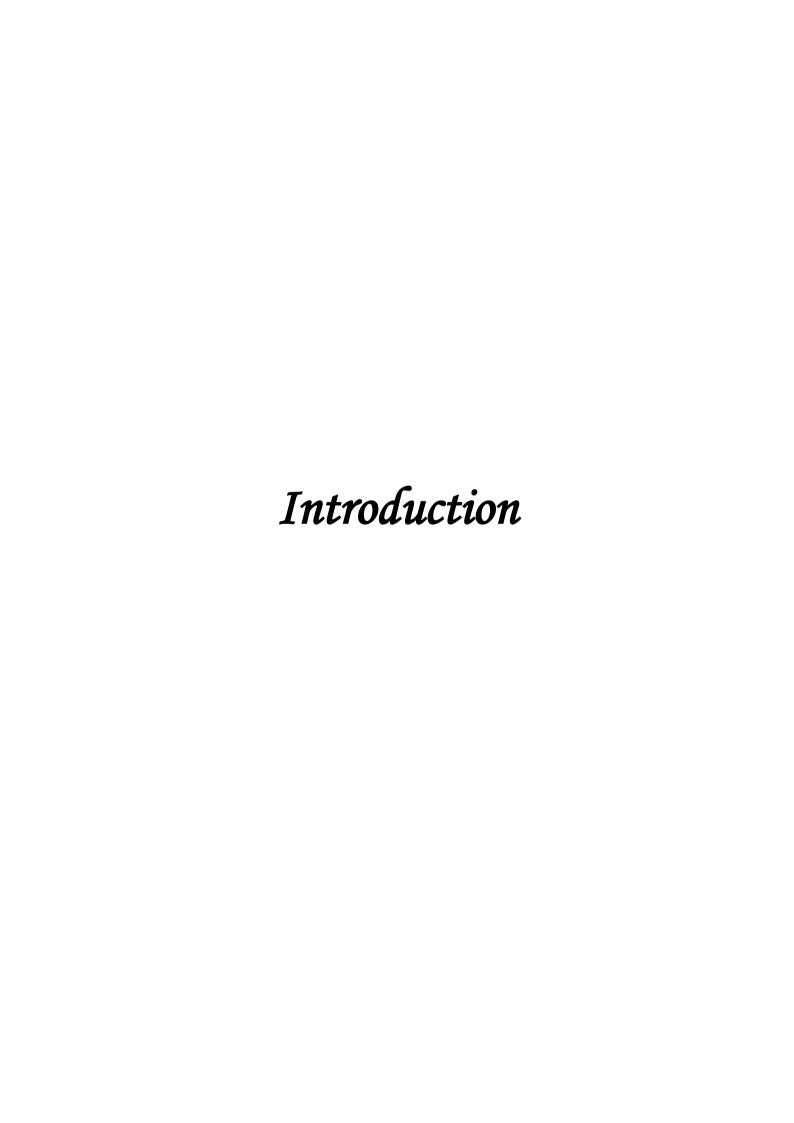
Liste des Abréviationsi				
Introduction				
Analyse bibliographique				
Chapitre I : Place de la Doxorubicine et du Taxotère dans le traitement du cancer				
I.1.Doxorubicine				
I.1.1. Structure de la doxorubicine				
I.1.2. Pharmacocénitique de la Doxorubicine				
I.1.3. Mécanisme antitumoral et cytotoxique de la doxorubicine				
I.2.Taxotere				
I.2.1. Structure de taxotère				
I.2.2. Pharmacocénitique du Taxotère				
I.2.3. Mécanisme d'action du taxotère				
Chapitre II : Hépatotoxicité de la doxorubicine et du taxotère				
II.1. Hépatotoxicité de la Doxorubicine				
II.2. Hépatotoxicité du Taxotère				
II.3. Sémiologie hépatique dans le cas de l'hépatotoxicité				
II.3.1. La bilirubine				
II.3.2. Les transaminases				
II.3.3. La phosphatase alcaline (PAL)				
II.3.4. Gamma-glutamyl-transférase (γ-GT)				
Chapitre III : Propolis et Polyphénols				
III.1. Les polyphénols				
III.2. La propolis				
III.2.1. Origine botanique de la propolis				
III.2.2. Composition chimique				
III.2.3. Activités biologiques de la propolis				

Partie pratique

Chapitre IV. Matériel et Méthodes

Partie I. Etude phytochimique de la propolis	17
1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes	17
2. Etude de pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de la propolis	18
Partie II. Etude in vivo de l'effet de la propolis	19
1. Entretien des animaux	19
2. Traitement des animaux	19
3. Prélèvement du sang	19
4. Sacrifice et prélèvement du foie	19
5. Dosage des paramètres sériques	20
5.1. Dosage des transaminases (ALAT/ASAT)	20
5.2. Dosage de la bilirubine	22
6. Dosage des marqueurs du stress oxydatif	22
6.1. Préparation de la fraction cytosolique	22
6.2. Dosage des protéines	23
6.3. La peroxydation lipidique (MDA)	23
6.4. Dosage du glutathion (GSH)	24
6.5. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase	24
6.6. Mesure de l'activité enzymatique de superoxydedismutase (SOD)	25
6.7. Mesure de l'activité enzymatique de la GST	25
7. Evaluation statistique	26
Chapitre V : Résultats et Discussion	
Partie I. Etude phytocmique de la propolis	27
1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes	27
2. Etude de pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de la propolis	28
Partie II. Etude in vivo de l'effet de la propolis	29
1. Suivi du comportement des animaux	29
2. Influence du traitement sur le poids corporel des rats	29
3. Influence du traitement sur le poids absolu du foie des rats	31

4. Variations des paramètres sériques	32
4.1. Les transaminases	32
4.2. La bilirubine directe	35
5. Variations des paramètres du stress	36
5.1. Influence du traitement sur le taux de MDA cytosolique	36
5.2. Effet de la propolis sur le niveau cytosolique de GSH	38
5.3. Effet de la propolis sur l'activité enzymatique de la catalase	40
5.4. Influence du traitement sur l'activité enzymatique du super oxyde dismutase	41
5.5. Effet de la propolis sur l'activité enzymatique de la GST	43
Conclusion	45
Références bibliographiques	
Annexes	



La chimiothérapie est de loin l'une des principales méthodes utilisées dans le traitement du cancer, dont l'efficacité est généralement élevée en utilisant une combinaison de différents types de médicaments antinéoplasiques (Fang *et al.*, 2014). Cependant, la chimiothérapie peut être également à l'origine de différentes toxicités sur divers tissus normaux de l'organisme en raison de sa faible sélectivité vis-à-vis des tissus normaux et des tissus cancéreux (Murialdo *et al.*, 2014).

A ce titre, le foie est particulièrement exposé à l'action de presque l'ensemble des substances utilisées en chimiothérapie. Il est le centre du métabolisme médicamenteux et de la bioconversion, riche en diverses enzymes de biotransformation. La bioconversion des médicaments dans le foie génère habituellement des produits métaboliques inactifs qui sont excrétés du corps, mais peuvent également générer des métabolites toxiques (Liu *et al.*, 2013).

La combinaison de taxanes (taxotère) avec la doxorubicine est l'un des nouveaux protocoles de traitement du cancer du sein avancé et métastatique et d'autres tumeurs solides. De façon similaire à d'autres agents antinéoplasiques, ils provoquent de nombreux effets secondaires. Certains articles récents ont été consacrés aux dommages du foie causés par ces médicaments (Field *et al.*, 2008). La combinaison de la doxorubicine avec le taxotère augmente le stress au niveau du foie par rapport au traitement en monothérapie (Pieniążek*et al.*, 2013). Cependant, très peu ou pas d'études détaillées sur les mécanismes moléculaires des effets hépatotoxiques du traitement combiné doxorubicine-taxanes (taxotère) n'ont été publiées jusqu'à présent. En mars 2017, l'agence française du médicament a signalé la mortalité d'une cinquantaine de patientes sous traitement au taxotère sans préciser les mécanismes toxiques.

Par ailleurs, des études récentes suggèrent que la combinaison du médicament chimiothérapeutique avec un antioxydant puissant pourrait être l'approche appropriée pour réduire les effets secondaires toxiques des agents antinéoplasiques. La propolis est une substance résineuse collectée par les abeilles à partir de différentes plantes utilisées comme remède naturel en médecine populaire depuis le temps reculés (Ghisalberti, 1979). Plusieurs études ont montré l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité hépatique de la doxorubicine en monothérapie et en combinaison avec la vinblastine (Benguedouar *et al.*, 2008; Singla *et al.*, 2014), mais jusqu'à présent aucune étude n'a été faite sur son effet protecteur contre la toxicité hépatique de l'association taxotère-doxorubicine.

Notre étude est alors une contribution à l'évaluation de la toxicité hépatique de l'association taxotère-doxorubicine d'une part et la mesure de l'effet protecteur potentiel de la propolis d'Algérie contre cette toxicité d'autre part.

Analyse Bibliographique

Chapitre I: Place de la Doxorubicine et du Taxotère dans le traitement du cancer

I.1. Doxorubicine

I.1.1. Structure de la doxorubicine

La doxorubicine est le chef de file de la famille des anthracyclines, antibiotique d'origine naturelle extrait de levures du genre *Streptomyces peucetius var. caesius* (Abraham *et al.*, 2005). Elle possède un large spectre anticancéreux y compris les leucémies, les lymphomes (maladie de Hodgkin) et les tumeurs solides (cancer du sein et de l'ovaire, sarcomes osseux et tissulaires, neuroblastomes) (Tacar *et al.*, 2013).

La doxorubicine est un tétracycle portant une fraction aminoglycoside. La partie aglyconique est composée de quatre cycles avec une quinone-hydroquinone adjacente (anneaux C et B). Le sucre, daunosamine, est lié au cycle A par une liaison glycosidique (Minotti *et al.*, 2004).

Figure 1. Structure de la doxorubicine (Abraham *et al.*, 2005).

I.1.2. Pharmacocinétique de la doxorubicine

L'administration de la doxorubicine se fait par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée, et en injection rapide, pour éviter une extravasation à côté de la veine qui endommagerait les tissus (Hande, 1998). Cependant, le foie reste l'organe majeur où la doxorubicine s'accumule alors que son taux au niveau du cœur est similaire aux autres organes (robert, 2005).

Les études pharmacocinétiques montrent que la doxorubicine a un profil multiphasique, la phase initiale de distribution est rapide avec un temps de demi-vie entre 5 et 30 min et la phase finale d'élimination est lente avec un temps de demi-vie de 30 à 40 h. Elle est liée à 75 % aux protéines plasmatiques, surtout l'albumine (Campos *et al.*, 2012). Elle est métabolisée, au niveau du foie, en doxorubicinol, son métabolite actif principal (Lal *et al.*, 2010). Elle est éliminée principalement par voie biliaire, mais également par voie rénale. En effet, 10 à 15 % de la dose administrée sont

retrouvées dans les urines, ce qui explique la coloration rouge de l'urine, quelques jours après le traitement (Hortobàgyi, 1997; Tannock *et al.*, 2004).

I .1.3. Mécanisme antitumoral et cytotoxique de la doxorubicine

Les anthracyclines dont la doxorubicine ne sont pas utilisée en tant qu'antibiotiques mais comme cytotoxiques. Elles possèdent une large activité anticancéreuse en raison de mécanismes d'action multiples.

I.1.3.1. Intercalation avec l'ADN

La doxorubicine peut s'intercaler dans l'ADN, avec l'inhibition de l'ADN et de l'ARN polymérase, et la transcription de l'ARN. Ce processus se produit lorsque la doxorubicine entre dans la cellule par diffusion en utilisant sa plus grande affinité pour se lier au protéasome du cytoplasme. Un complexe de protéases de doxorubicine est formé lorsque la doxorubicine se lie à la sous-unité 20S du protéasome, où elle est ensuite translocalisée à travers les pores nucléaires dans le noyau. La doxorubicine a une affinité plus élevée pour l'ADN nucléaire que le protéasome auquel elle est attachée, ce qui lui permet de se dissocier du protéasome et de se lier à l'ADN (Hilmer *et al.*, 2004; Tacar *et al.*, 2013).

I.1.3.2. Inhibition des topo-isomérases II

Les topoisomérases sont des enzymes chargées de réguler les conversions topologiques de l'ADN. La doxorubicine est un inhibiteur de topoisomérase qui s'intercale avec l'ADN pour bloquer la progression de la topoisomérase II et se lie également à la topoisomérase IIα et IIβ (Swift *et al.*, 2008; Mitry et Edwards, 2016).

I.1.3.3. Effet proapoptotique

L'action pro-apoptotique des anthracyclines dont la doxorubicine est en partie initiée par une voie de signalisation impliquant la protéine P53. Cette dernière se fixe sur l'ADN, y active la transcription du gène Bax (médiateur pro-apoptotique), qui induit la libération du cytochrome C par ouverture des pores mitochondriaux, et inhibe celle du gène Bcl-xL (médiateur anti-apoptotique) (Minotti *et al.*, 2004).

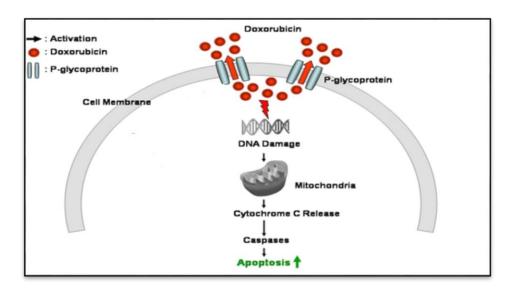


Figure 2. Effet proapoptotique de la doxorubicine (Kim et al., 2009).

De plus la doxorubicine, induit un stress oxydatif et des niveaux anormalement élevés de calcium dans la cellule, qui sont tous les deux connus pour stimuler la libération de cytochrome C et d'initier des voies apoptotiques par l'activation des caspases (Octavia *et al.*, 2012; Mitry et Edwards, 2016). Les dérivés de la doxorubicine favorisent également la libération du cytochrome C en s'accumulant dans la membrane mitochondriale interne pour perturber le transport d'électrons (Thorn *et al.*, 2011; Mitry et Edwards, 2016).

I.1.3.4. Stimulation de la synthèse des céramides

Des études récentes ont montrés que la doxorubicine provoque l'arrêt de la prolifération cellulaire indépendamment de la protéine p53. Dans le même sens, des rapports ont suggérés que la doxorubicine stimule la synthèse de novo de céramide, qui active à son tour CREB3L1 (cAMP Responsive Element Binding protein 3 Like 1), un facteur de transcription synthétisé comme précurseur membranaire. La doxorubicine stimule le clivage protéolytique de CREB3L1 par la protéase Site-1 et la protéase Site-2, permettant au domaine NH2-terminal de CREB3L1 d'entrer dans le noyau où il active la transcription des gènes codant pour les inhibiteurs du cycle cellulaire, y compris p21 (Denard *et al.*, 2012).

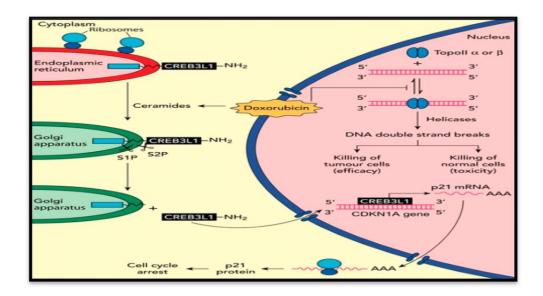


Figure 3. la stimulation de la synthèse des céramides par la doxorubicine (Denard et al., 2012).

I.1.3.5. La surexpression du PARP1 et l'induction de la nécrose

Des rapports récents ont confirmé que les lésions d'ADN induites par la doxorubicine provoquent une surexpression de PARP1 (Poly [ADP-ribose] Polymerase 1), favorisant l'hyper-activation mitochondriale et induisant la génération d'ATP cytosolique. Ces événements entraînent une nécrose et des modifications morphologiques, telles que le gonflement des cellules et la rupture de la membrane plasmique (Shin *et al.*, 2015).

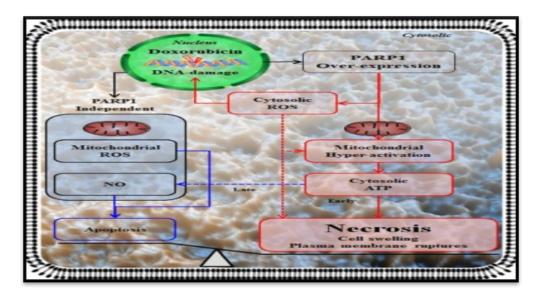


Figure 4. La cytotoxicité de la doxorubicine via la surexpression du PARP1 (Shin et al., 2015).

I.2. Le Taxotère

I.2.1. Structure de Taxotère

Le Taxotère ou docétaxel (deuxième génération des taxanes) est un médicament chimiothérapeutique largement utilisé dans le traitement de plusieurs tumeurs solides, y compris le cancer du sein, du poumon, de la tête et du cou, de l'estomac et de la prostate (Baker *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2015)

Il est dérivé de façon semi-synthétique par l'estérification d'une chaîne latérale à la 10-déacétylbaccatine III (précurseur du taxane inactif) (Ringel *et al.*, 1989; McGrogan *et al.*, 2008).

Figure 5. Structure du docétaxel (Fitzpatrick et Wheeler, 2003).

I.2.2. Pharmacocinétique du Taxotère

Le docétaxel ou taxotère est actuellement administré par voie intraveineuse. Comme les administrations orales du docétaxel pourraient être plus amicales, une recherche est en cours pour améliorer la biodisponibilité du taxotère. L'absorption gastro-intestinale du taxotère est limitée parce que ABCB1 (ATP Binding Cassette Subfamily B member 1) excrète directement le taxotère dans la lumière intestinale ou la bile (Baker *et al.*, 2006; Nieuweboer *et al.*, 2015). En outre, la biodisponibilité du taxotère est considérablement réduite par le premier effet du foie (Bardelmeijer *et al.*, 2002; Nieuweboer *et al.*, 2015).

Le taxotère a un profil cinétique linéaire dépendant de la dose après 70mg/m^2 . A la dose de 55mg/m^2 , le profil pharmacocinétique du taxotère est biphasique. A la dose de 100mg/m^2 , le profil est conforme au modèle pharmacocinétique à 3 compartiments, caractérisé par des demi-vies α , β et γ de 4 minutes, de 36 minutes et de 11,1 heures respectivement (Extra *et al.*,1993).

Le taxotère est principalement métabolisé via CYP3A4 et dans une moindre mesure par CYP3A5 et est transformé en quatre métabolites (Shou *et al.*, 1998 ; Nieuweboer *et al.*, 2015). Un groupe

méthyle de taxotère est oxydé en un métabolite M2 à base d'alcool primaire. Une oxydation supplémentaire de M2 conduit à la formation de métabolites instables de l'alcool qui conduiront à des diastéréoisomères (deux hydroxyxazolidinones cycliques) (M1 / M3) et à un métabolite cétone (M4). Les quatre métabolites ont montré une activité antitumorale limitée, ce qui suggère que le métabolisme du docétaxel est le principal facteur contribuant à l'inactivation du médicament (Nieuweboer *et al.*, 2015).

Le taxotère et ses métabolites sont principalement excrétés dans la bile via ABCB1 et le transport médié par ABCC2 (Huisman *et al.*, 2005; Nieuweboer *et al.*, 2015)

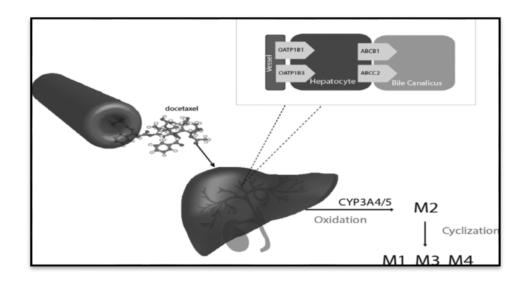


Figure 6. Métabolisme du taxotère (Nieuweboer *et al.*, 2015).

I.2.3. Mécanisme d'action du taxotère

I.2.3.1. Inhibition de la dépolymérisation des microtubules

Les microtubules sont les fibres constitutives du cytosquelette, impliqués également dans la formation de la plaque équatoriale et le déplacement polaire des chromosomes pendant la mitose. De ce fait ils doivent être considérés comme des poisons du fuseau (ou antimitotiques vrais), au même titre que les alcaloïdes de la pervenche (Morris et Fornier, 2008).

La tubuline est la protéine structurelle des microtubules, Elle est composée de 2 sous-unités, dont la responsable de la dynamique des microtubules est la sous unité β. Suivant sa concentration dans la cellule, elle va en diriger la polymérisation ou la dépolymérisation (Jordan et wilson, 2004). La tubuline possède 3 sites de liaison, qui sont les cibles de médicaments anticancéreux, dont le site de fixation des taxanes situé au niveau de la sous-unité β de la tubuline (Jordan et Wilson, 2004).

Le taxotère empêche la dépolymérisation des microtubules par liaison à la bêta-tubuline. Les microtubules sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, y compris la mitose, l'entretien de la forme cellulaire, le transport cellulaire et la signalisation cellulaire. La perturbation de ces processus peut conduire à l'arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2 / M et l'induction de l'apoptose (Cheetham et Petrylak, 2013; Schutz *et al.*, 2014; Kroon *et al.*, 2016).

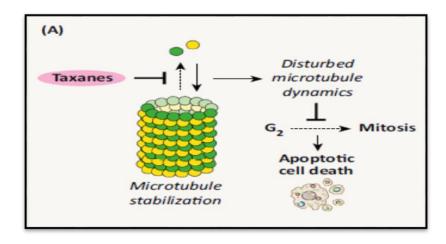


Figure 7. Dépolymérisation des microtubules via le taxotère (Kroon et al., 2016).

I.2.3.2. Induction de l'apoptose via l'inhibition du Bcl-2

Plusieurs études ont démontré que le taxotère et d'autres agents de ciblage des microtubules favorisent l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Roy et Fadlo, 2003). Le taxotère inhibe l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, Favorisant ainsi la mort cellulaire par l'intermédiaire de la libération de cytochrome C (cyt.C) médiée par le BAX (Haldar *et al.*, 1996; Kroon *et al.*, 2016).

Le taxotère est 10 à 100 fois plus puissant que le paclitaxel pour phosphoryler le Bcl-2, ce qui peut expliquer l'activité pro-apoptotique différentielle du taxotère par rapport au paclitaxel (Roy et Fadlo, 2003).

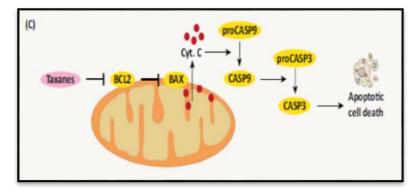


Figure 8. Induction de l'apoptose via les taxanes (Kroon *et al.*, 2016)

Chapitre II: Hépatotoxicité de la doxorubicine et du taxotère

Le foie est la plus grande glande du corps et, chez l'adulte, il mesure environ 1500 g, ce qui représente 2,5% du poids corporel total (Si-Tayeb *et al.*, 2010). Il occupe l'espace inférieur à droite et une partie du diaphragme gauche et est enveloppé par une membrane fibreuse connue sous le nom de capsule de Glisson. Les hépatocytes dominent la masse du foie et sont disposés dans des cordes de cellules entourant des capillaires sinusoïdaux individuels (Malarkey *et al.*, 2005), il est composé ainsi de cellules sinusoidales (cellules Kupffer, cellules endothéliales, cellules de Ilo et les lymphocytes) (Malik *et al.*, 2004). Le foie effectue le métabolisme des glucides, des protéines et des graisses et détoxifie les produits toxiques.

Malgré les questions persistantes concernant les étapes clés de la pathophysiologie, la plupart des chercheurs conviennent que l'étiologie de l'hépatotoxicité induite par le médicament et qui consiste en une action hépatique directe ou une toxicité causée par le médicament lui-même ou par l'un des métabolites de la drogue.

II.1. Hépatotoxicité de la doxorubicine

La doxorubicine a été largement utilisée au cours des dernières décennies pour traiter les patients atteints de différents cancers, y compris le carcinome hépatocellulaire basé sur sa capacité à tuer les cellules hépatiques transformées (Singal et Iliskovic, 2008).

Il est bien connu que la doxorubicine est capable d'interférer avec un certain nombre de fonctions biochimiques dans les cellules, mais la pathogenèse moléculaire précise des propriétés cytotoxiques de DOX est toujours controversée. À savoir, l'hépatotoxicité des médicaments peut résulter de la formation de radicaux libres et de la génération de ROS, tels que les anions superoxyde (O2⁻), les radicaux hydroxyles (OH) et le peroxyde d'hydrogène qui induisent la peroxydation lipidique et les dommages oxydatifs dans les cellules (Menna *et al.*, 2004). L'hépatotoxicité de DOX s'est avérée être associée à un stress oxydatif lié au cycle redox du médicament. Le mécanisme de génération du stress oxydatif induit par la doxorubicine dans le tissu hépatique n'a pas été complètement défini (Walaa *et al.*, 2014).

Dans l'environnement cellulaire, les anthracyclines et la doxorubicine en particulier, pourraient subir une activation redox par leur interaction avec plusieurs flavoprotéines oxydoréductases. Cette semiquinone peut rapidement être auto-oxydée en utilisant de l'oxygène moléculaire (O₂) en tant qu'accepteur d'électrons, en revenant au composé parent qui est alors disponible pour un nouveau cycle redox. Cette réaction conduit à la formation d'anions superoxyde (O₂·-), qui dans des conditions aérobies, peuvent être produits en quantités substantielles. Conduite par les superoxyde

dismutases (SOD), l'anion superoxyde est converti en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui, en présence de traces de métaux de transition tels que le fer ou le cuivre, sera converti en espèces oxydantes très réactives, qui est le radical hydroxyle (HO') (Vergely *et al.*, 2007).

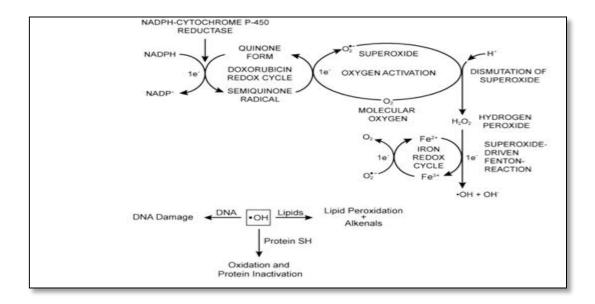


Figure 9. Génération des ROS par la doxorubicine (Sinha et Mason, 2015).

Ces mécanismes sont aggravés par le fait que les anthracyclines peuvent former directement des complexes avec du fer ferreux déplacés à partir de leurs sites de stockage à l'intérieur de la cellule. La doxorubicine peut lier directement le fer et, en présence d'oxygène, elle peut circuler entre les états de fer (II) et de fer (III). Le complexe de doxorubicine-fer (III) peut être réduit au complexe doxorubicine-fer (II) en présence d'agents réducteurs tels que le cytochrome P450 réductase NADPH, le glutathion et la cystéine. Ces réactions s'accompagnent de la formation d'O2. L'accumulation de radicaux O2. et de H2O2, est à l'origine d'une production accrue de radicaux hydroxyles (HO) par la voie de fenton et de Haber-Weiss (Delemasure *et al.*, 2006).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow HO' + HO' + Fe^{2+}$$
 $H_2O_2 + O_2'' (Fe^{2+} / Fe^{3+}) \longrightarrow HO' + HO' + O_2$

Une fois initié, le stress oxydatif induit des perturbations graves au niveau de la synthèse de l'ADN, de la synthèse de l'ARN dépendante de l'ADN et de la synthèse des protéines. Dans ce cas, ces altérations irréversibles entraînent une apoptose ou une nécrose des hépatocytes et une augmentation intensive des enzymes hépatiques dans le sang, principalement les alanines aminotransferasées (ALAT) et le aspartate aminotransferases (ASAT) (Saad *et al.*, 2001).

II.2. Hépatotoxicité du taxotère

Puisque le taxotère est métabolisé dans le foie, une altération de la fonction hépatique (telle que définie par des enzymes hépatiques élevées) peut entraîner une diminution de la clairance et une toxicité accrue (Jill et Pharm, 2000).

La preuve clinique d'une lésion hépatique induite par le docetaxel a été démontrée par l'augmentation des activités des enzymes sériques et des niveaux de bilirubine, et le développement de la jaunisse (Yeo *et al.*, 2002, Matovina-Brko *et al.*, 2014). Dans l'étude d'Alexandre *et al.* (2000), sur un total de 825 patients atteints de cancer du sein avancé traités avec du docétaxel (100 mg / m² toutes les trois semaines), 28% (217 patients) ont été enregistrés avec des anomalies mineures des transaminases et / ou les taux de phosphatase alcaline (PAL) alors que 9,6% (74 patients) ont montré des signes de dysfonction hépatique (taux de transaminases> 1,5 fois et PAL> trois fois).

D'autres études, il a été observé une diminution moyenne de 27 % de la clairance totale expliquant une toxicité accrue (Burris *et al.*, 1993 ; Hudis *et al.*, 1996 ; Slaviero *et al.*, 2004).

Des rapports expérimentaux récents, montrent également que le taxotère provoque des lésions hépatiques, qui se manifestent principalement par l'augmentation du niveau des enzymes sériques, y compris l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT), et par Des modifications histologiques, y compris la congestion du foie, la désorganisation des cordes hépatiques et la dégénérescence en ballonnet (Liu *et al.*, 2013).

Le stress oxydatif généré par les médicaments anticancéreux, y compris le taxotère dans le foie des rats a été indiqué. Il a été constaté que le docétaxel augmente les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS), et diminue d'une manière significative l'activité de la SOD (Li *et al.*, 2015).

II.3. La sémiologie hépatique dans le cas de l'hépatotoxicité

II.3.1. La bilirubine

C'est un pigment biliaire jaune rougeâtre issu de la dégradation de l'hémoglobine du sang (Hunter, 2006). La bilirubine peu hydrosoluble, est liée à l'albumine du sang et véhiculée jusqu'au foie, elle a été considérée comme un produit final naturel du métabolisme de ce dernier. Une étude antérieure a démontré que la bilirubine est une molécule anti-inflammatoire et antioxydante endogène dans le corps (Kapitulnik, 2000 ; Peng *et al.*, 2017).

II.3.2. Les transaminases

Les transaminases alanine-amino-tranférase (ALAT) et aspartate-amino-transférase (ASAT), catalysent le transfert d'un groupement amine à l'α-cétoglutarate pour donner respectivement du glutamate, du pyruvate ou de l'oxalo-acétate à partir d'alanine ou d'aspartate. Le coenzyme de cette réaction est la vitamine B6. Elles jouent un rôle fondamental dans le métabolisme des acides aminés et la néoglucogenèse (Amacher, 2002).

ALAT: l'ALAT se retrouve dans le rein, le cœur, les muscles et une concentration accrue dans le foie par rapport aux autres tissus du corps. L'ALAT est purement cytoplasmique catalysant la réaction de transamination. Tout type de lésion hépatique peut augmenter raisonnablement les niveaux d'ALAT (Mauro *et al.*, 2006).

ASAT: L'aspartate aminotransférases appelée aussi la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT), se retrouve en plus grande concentration dans le cœur par rapport à d'autres tissus du corps tels que le foie, le muscle squelettique et le rein. L'ASAT est retrouvée essentiellement dans le compartiment mitochondrial (Mauro *et al.*, 2006).

II.3.3. La phosphatase alcaline (PAL)

La phosphatase alcaline est associée à des membranes cellulaires dans de multiples tissus, en particulier des hépatocytes. Elle hydrolyse les monophosphatases à un pH alcalin. C'est principalement un marqueur des effets hépatobiliaires et de la cholestase (élévations modérées à marquées) (Ramaiah, 2007).

II.3.4. Gamma-glutamyl-transférase (γ-GT)

GGT est une enzyme microsomale présente dans les hépatocytes et les cellules épithéliales biliaires, les tubules rénaux, le pancréas et l'intestin. Il est également présent dans la membrane cellulaire effectuant le transport de peptides dans la cellule à travers la membrane cellulaire et impliqué dans le métabolisme du glutathion. L'activité GGT sérique est principalement attribuée au système hépatobiliaire, même si elle se retrouve dans une plus grande concentration dans le tissu rénal (Mauro *et al.*, 2006).

Chapitre III: Propolis et Polyphénols

III.1. Les polyphénols

Les polyphénols qui constituent une famille de molécules organiques, sont largement présents dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, comme l'indique leur nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire (Dai et Mumper, 2010). Plus de 8000 structures ont été identifiées (Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2011), allant de simples molécules comme les acides phénoliques à des substances hautement polymérisées comme les tanins (Dai et Mumper, 2010). Leur structure chimique se caractérise par la présence d'un ou plusieurs cycles aromatiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyle (Trotta et Scalia, 2017).

Les polyphénols peuvent être classés dans deux groupes principaux: flavonoïdes et non flavonoïdes (Tsao, 2010). Les flavonoïdes sont formés par deux anneaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné qui peut avoir différents états d'oxydation (Heim *et al.*, 2002). En outre, selon le degré d'oxydation de l'anneau central, les flavonoïdes peuvent être subdivisés en six sous-classes principales, à savoir les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavonones, les flavanols et les anthocyanidines. Les composés non flavonoïdes peuvent être subdivisés en quatre sous-classes principales: les acides phénoliques, les tanins, les stilbènes et les lignanes. Les polyphénols sont reconnus comme des substances antioxydantes puissantes, car ils ont montré qu'ils offrent une protection marquée contre le stress oxydatif (Gülçin, 2012) qui joue un rôle important dans de nombreuses conditions pathologiques (Quiñones *et al.*, 2013).

III.2. La propolis comme source des polyphénols

III.2.1. Origine botanique de la propolis

La propolis est une matière résineuse bien connue recueillie par les abeilles à partir des bourgeons et des exsudats des plantes, mélangée aux enzymes des abeilles, au pollen et à la cire. Les abeilles utilisent la propolis pour lisser les parois internes, sceller les trous dans leurs nids d'abeilles et couvrir les carcasses d'intrus qui sont morts à l'intérieur de la ruche, en évitant leur décomposition (Toreti *et al.*, 2013).

La propolis est un produit d'abeille d'origine végétale. Pour produire la propolis, les abeilles recueillir le matériel végétal et le mélanger avec de la cire. Il est désormais généralement admis que les abeilles collectent des matières végétales résineuses, produites par divers procédés botaniques, dans différentes parties des plantes: des matériaux lipophiles sur les feuilles et les bourgeons des feuilles, des mucilages, des gommes, des résines, des latex, etc (Bankova *et al.*, 2014).

Il est bien connu que dans les régions au climat tempéré. Les abeilles récoltent ses précieuses substances sur les bourgeons de Peupliers, les Bouleaux, les Aulnes, les Marronniers d'Inde, les frênes, les saules, les Epicéas et les chênes, etc (Bankova *et al.*, 2000). Dans les autres régions, il existe d'autre plantes à part celles citées avant telles que la *Macaranga Tanarius* en Okinawa (Kumazawa *et al.*, 2008).

III.2.2. Composition chimique

Généralement, les composants principaux connus de la propolis sont les acides aromatiques, les flavonoïdes, les acides diterpénoïdes, les composés phénoliques et les triterpénoïdes. Puisque les abeilles domestiques visitent les fleurs de différentes plantes, ces plantes sont la principale source de composés organiques dans la propolis lors de la formation de la propolis par la sécrétion et le métabolisme de l'abeille. La composition de la propolis est 30% de cire, 50% de résine et de baume végétal, 5% de pollen, 10% d'huiles essentielles et aromatiques et 5% d'autres substances (Shaheen et al., 2011; Athikomkulchai et al., 2013; Nina et al., 2016).

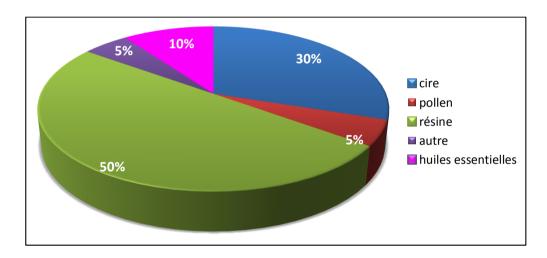


Figure 10. Composition chimique de la propolis (Shaheen *et al.*, 2011).

III.2.3. Activités biologiques de la propolis

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont démontré les actions biologiques et pharmacologiques antioxydante, et antitumorale de différents échantillons de propolis dans le monde entier révélant l'intérêt des chercheurs dans ce produit de l'abeille et son potentiel pour le développement de nouveaux médicaments (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

III.2.3.1. Effet antioxydant

Il est bien connu qu'un stimulus endogène, comme le métabolisme cellulaire et des agents exogènes

comme les UV, les toxines et les médicaments, entre autres, génèrent des espèces réactives d'oxygène (ROS), comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'anion superoxyde (O₂-), et l'ion hydroxyle (HO-), ainsi que des espèces réactives d'azote (RNS), en particulier l'oxyde nitrique (NO). Les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques, parmi d'autres biomolécules, lorsqu'ils sont exposés aux espèces réactives, subissent des modifications oxydatives qui modifient la cellule et entraînent sa mort (Viuda-Martos *et al.*, 2008; Sosa *et al.*, 2013).

Les extraits de propolis, composés de polyphénols différents, possédaient une activité antioxydante puissante (Scalbert *et al.*, 2005; Almaraz-Abarca *et al.*, 2007; Viuda-Martos *et al.*, 2008). L'activité antioxydante est exercée par l'inhibition de l'activité de certaines enzymes (par exemple, la xanthine oxydase, la protéine kinase C, l'oxydase d'acide ascorbique, la cyclooxygénase, la lipoxygénase, la Na ⁺ / K ⁺ ATPase et la phosphodiestérase AMPc) ce qui inhibe la production d'espèces ROS par piégeage des radicaux libres; en inhibant la peroxydation lipidique ou en chélatant les ions métalliques, principalement le fer et le cuivre, qui sont impliqués dans le processus de création de radicaux libres. La propolis peut potentialiser l'action des antioxydants (Kurek-Górecka *et al.*, 2014).

III.2.3.2. Effet anticancéreux

Le produit naturel de la propolis a suscité un intérêt croissant pour un grand nombre de chercheurs, car il contient une variété de composés phytochimiques qui peuvent agir à travers de multiples voies pour réduire le développement et d'autres caractéristiques malignes des cellules cancéreuses (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

Récemment, plusieurs études *in vitro* ont démontré une action cytotoxique de la propolis sur diverses cellules tumorales. Les études *in vivo* montrent également un potentiel dans le développement de nouveaux agents antitumoraux, puisque l'administration de propolis aux rats ne conduit pas à des effets secondaires détectables (Watanabe *et al.*, 2011). Ce produit naturel peut bloquer des voies de signalisation spécifiques de l'oncogène, ce qui entraîne une diminution de la prolifération et de la croissance cellulaire et peut également se produire en diminuant la population de cellules souches cancéreuses, en augmentant l'apoptose, en exerçant des effets antiangiogènes et en modulant le microenvironnement tumoral (Araújo *et al.*, 2011; Sawicka *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2013).

III.2.3.3. Effet anti-inflammatoire

L'inflammation est un événement qui se produit normalement en réponse à l'exposition constante aux stimuli environnementaux et endogènes ainsi qu'à des dommages accidentels. Plusieurs études ont associé différents types de propolis et ses divers constituants avec une activité anti-inflammatoire (Hu *et al.*, 2005 ; Naito *et al.*, 2007).

L'effet anti-inflammatoire de la propolis est dose-dépendant. Son mécanisme est sensiblement proche de celui de l'aspirine. Cet effet est dû à son action inhibitrice (principalement celle des flavonoïdes qu'elle contient) sur la prostaglandine synthétase, empêchant ainsi la synthèse des prostaglandines, composants responsables de la réaction inflammatoire (Silva-Carvalho *et al.*, 2015).

III.2.3.4. Effet cytoprotecteur

Plus à ses activités pharmacologiques, la propolis présente des effets préventifs. Son effet protecteur est considéré comme le résultat de ses propriétés antioxydantes ainsi que sa capacité à piéger les radicaux libres (kimoto *et al.*, 1999).

De nombreux travaux ont montré l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité des médicaments anticancéreux (Lahouel *et al.*, 2004). De plus, la propolis possède un effet hépatoprotecteur contre la toxicité du paracétamol (Won Seo *et al.*, 2003), du CCl4 (El-Khatib *et al.*, 2002) et de l'alcool (Lin *et al.*, 1999). D'autres études ont montré sa capacité à protéger les tissus contre les effets carcinogènes de certains molécules et produit chimiques (Borrelli *et al.*, 2002).





Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de toxicologie moléculaire de l'université de Jijel. Il concerne l'évaluation de l'effet protecteur de la propolis d'Algérie sur la toxicité hépatique induite par l'association taxotère-doxorubicine.

Partie I. Etude phytochimique de la propolis

1. Dosage des polyphénols totaux

Selon Singleton et Rossi., (1965) le dosage des polyphénols totaux s'effectue en utilisant le réactif folin-ciocalteu. L'interaction entre le folin-ciocalteu qui est un acide de couleur jaune et les résidus phénolique conduit à la formation d'un complexe coloré en bleu dont l'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des polyphénols dans l'extrait. Pour cela 500 μl de l'extrait dilué en 1/100^{éme}, 2.25 ml d'eau distillée et 250 μl du réactif folin-ciocalteu (5%) sont mélangés. Après 5 mn, 2 ml de Na₂CO₃ (bicarbonate de sodium) (7.5%) sont additionnés, puis le mélange est incubé pendant 60 mn à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite la densité optique (DO) est lue à 760 nm en utilisant un spectrophotomètre (spectrophotomètre UV. Visible UV mini 1240, SHIMDZU, china).

La teneur en composés phénoliques dans l'extrait est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique à différents concentration (200 μ g/ml, 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 25 μ g/ml, 12.5 μ g/ml). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de propolis.

2. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes par la méthode colorimétrique a été décrit en 2002 par Dewanto et al., Le dosage est basé sur la formation d'un complexe jaune entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium.

250 μ l de l'extrait dilué en $1/1000^{\rm éme}$ sont mélangés avec 75 μ l de Na_2NO_2 (5%), après 6 min, 150 μ l d'ALCL3 2% et 500 μ l de NaOH (1M) sont ajoutés, le volume est complété par 2.5 ml d'eau distillée, ensuite la DO est lue à 510 nm.

La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme équivalent de la quercétine par gramme de l'extrait, en utilisant une courbe d'étalonnage de la quercétrine à différents concentrations ($25\mu g/ml$; $50 \mu g/ml$; $100 \mu g/ml$; $200 \mu g/ml$). Tous les dosages sont réalisés 3fois.

3. Etude de pouvoir anti-radicalaire de l'extrait de la propolis

L'activité anti-radicalaire de la propolis a été évaluée *in vitro*, par le test au DPPH°. Le DPPH° (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH° est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH°, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon (Maataoui *et al.*, 2006).

Figure 11. Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl).

Pour cela, 0,25 ml de l'extrait de la propolis à différentes concentrations (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴,10⁻⁵, 10⁻⁶ μg/ml) sont additionnés à 0,75 ml de la solution méthanolique de DPPH°10⁻⁴ M. Après agitation et incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, la diminution de la DO est lue à 517 nm contre un blanc méthanol.

Le mélange contenue 0,25 ml de méthanol et 0,75 ml de DPPH° est considéré comme control négatif. La vitamine C est utilisée comme référence pour la comparaison de l'effet scavenger avec l'extrait à différentes concentrations (les mêmes concentrations que la propolis).

L'activité anti-radicalaire est exprimée en pourcentage de réduction de DPPH°, en utilisant la formule suivante :

$$I = [(A_B - A_A)/A_B] \times 100$$

Dont:

I : pourcentage d'inhibition.

A_B: Absorbance du control négatif.

A_A: absorbance de l'échantillon.

Partie II. Etude in vivo de l'effet hépatoprotecteur de la propolis

1. Entretien des animaux

Notre étude expérimentale a été réalisée sur des rats male sain de souches albinos d'un poids moyen de 170 g. Avant et après le traitement, les animaux sont placés dans des cages en plastique avec libre accès à la nourriture (croquettes) et à l'eau.

2. Traitement des animaux

Les rats ont été répartir en trois lots expérimentaux :

Lot 1(6rat): les rats (témoins) recevant 1ml de l'eau physiologique par voie orale pendant 5 jours.

Lot 2(6rats) : les rats recevant les médicaments anticancéreux (TX 75mg/ m², DOX 200 mg/m²) en combinaison sous forme d'une injection de 0,5ml par voie intraveineuse.

Lot 3(6rats): les rats recevant 1ml de la propolis à la dose quotidienne de 25mg/kg par voie orale pendant 5 jours, et 0,5ml de l'association TX-DOX (75 mg/ m², 200 mg/ m²) au 6 ème jour par voie intraveineuse.

3. Prélèvement du sang

Le sang est prélevé à 72 h, 14 jours et 21 jours après le traitement à l'aide d'un tube capillaire d'hématocrite à travers le sinus rétro-orbital des rats. Le sang récupéré dans des tubes héparinés, est ensuite centrifugé à 4000 rpm/min pendant 10 minutes (Centrifugeuse SIGMA 3-16 PK), et le plasma récupéré est aliquoté et conservé à une température de –20°C jusqu'au moment des analyses biochimiques.

4. Sacrifice et prélèvement du foie

A la fin de la période du traitement (21 jours) les rats sont euthanasiés par inhalation des vapeurs du l'éther. Ensuite, après laparotomie abdominale les foies sont prélevés et submergés dans l'eau physiologique pour drainer le sang. Enfin les foies sont pesés, étiquetés et stockés au congélateur à -20 °C pour le dosage des paramètres du stress oxydant.

5. Dosage des paramètres sériques

5.1. Dosage des transaminases

5.1.1. Dosage de l'alanine aminotransférase (ALAT)

L'alanine aminotransférase (ALAT) ou la glutamate-pyruvate transaminase (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'alanine au α-cétoglutarate formant le glutamate et

le pyruvate. Le pyruvate est réduit au lactate par la lactate-déshydrogénase (LDH) et le NADH+H⁺ selon les réactions suivantes :

Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'alanine aminotransférase (Murray, 1984).

Le dosage de l'aspartate aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne). Pour effectuer ce dosage un réactif de travail a été préparé en utilisant les réactifs présentée dans le tableau suivant :

Réactif 1:	TRIS pH 7,8	100 mM/L
Tampon	L-Alanine	500 mM/L
Réactif 2:	NADH	0,18 mM/L
Substrat	Lactate déshydrogénase (LDH)	1200 U/L
	α-cétoglutarate	15 mM/L

Pour cela un comprimé de R2 (Réf : 1001161) a été dissous dans 15ml de R1. Une fois le réactif de travail est préparé, 1ml de ce dernier est ajouté à 100µl d'échantillon, le mélange a été incubé pendant une minute à une température de 37°C, et la densité optique est mesurée ensuite à 340 nm pendant 3min.

L'activité catalytique de l'ALAT est calculée par la formule suivante :

Activité de ALAT
$$(U/L) = \Delta$$
 A/min X 1750

5.1.2. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT)

L'aspartate aminotransférase (ASAT) ou la glutamate-oxaloacétate transaminase (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α-cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH+H⁺ selon les réactions suivantes :

ASAT

Aspartate +
$$\alpha$$
-cétoglutarate

MDH

Oxaloacétate +NADH + H

Malate + NAD⁺

Le taux de la diminution de la concentration en NADH+H⁺, mesuré par photométrie, est proportionnel à l'activité catalytique de l'aspartate aminotransférase (Murray, 1984).

Le dosage de l'aspartate aminotransférase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne). Pour effectuer ce dosage un réactif de travail a été préparé en utilisant les réactifs présentée dans le tableau suivant :

Réactif 1:	TRIS pH 7,8	80 mM/L
Tampon	L-Aspartate	200 mM/L
Réactif 2:	NADH	0,18 mM/L
Substrat	Lactate déshydrogénase (LDH)	800 U/L
	Malate déshydrogénase (MDH)	600 U/L
	α-cétoglutarate	12 mM/L

Pour cela un comprimé de R2 (Réf : 1001161) a été dissous dans 15ml de R1. Une fois le réactif de travail est préparé, 1ml de ce dernier est ajouté à 100µl d'échantillon, le mélange a été incubé pendant une minute à une température de 37°C, et la densité optique est mesurée par la suite à 340 nm pendant 3min.

L'activité catalytique de l'ASAT est calculée par la formule suivante :

Activité de ASAT (U/L) =
$$\Delta$$
 A/min X 1750

5.2. Dosage de la bilirubine

La bilirubine et un pigment présent dans la bile et à plus faible concentration dans le sang. On distingue deux fractions de la bilirubine : la bilirubine libre (totale) el la bilirubine direct (conjuguée) c'est-à-dire transformée par le foie, avant d'être éliminée dans les urines. En présence de diméthyl sulfoxide (DMSO), L'acide sulfanilique réagit avec le nitrate de sodium pour donner l'acide sulfanilique diazoté, la bilirubine totale se couple avec l'acide sulfanilique diazoté pour

donner l'azobilirubine (Le dosage de la bilirubine directe se fait en absence de DMSO) selon la réaction suivante :

Ce composé est coloré par des méthodes photométriques. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de la bilirubine dans les échantillons, la densité optique est mesurée à 555 nm (Kaplan *et al.*, 1984). Le dosage de la bilirubine directe a été réalisé par la méthode colorimétrique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

Réactif 1 :	Acide sulfanilique	30 mM/L		
(D)	Acide chlorhydrique (HCl)	150 mM/L		
Réactif 3 :	Nitrite de sodium	29 mM/L		

Pour cela, 100 µl de l'échantillon ont été additionnée à 1,5 ml de R1 et 50 µl de R3, le mélange a été incubé pendant 5 minutes à température ambiante. Ensuite l'absorbance (A) de l'échantillon a été mesuré à 555 nm contre le blanc.

6. Estimation des biomarqueurs du stress oxydatif

6.1. Préparation de la fraction cytosolique

Pour la détermination des paramètres cytosoliques du foie, la fraction de ce dernier est préparée selon la méthode décrite par Iqbal *et al.* (2003). Pour cela 1 g du foie est coupé et homogénéisés avec 3 volumes du tampon phosphate (0.1M, pH7.4) contenant du KCl à 1.17% à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 mn à 4°C pour séparer les débris nucléaires. Le surnageant récupéré de cette centrifugation est également centrifugé à 9600 rpm à 4°C, pendant 30 mn. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source d'enzymes.

6.2. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées d'après la méthode de Bradford (1976). Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du bleu de Coomassie à 590 nm, après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la solution. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, et donc à la concentration en protéines dans l'échantillon.

Pour cela, une dilution a 1/2 de bleu de Coomassie a été effectuée, puis 1ml de ce colorant dilué a été ajouté à 5µl de l'échantillon dilués à 1/10ème. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min et la lecture a été lue à 590 nm. La concentration en protéines a été déterminée à partir d'une gamme étalon réalisé dans les mêmes conditions avec de l'albumine sérique bovine (BSA) à différents concentrations (de 0 à 1mg/ml).

6.3. Dosage de MDA cytosolique

Les taux de MDA cytosoliques ont été évalués selon la méthode d'Ohkawa *et al.*, (1979). Le principe de cette méthode est basé sur la formation d'un complexe coloré en rose à partir de la condensation d'une molécule de MDA avec deux molécules de thiobarbiturique (TBA).

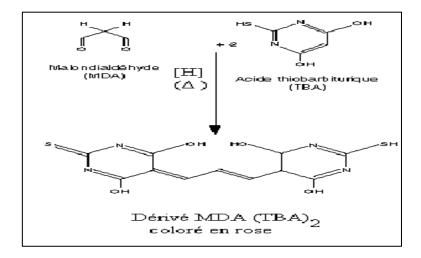


Figure 12. Principe de dosage du MDA

Pour le dosage, à 0,5 ml de l'homogénat 0,5 ml d'acide trichloracétique 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,67 % sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 2 ml de n-butanol. Après centrifugation à 3000 tours pendant 15 min, l'absorbance du surnageant a été mesuré à 530 nm. Les quantités de MDA sont exprimées en nmole/g de foie en utilisant une courbe standard de tetraetoxypropane (TEP).

6.4. Dosage du glutathion hépatique (GSH)

Le dosage du GSH est basé sur la méthode colorimétrique d'Ellman (1959). Le principe est basé sur l'oxydation du GSH par le 5, 5'- Dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB), ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm, selon la réaction suivante :

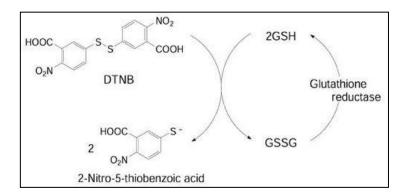


Figure 13. Principe de dosage du glutathion

Pour le dosage, 25 μ l de surnageant sont dilués dans 5 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 8). À 3 ml du mélange de dilution, 20 μ l de DTNB (0,01 M) sont additionnés. Après une incubation de 15 min à 25 ° C, l'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Les concentrations sont exprimées en mM . Elles sont déduites à partir d'une gamme étalon établie dans les mêmes conditions avec le glutathion.

6.5. La mesure de l'activité de la catalase

L'activité enzymatique de CAT a été estimée par la méthode de Clairborne (1985). Le principe est basé sur la disparition de $l'H_2O_2$ en présence de la source enzymatique dans la fraction cytosolique à 25 C° selon la réaction suivante :

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Le mélange réactionnel contenait 1ml de tampon phosphate (0,1 M, p H 7), 950 µl de Peroxyde d'hydrogène (0,019 M) et 50 µl de la fraction cytosolique. L'absorbance des échantillons a été mesurée par spectrophotométrie à 240 nm/1min. L'activité enzymatique est exprimée en UI / mg de protéine, et calculée selon la formule suivante :

$$K = (2,3033/T. log A_1/A_2) / mg de protéine$$

Sachant que : \mathbf{K} = Constant de vitesse de la réaction.

 A_1 =abs au temps 0 min.

 A_2 =abs après 1 min.

T = intervalle de temps en min.

6.6. Evaluation de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la SOD dans le cytosol a été évaluée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Le principe est basé sur la réduction de NBT par l'anoin Superoxyde en formazan. Selon la réaction suivante :

$$\begin{array}{c} \textbf{photor\'eaction} \\ \textbf{NBT} + \textbf{O}_2 & \longrightarrow & \textbf{formazon} \\ \end{array}$$

Pour cela 5 μl de la fraction cytosolique ont été ajoutés à 1 ml de milieu réactionnel (cyanure de sodium 2.10⁻⁵ M, solution EDTA 66.10⁻³ M, Solution NBT 1, 67.10⁻⁴ M, solution de riboflavine 2.10⁻⁶ M), et 100 μl de la méthionine. Le mélange a été exposé à une Lampe de 15W pendant 15 min. La formation du formazan était mesurée à 560 nm.

Le control est préparé dans les mêmes conditions mais sans source enzymatique. Les valeurs sont exprimées en UI/mg de protéine.

L'activité de la SOD a été déterminée selon l'équation suivante :

% d'inhibition =
$$[(A_{contrôle} - A_{essai})/A_{contrôle}] \times 100$$

SOD UI/ml = % d'inhibition x 6,35

6.7. La mesure de l'activité enzymatique de la glutathion S-transférase

L'activité de la GST est déterminée selon la méthode de Habig *et al.*, (1974). La GST catalyse la réaction de conjugaison entre le glutathion et le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) comme substrat. La conjugaison se fait par le biais du groupement thiol du glutathion selon la réaction suivante :

Le produit issu de cette réaction (GS – DNB) absorbe à 340 nm. L'augmentation de l'absorption est directement proportionnelle à l'activité GST de l'échantillon. Cette dernière est déterminée

Chapitre IV Matériel et méthodes

classiquement par la mesure à 340 nm de la formation du produit de la réaction de conjugaison du

CDNB avec du glutathion réduit.

Pour le dosage de la GST, un mélange réactionnel contenant 1.7 ml du tampon phosphate (0,1M;

pH 6.5) et 100 µl de CDNB (20 mM) et préparé et incubé à 37 C° pendant 10 minute. La réaction

est démarrée par l'addition de 100 µl de la fraction cytosolique, et de 100µl du glutathion (20 mM).

La mesure de la densité optique s'effectue à l'onde 340 nm pendant 5 min contre un blanc préparé

dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate. Les résultats sont exprimés en UI/mg de

protéine selon la formule :

 $K = (DO_{\acute{e}chantillon} - DO_{contr\^{o}le}) \times 100 / (9.6 \times 0.05)$

7. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne ± écart-type (SD). La signification statistique des

données a été évaluée par le test de Student. Une valeur de P<0,05 a été considérée comme

indiquant une différence significative entre les groupes.

Ns : différences non significatives.

*P<0,05 : différences significatives.

**P<0.01: différences hautement significatives.

***P<0,001 : différences très hautement significatives.

26

Résultats et Discussion

À notre connaissance, notre étude est la première à déterminer l'effet hépatoprotecteur de la propolis, contre la toxicité hépatique de l'association TX-DOX, sur des rats males Wistar Albinos adultes, en fonction des résultats de plusieurs marqueurs biochimiques, et plusieurs paramètres du stress.

Partie I. Etude phytochimique de la propolis

1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes

Les teneurs en polyphénols (mg équivalent d'acide gallique/ g de propolis) et en flavonoïdes (mg EQ/g de Propolis) de la propolis sont illustrées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de la propolis (chaque valeur représente la moyenne \pm SD).

	La propolis
Teneur en polyphénols (mg EAG/g de propolis)	528 ± 22
Teneur en flavonoïdes (mg EQ/g de Propolis)	$324 \pm 6{,}45$

Les polyphénols et les flavonoïdes sont des constituants importants qui contribuent à la qualité fonctionnelle, à la couleur et à la saveur des produits d'abeilles, ce sont les constituants pharmacologiquement actifs les plus importants de la propolis (Ahmed *et al.*, 2017). Par conséquent, pour évaluer l'activité biologique de la propolis utilisée dans notre travail, la teneur en polyphénols et en flavonoïdes de cette dernière a été quantifiée.

Les résultats de la teneur en polyphénols totale indiquent que notre propolis contient des concentrations élevées de composés phénoliques ($528\pm22~mg~EAG$ / g de propolis), et de flavonoïdes ($324\pm6,45~mg~EQ$ / g de propolis).

À partir de ces résultats, on constate que les principaux composants étaient les polyphénols, qui sont en accord avec la littérature, où la propolis semble être riche en polyphénols qu'en flavonoïdes (Benhanifia *et al.*, 2013; Rebiai *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2017).

Les concentrations de polyphénols dans notre échantillon sont plus élevées que celles rapportées dans plusieurs études (Benhanifia *et al.*, 2013; Boufadi *et al.*, 2014). Alors que dans une autre étude la concentration en polyphénols est proche à celle trouvée dans notre propolis (Kebsa *et al.*, 2014).

Certains auteurs, comme (Kumazawa *et al.*, 2004), suggèrent l'utilisation de la teneur en flavonoïdes comme critique pour la différenciation entre les propolis. Les concentrations en flavonoïdes de notre propolis sont comparables à celle trouvée par (Kebsa *et al.*, 2014), et supérieure à celle indiquée dans plusieurs études (Boufadi *et al.*, 2014; Rebiai *et al.*, 2014; Ahmed *et al.*, 2017). Cette variation est principalement attribuable à la différence dans les plantes régionales préférées recueillies par les abeilles (Kähkönen *et al.*, 1999).

Nos résultats indiquent que cette propolis sert de source de réserve de composés phénoliques, et de flavonoïdes et peut donc jouer un rôle important en tant que purificatrice d'oxygène singulet et éliminatrice de radicaux libres pour minimiser les dommages moléculaires de la cellule.

I.2. Effet anti-radicalaire de la propolis

La propriété anti-radicalaire de notre échantillon de propolis a été déterminée par le test de dépistage DPPH, et les résultats ont été exprimés en % d'inhibition de DPPH (figure 14).

Pour évaluer l'effet scavenger des radicaux libres de la propolis utilisée dans notre expérimentation, l'inhibition de la DPPH a été étudiée et ces résultats sont considérés comme des activités relatives contre le contrôle (acide ascorbique). Le radical DPPH est largement utilisé pour évaluer l'activité de balayage des radicaux libres en raison de la facilité de la réaction.

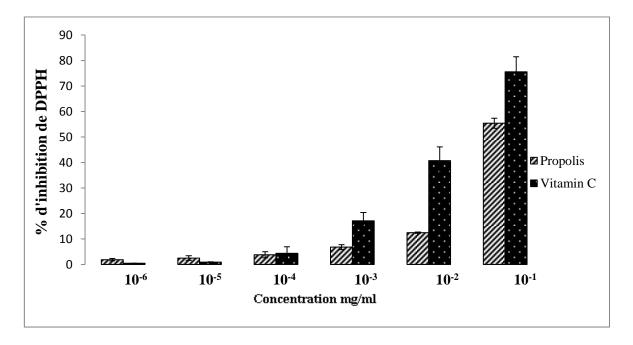


Figure 14. Evaluation de pourcentage d'inhibition de la propolis à différentes concentrations vis-à vis de radical libre DPPH.

Les résultats obtenus montrent que la capacité de piégeage des radicaux libres de la propolis et de la vitamine C a augmenté en fonction des concentrations.

Nos résultats montrent également que cette propolis présente un effet scavenger des ROS mais moins que le contrôle pour les concentrations élevés (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ mg/ml) (55.64±1.97, 12.47±0.25, et 6.77± 0.95 contre, 76.16±5.9, 40.06±5.38, et 16.62±3.31 % respectivement). Un pourcentage d'inhibition similaire entre la propolis et l'acide ascorbique est enregistré pour la concentration 10⁻⁴ mg/ml (3.80±1.21, contre 4.005±2.58 %). En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, les valeurs d'inhibition dans cette étude sont inférieures à celle obtenu par (Kebsa *et al.*, 2014), pour un échantillon d'une propolis de la région de Jijel à une concentration de 10⁻¹ mg/ml. Pour la même concentration nos résultats sont comparables à celle obtenus par Benhanifa *et al.*, (2013), pour la propolis de la région de Mascara, alors que pour celle de Tlemcen, l'activité trouvée pour notre échantillon semble être supérieur à celle de cette région.

D'après la quantification des polyphénols et des flavonoïdes réalisés, notre propolis semble être riche en polyphénols et en flavonoïdes qui pourraient expliquer l'activité forte de balayage des radicaux libres *in vitro*. Les composés phénoliques ont des propriétés redox, ce qui leur permet d'agir comme antioxydants (Soobrattee *et al.*, 2005). Leurs capacités de piégeage des radicaux libres sont facilitées par leurs groupes hydroxyle. Les flavonoïdes, y compris les flavones, les flavanols et les tanins condensés, sont des métabolites secondaires de plantes, dont l'activité antioxydante dépend de la présence du groupe OH libre, en particulier 3-OH (Geetha *et al.*, 2003).

Partie II. Etude in vivo de l'effet hépatoprotecteur de la propolis

1. Suivi du comportement des animaux

Dans les premiers jours du traitement, et avant l'administration des anticancéreux nous avons constaté une bonne activité, et un bon état physique des rats des 3 groupes. Une fois les rats sont traités par l'association docétaxel-doxorubicine (TX-DOX), nous avons remarqués, une diminution de l'activité des rats de ce groupe, avec une apparition d'une inflammation au niveau des queux des animaux du même groupe, suite à l'administration intraveineuse des deux anticancéreux, alors que la bonne activité a été conservé chez les rats du groupe prétraité par la propolis. En ce qui concerne le groupe témoin, nous avons constatés une stabilité au niveau de l'activité des rats durant la période du traitement.

2. Influence du traitement sur le poids corporel des rats

La variation du poids corporel moyen des rats des 3 lots : témoins, traités (TX-DOX) et prétraités

par la propolis est illustrée dans la figure 15.

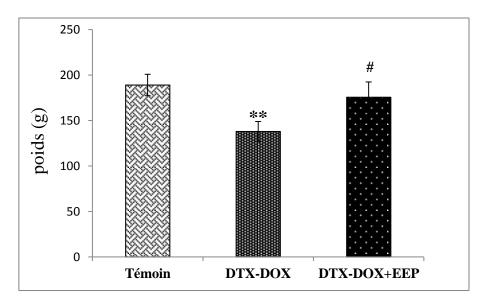


Figure 15. Variations du poids corporel des rats après administration de DTX-DOX (75 mg/m²; 200 mg/m²) seul, et en association avec la propolis (25 mg/kg).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif ; comparaison avec le témoin, $^{\#}P$ < 0,05 désigne un effet significatif ; comparaison avec le traité.

La réduction de poids corporel est utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé général du rat. En effet, les résultats de la présente étude, montrent une diminution hautement significative (P< 0,01) du poids corporel des rats traités, tout en comparant aux rats témoins (138± 10,9 contre 189,07±11,76 g). La diminution du poids corporel des rats est due à la toxicité des anticancéreux administrés aux rats par voie intraveineuse (docétaxel et doxorubicine).

Plusieurs études expérimentales ont été effectués pour évaluer l'effet des anticancéreux (cyclophosphamide, cisplatine, fluorouracile) sur le poids corporel, les résultats obtenus ont été similaires, dont le poids corporel des animaux utilisé a diminué après le traitement (Liao *et al.*, 2008; Arhoghro *et al.*, 2012).

Sur la base de plusieurs rapports scientifiques, la doxorubicine utilisée en monothérapie, entraine une diminution significative du poids corporel des rats (Periyasamy *et al.*, 2012), alors qu'une autre étude a trouvé que le poids corporel des souris utilisé a connus une augmentation après traitement par la doxorubicine (Zhao *et al.*, 2012). A la lumière de nos résultats on peut dire, que la DOX et le DTX, utilisés en association influence également sur le poids des rats.

Le prétraitement par la propolis, à entrainer un gain significatif (P< 0,05) dans le poids corporel des rats par rapport au groupe traité (175,66±16,73 contre 138±10,9 g). Le gain du poids chez les rats de ce groupe reflète l'amélioration de l'état de santé de ces derniers, ce qui montre l'effet préventif de la propolis utilisée dans notre expérimentation. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Omar *et al.*, (2016), où un gain du poids a été remarqué chez les rats prétraités par la propolis suivie d'un traitement par la doxorubicine.

3. Influence du traitement sur le poids du foie des rats

Les variations des poids des foies des rats, témoins, traités, et prétraités par la propolis, sont enregistrés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Variations du poids absolu (PA) (g) du foie chez les rats témoins, traités (DTX-DOX) et prétraités (DTX-DOX+EEP) (chaque valeur représente la moyenne \pm SD).

		Groupes	
Paramètre	Témoin	DTX-DOX	DTX-DOX +EEP
PA du foie (g)	6.14 ± 0.97	$4.59 \pm 0.31^*$	6.08± 0,99 [#]

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : *P< 0,05 désigne un effet significatif; comparaison avec le témoin, $^{\#}P$ < 0,05 désigne un effet significatif; comparaison avec le traité.

La pesée du foie des rats nous a permis de noter, que le traitement par les anticancéreux en association a provoqué une diminution significative (P < 0.05) du poids de l'organe par rapport au groupe témoin (4.59 ± 0.31 contre 6.14 ± 0.97 g). Le prétraitement par la propolis a protégé le foie de la toxicité des anticancéreux objectivée par une augmentation significative (P < 0.05) de son poids absolu par rapport au groupe traité (6.08 ± 0.99 contre 4.59 ± 0.31 g).

La diminution du poids absolue du foie des rats traité, peut être expliqué par une insuffisance hépatique aigue ou également une atrophie, cette dernière est due à une destruction des hépatocytes, provoqué par le traitement anticancéreux en particulier par la doxorubicine, dont la nécrose fait partie de sa cytotoxicité (Shin *et al.*, 2015). Une étude de Zhao *et al.*, (2012) a également montré que la doxorubicine provoque une nécrose des cellules hépatiques ainsi qu'une infiltration des cellules inflammatoires. Notre résultat est similaire à d'autres études où le poids du foie a été diminué après seulement 24 heure du traitement par la DOX mais en monothérapie (Zhao *et al.*, 2012).

Par contre, une augmentation du poids absolu du foie a été observée dans le groupe prétraité par la propolis ceci est dû aux propriétés protectrices de la propolis qui pouvaient réduire les effets secondaires causés par les médicaments anticancéreux et donc protéger le tissu hépatique contre l'attaque des ROS.

4. Paramètres sériques

4.1. Activité des transaminases

Le tableau 3 et la figure 16 résume la variation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT/ALAT) chez les rats témoins, traité et prétraité par la propolis.

Tableau 3 : la variation de l'activité enzymatique des transaminases (ASAT/ALAT) chez les rats témoins, traités (DTX-DOX) et prétraités (DTX-DOX +EEP) (chaque valeur représente la moyenne \pm SD).

Paramètre			Groupes	
		Témoin	DTX-DOX	DTX-DOX +EEP
	72 H	$43,5\pm0$	147,5 ± 38,24**	58,16 ± 20,74 ^{##}
ASAT (UI/I)	14 jours	49,36 ± 4,5	349,8 ± 61,75**	87,33 ± 35,72 ^{##}
	21 jours	$49,36 \pm 4,5$	291,6 ± 54,56**	$58,16 \pm 20,74^{##}$
	72 H	58 ± 32,9	291,6 ± 54,5**	81 ± 16,49 ^{##}
ALAT (UI/I)	14 jours	$58 \pm 16,49$	335,3 ± 41,13***	93,2 ± 16,49 ^{###}
	21 jours	70 ± 0	320,8± 20,6**	81,6 ± 16,49 ^{###}

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif, ***P< 0,01 désigne un effet très hautement significatif ; comparaison avec le témoin, **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif, comparaison avec le traité.

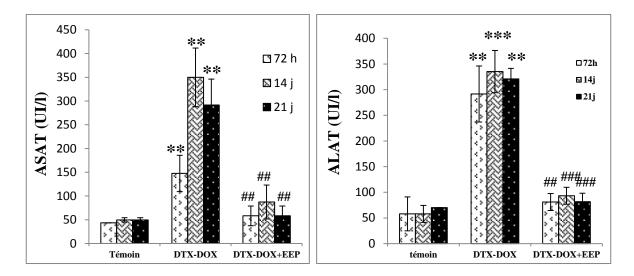


Figure 16. Variations de la concentration sanguine des transaminases (ASAT et ALAT) chez les rats traité (TX-DOX), prétraité (TX-DOX+EEP)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif, ***P< 0,01 désigne un effet très hautement significatif ; comparaison avec le témoin, **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif, comparaison avec le traité.

Le traitement des rats par l'association taxotère-doxorubicine, provoque selon nos résultats une augmentation significative du taux des transaminases, l'aspartate aminotransférase (ASAT) et l'alanine aminotransférase (ALAT), après le traitement (TX-DOX).

D'une part, une augmentation hautement significative (P< 0,01) des ASAT a été enregistrée après 72h, 14j et 21j du traitement (147,5 \pm 38,24 contre 43,5 \pm 0, 349,8 \pm 61,75 contre 49,36 \pm 4,5 et 291,6 \pm 54,56 contre 49,36 \pm 4,5). Par contre une diminution hautement significative (P< 0,01) a été enregistrée chez les rats prétraités par la propolis par rapport aux rats traités.

D'autre part, nous avons constatés une augmentation hautement significative (P< 0,01) de l'activité enzymatique des ALAT après 72h et 21 jours du traitement (291,6 \pm 54,5contre 58 \pm 32,9; et 320,8 \pm 20,6 contre 70 \pm 0 UI/1 respectivement), alors que après 14 jours du traitement une augmentation très hautement significative (P< 0,001) de l'activité des ALAT a été enregistrée (335,3 \pm 41,13contre 58 \pm 16,49) par rapport aux témoins. Pour les rats prétraités par la propolis on constate une diminution hautement significative après 72h et très hautement significative après 14 et 21 jours.

En tant qu'organe de désintoxication, le foie est le premier organe qui rencontre tous les matériaux qui sont absorbés par le tractus gastro-intestinal. Il a été démontré qu'il réagissait aux insultes toxicologiques de plusieurs façons, y compris la dégénérescence cellulaire, la nécrose, l'hyperplasie des voies biliaires et la fibrose (Onu *et al.*, 2013). Plusieurs rapports scientifiques, réalisés sur des

rats, ont montré que les anticancéreux peuvent induire une destruction du foie par l'élévation des taux sanguins en transaminases (ASAT/ALAT) (Walaa *et al.*, 2014).

Au cours de la lésion hépatique, les enzymes ont tendance à s'écouler dans la circulation sanguine en raison de leur emplacement cytoplasmique, ce qui facilite leur mise en circulation en réponse à des dommages à l'intégrité structurelle du foie (Afroz *et al.*, 2014).

Les résultats issus de notre étude expérimentale révèlent, une augmentation du taux des transaminases (ALAT) après un traitement par l'association DTX-DOX. Nos résultats sont comparables aux plusieurs travaux précédents, après traitement des rats par la DOX. Selon Farag *et al*, (2010) cette augmentation peut être due pratiquement à des lésions tissulaires dans le foie, ou en raison de modifications de la perméabilité de la membrane cellulaire ou également une augmentation de la synthèse ou une diminution du catabolisme des aminotransférases.

Dans la présente étude l'augmentation de l'activité des transaminases est enregistré suite aux conditions drastiques causées par l'activité toxique des accumulations de doxorubicine dans le foie, cette accumulation est expliquée par l'effet du docétaxel, dont ce dernier augmente la concentration de la doxorubicine dans le foie en cas d'association DTX-DOX selon l'étude de (Pieniążek *et al.*,2013)., cela peut provoquer une destruction cellulaire ou augmenter la perméabilité des cellules hépatiques (Walaa *et al.*, 2014).

De plus, les ROS générés suite au cycle redox du DOX peut endommager les membranes hépatiques et provoque une libération des ALAT. Le DOX peut également activer les phospholipases via le peroxyde lipidique qui peut élever le taux du Ca²⁺ intracellulaire et peut également conduire à la libération de l'ALAT et à la mort des cellules hépatiques (Walaa *et al.*, 2014).

La réduction des effets toxiques, des agents antinéoplasiques, par les molécules antioxydantes a été évalué dans plusieurs études précédentes (Periyasamy et al., 2014; Kebsa et al., 2015; Tabaczar et al., 2013). Dans notre étude le prétraitement par la propolis a normalisé, l'activité enzymatique des transaminases, tout en comparant aux témoins. Cette normalisation est expliquée par l'effet protecteur de la propolis, dont cette dernière a protégée les cellules hépatiques contre les effets toxiques des médicaments administrés en association. Une étude de (Kolankaya et al., 2002) a rapporté que le traitement avec la propolis empêchait de manière significative la libération de transaminases, ce qui suggère son potentiel hépatoprotecteur. Ces résultats sont en accord avec d'autres études ou la propolis a prouvé son effet hépatoprotecteur, chez les rats après l'exposition de

ces derniers a des molécules hépatotoxiques (doxorubicine, CCl₄,......) (Bhadauria *et al.*, 2011; Omar *et al.*, 2016).

4.2. Concentration plasmatique en bilirubine directe

Les résultats des concentrations sériques en bilirubine directe, des rats prétraités ou non par la propolis, sont illustrés dans la figure 17.

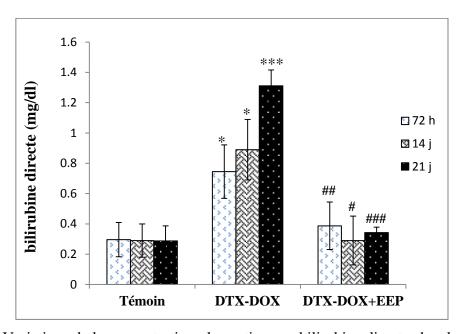


Figure 17. Variations de la concentration plasmatique en bilirubine directe chez les rats traités (DTX-DOX), et prétraités (DTX-DOX+EEP)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : *P< 0,05 désigne un effet significatif, ***P< 0,01désigne un effet très hautement significatif ; comparaison avec le témoin, $^{\#}P$ < 0,05 désigne un effet significatif, $^{\#\#}P$ < 0,01 désigne un effet très hautement significatif ; comparaison avec le traité.

Les résultats de notre étude expérimentale, indiquent une augmentation significative (P< 0,05) en bilirubine, après 72 h et 14 j et surtout après 21 jours du traitement (0,745±0,11 contre 0,296±0,11; 0,89±0,2 contre 0,29±0,17 mg/dl respectivement) chez les rats traités par DTX-DOX. Pour les rats prétraités par la propolis on constate une diminution hautement significative de la bilirubinémie.

La bilirubine est un produit de dégradation métabolique de l'hème de sang avec d'excellentes valeurs diagnostiques. L'estimation des activités de la bilirubine totale, directe ou indirecte du sérum peut rendre l'évaluation de la fonction hépatique. Les concentrations anormales de bilirubine signifient habituellement la présence d'une variété de maladies avec dysfonctionnement du foie, allant de la jaunisse à l'hépatite infectieuse (Hashish et Elgaml, 2016).

D'après la littérature les molécules de bilirubine, sont de bons indicateurs d'état antioxydant et peuvent informer sur la capacité de l'organisme à maintenir un équilibre antioxydant / oxydant, le présent travail a étudié les changements de ce paramètre dans le sérum des rats après traitement par DTX-DOX. Les résultats montrent une augmentation, de la concentration sérique en bilirubine. L'élévation de la bilirubine indique le disfonctionnement du foie. Ces observations sont en accords avec d'autres études, (Nirala et Bhadauria, 2008). Lorsque la bilirubine agit comme un antioxydant, elle est elle-même oxydée à la biliverdin qui est rapidement réduite par BVR à la bilirubine (Capcarová *et al.*, 2013). En outre cette valeur élevée peut être attribuée aux mécanismes de défense contre les dommages oxydatifs induits par les radicaux libres, y compris une réduction des radicaux libres en augmentant les donneurs d'électrons, comme la bilirubine.

Dans notre travail, le prétraitement par la propolis du groupe traité par l'association DTX-DOX, a amélioré les effets délétères de ces anticancéreux, notamment la diminution de la concentration sérique en bilirubine directe. La réduction de la fuite de ces éléments dans la circulation indique la probabilité d'une régénération accélérée des tissus après traitement de la propolis à 25 mg / kg de dose (Nirala et Bhadauria, 2008).

5. Variations des paramètres du stress

5.1. Influence du traitement sur le taux de MDA cytosolique

La figure 18 illustre la variation du taux du MDA cytosolique dans le foie chez les rats prétraités ou non par la propolis.

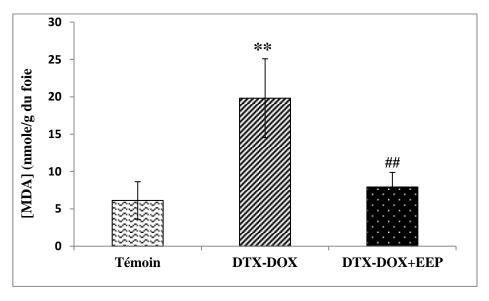


Figure 18. Variations du taux du MDA cytosolique hépatique après administration de DTX-DOX (75mg/m²; 200mg/m²) seul, et en association avec EEP (25 mg/kg).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif ; comparaison avec le témoin, **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif ; comparaison avec le traité.

D'après nos résultats, Nous avons constaté une élévation hautement significative (p < 0.01) du MDA chez les rats traités (19,81 \pm 5,284 nmol/g du foie) par rapport au groupe témoin (6,125 \pm 2,518 nmol/g du foie). Par ailleurs, une variation significative (p < 0.05) du taux de MDA est constatée chez les rats prétraités par la propolis (7,925 \pm 1,949 nmol/g du foie) et cela par rapport au groupe traité. Ce résultat explique la protection des animaux par la propolis contre la peroxydation lipidique.

Étant donné que les phospholipides membranaires sont des cibles majeures de dégâts oxydatifs, la peroxydation lipidique est souvent le premier paramètre analysé pour prouver l'atteinte des radicaux libres. La peroxydation lipidique est le processus de dégradation oxydante des acides gras polyinsaturés. Elle produit une perte progressive de l'intégrité de la membrane cellulaire, une altération de la fonction de transport membranaire et une perturbation de l'homéostasie des ions cellulaires (Bano et Bhatt, 2007; Alyane *et al.*, 2008).

Le stress oxydant est caractérisé par les ROS qui induisent la peroxydation lipidique, le MDA est un produit secondaire généré au cours de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Misra *et al.*, 2009).

Nos résultats montrent l'augmentation du taux du MDA cytosolique dans le tissu hépatique, en présence du traitement par les deux anticancéreux en association. L'augmentation de la peroxydation lipidique (POL), indiquée par le taux élevé du MDA, ceci montre bien que l'association DTX-DOX est capable de provoquer la génération des ROS, qui se traduit par une POL dans le tissus hépatique. Les lipides de la membrane cellulaire hépatique sont sensibles aux lésions des radicaux oxygénés induits par la DOX (Jacevic et al., 2017). Dans des conditions aérobies, le radicale semiquinone du DOX subit un cycle redox conduisant à la génération de ROS, y compris le radical hydroxyle, qui peut affecter profondément les lipides, induisant ainsi une peroxydation lipidique (Riddick et al., 2005). Dans le même sens des études précédentes, ont montré que l'administration de doxorubicine en association avec le taxotère, induit une augmentation de POL au niveau du tissu hépatique, par apport à une injection de chaque médicament comme agent anticancereux seul (Tabaczar et al., 2012; Pieniążek et al., 2013; Tabaczar et al., 2013).

Dans les états de stress oxydatif, le glutathion réduit (GSH) est converti en glutathion oxydé (GSSG) et l'épuisement entraîne une peroxydation lipidique (Shukla *et al.*, 2004). La SOD est connu pour inhiber la production de radicaux HO en éliminant O₂ et entraînerait donc sa réduction

tout en inhibant la POL. En outre, l'augmentation de la POL est associée à une diminution de l'activité de la SOD (Tandon *et al.*, 1995; Garg *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le prétraitement par la propolis diminue le taux du MDA cytosolique hépatique, ce qui nous permet de dire que la propolis protège le tissu hépatique contre les effets toxiques du stress oxydant, dont la peroxydation lipidique. L'effet protecteur de la propolis peut être dû à la réduction des molécules de MDA par la propolis. En effet, la propolis présente une activité antilipoperoxydative, par son effet de balayage des radicaux peroxyle, par la capacité de chélation des ions et sa capacité à réduire le Fe⁺² et inhiber ainsi la réaction Fenton et la peroxydation des lipides (Lahouel *et al.*, 2015).

Des études de Kebsa *et al.* (2014), montrent également l'effet protecteur de la propolis contre la peroxydation lipidique dans le tissu hépatique, ce qui confirme nos résultats.

5.2. Effet de la propolis sur le niveau cytosolique de GSH

La figure 19, présentent le taux du glutathion hépatique chez les rats prétraités ou non par l'extrait de la propolis.

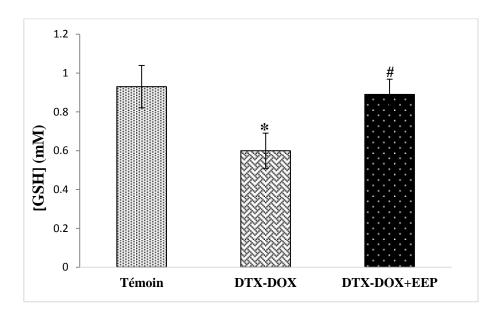


Figure 19. Variations du taux du GSH cytosolique hépatique après administration de DTX-DOX (75mg/m²; 200 mg/m²) seul, en association avec EEP (25mg/kg)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : *P< 0,05 désigne un effet significatif ; comparaison avec le témoin, $^{\#}P$ < 0,05 désigne un effet significatif ; comparaison avec le traité.

D'après les résultats obtenus de notre étude expérimentale, nous avons remarqué une diminution significative du taux du glutathion hépatique (p < 0.05) chez les rats traités (0,60 \pm 0.030 mM ,par

rapport au groupe témoin (0.93±0.109 mM). Par contre, un prétraitement par la propolis normalise le taux du GSH (0,89±0,077 mM), tout en comparant au traité.

Le GSH est synthétisé dans le cytoplasme des cellules du foie et ensuite distribué par le système circulatoire / transport dans différents organes et compartiments sous-cellulaires (Mishra et al., 2013). Il permet à l'organisme de se débarrasser des toxines et des polluants indésirables, en formant avec eux un composé hydrosoluble susceptible d'être excrété dans l'urine ou la bile. Le glutathion (GSH) exerce son rôle en synergie avec les enzymes antioxydantes (El-Beltagi et Mohamed, 2013). Ils peuvent également exercer leur capacité antioxydante au travers de la stimulation ou de la protection des systèmes antioxydants endogènes (De David et al., 2011; Ji et al., 2015). Par conséquent, la perturbation dans le statut redox de GSH peut non seulement nuire à la défense des cellules contre les composés toxiques, mais aussi entraîner un stress oxydatif amélioré et une lésion tissulaire (Mishra et al., 2013).

Les résultats de notre étude expérimentale présentent une diminution significative du taux du GSH hépatique après traitement par l'association DTX-DOX, cette diminution est due à la consommation du GSH dans le piégeage des radicaux libres produit par cette association. Nos résultats sont en accord avec ceux de Pieniażek et al., (2013), qui ont démontrés que le traitement des rats par la doxorubicine en association avec les taxanes (docetaxel), provoque une diminution du taux du GSH hépatique. La diminution de la teneur en GSH suggère une diminution dans le rapport global GSH / GSSG, un indice de stress oxydatif tissulaire (Mishra et al., 2013). Ce résultat pourrait être lié à l'augmentation de l'oxydation du GSH, qui est le résultat direct de l'augmentation de la génération des radicaux libres (Pushpakiran et al., 2004; Jordao et al., 2004; Emre et al., 2014). La génération non enzymatique de radicaux libres par la doxorubicine résulte de la formation d'un complexe associant la doxorubicine et le fer ferrique (DOX-Fe³⁺) qui subit une réduction, aboutissant à la production du radical superoxyde, le donneur d'électron pour cette réaction est le glutathion (GSH). De plus il existe un certain nombre de publications qui ont montrés la formation de conjugués de doxorubicine-GSH dans les cellules ainsi qu'une formation accrue de glutathion oxydé après un traitement par doxorubicine (Sinha et Mason, 2015), ce qui explique la diminution du niveau du glutathion réduit dans le tissu hépatique (Rochette et al., 2015).

Le prétraitement des rats par la propolis, semble être bénéfique en augmentant le taux du GSH hépatique, en comparant aux rats traités seulement par les anticancéreux en combinaison, selon les résultats présentés précédemment. Les niveaux accrus de GSH réduit suggèrent une augmentation de la capacité de désintoxication du foie (Garg *et al.*, 2009). Cette augmentation est expliquée soit par l'action des flavonoïdes au niveau génétique pour induire la synthèse de cette protéine ou sur

l'une des étapes de sa biosynthèse, soit par l'effet scavenger de ces derniers c'est-à-dire au lieu que les métabolites réactifs toxiques se fixent et consomme le glutathion ils vont être captés par les flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec d'autres, qui ont montrés une augmentation du taux du GSH dans le tissu hépatique après un traitement par la propolis (Bhadauria *et al.*, 2007; Kebsa *et al.*, 2014).

5.3. Effet de la propolis sur l'activité enzymatique de la catalase

Le dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT), a fourni les résultats de la figure 20.

Nos résultats présentent une diminution hautement significative (P< 0,01) de l'activité enzymatique du CAT chez les rats traités (0.036±0.011 UI/mg de protéine), par rapport à celle mesurée chez les témoins (0.064±0.01UI/mg de protéine), cette activité a été normalisée en présence d'un prétraitement par la propolis (0.063±0.01 UI/mg de protéine), en comparant avec le traité.

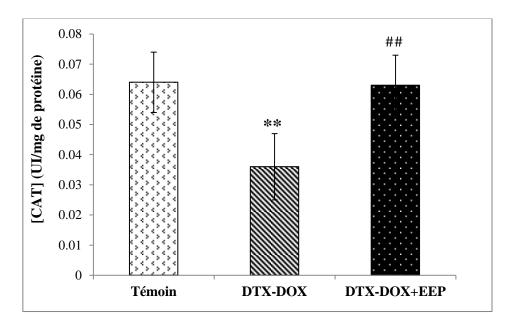


Figure 20. Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration de DTX-DOX (75mg/m²; 200 mg/m²) seul, en association avec EEP (25mg/kg).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif ; comparaison avec le témoin, **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif ; comparaison avec le traité.

Le H₂O₂ est décomposé à l'eau et les molécules d'oxygène par l'enzyme catalase présente dans le cytoplasme, protégeant ainsi les cellules contre les dommages médiés par l'hydroperoxyde (Singla *et al.*, 2014). La catalase est une enzyme clé dans le métabolisme de H₂O₂ et des espèces réactives d'azote, et son expression et sa localisation sont nettement plus fréquentes en présence des tumeurs.

Les mécanismes moléculaires régissant l'expression de la catalase, l'enzyme anti-oxydante connue, ne sont pas complètement élucidés (Glorieux et Calderon, 2017).

Nos résultats montrent une diminution de l'activité de cette enzyme après traitement par l'association taxotère-doxorubicine. La diminution de l'activité de la CAT peut être due à la destruction de cette enzyme suite d'une production intense des radicaux libres générés par les médicaments anticancéreux (DTX-DOX) administrés en combinaison ou également à l'utilisation de cette enzyme dans la conversion de H₂O₂ en H₂O. Des résultats semblables ont été trouvés d'après les études de Pieniqzek *et al.*, (2013), où une diminution de l'activité de la catalase a été constatée. La catalase est localisée dans les peroxysomes, qui contiennent beaucoup du système générateur de peroxydase (Freitus *et al.*, 2004). La diminution de l'activité de la catalase, dans la présente étude, peut conduire à une perturbation dans le système générateur de peroxydase, ce qui entraîne finalement des dommages aux tissus en raison de l'accumulation de radicaux libres (Garg, 2009). De plus, la diminution de l'activité de CAT peut être due à l'excès de radical anion superoxyde en raison d'une réduction de l'activité de SOD. Les rapports précédents ont également indiqué que la production élevée de radical anion superoxyde inhibe l'activité de CAT (Mishra *et al.*, 2013).

D'après les résultats obtenus, un prétraitement par la propolis a normalisé l'activité de la catalase, ce qui confirme de nouveau l'effet antioxydant de la propolis. Dans la présente étude, l'augmentation des activités enzymatiques de la CAT, peut être considérée comme un mécanisme de protection contre la production de radicaux libres et la peroxydation lipidique. Les études de Kebsa *et al.*, (2014), Ont montrés également une augmentation de l'activité de la catalase après un prétraitement par la propolis, l'augmentation qui a été expliquée dans cette étude par l'induction des gènes et la synthèse protéique de cette enzyme antioxydante (CAT).

5.4. Influence du traitement sur l'activité enzymatique du super oxyde dismutase

Les résultats du dosage de l'activité enzymatique de la SOD ont fourni les résultats présentés cidessous (figure 21).

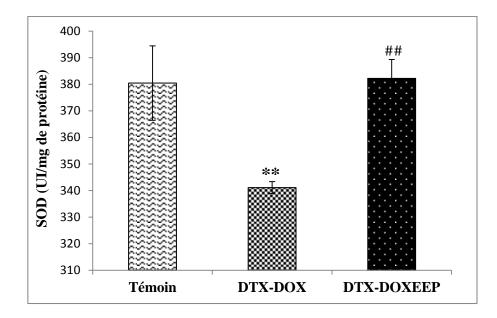


Figure 21. Effet de la propolis sur l'activité enzymatique de la SOD cytosolique dans le foie après administration de DTX-DOX (75mg/m²; 200mg/m²) seul, en association avec EEP (25mg/kg).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif ; comparaison avec le témoin, **P< 0,01 désigne un effet hautement significatif ; comparaison avec le traité.

D'après nos résultats, nous avons remarqué une diminution hautement significative (P< 0,01) de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase chez les rats traités par rapport au groupe témoin (341,11±23,07 contre 380,47±14,2 UI/mg de protéine). Les activités enzymatiques sont normalisées lorsque les animaux subissent un prétraitement par la propolis (382,22±11,15 UI/mg de protéine) tout en comparant au traité.

Les superoxydes dismutases (SOD) sont les principaux systèmes de défense antioxydants contre l'O₂· qui se composent de trois isoformes chez les mammifères : le SOD cytoplasmique (SOD1), le SOD mitochondrial (SOD2) et le SOD extracellulaire (SOD3), tous nécessitant un métal catalytique (Cu ou Mn) pour leurs activations (Fukai et Ushio-Fukai, 2011). Cette enzyme assure l'élimination de l'anion superoxyde, première espèce toxique formée à partir de l'oxygène. Elle assure, ainsi, la première ligne de défense contre le stress oxydant (Mates *et al.*, 1999 ; Milane, 2004).

Les résultats obtenus de l'étude expérimentale qu'on a effectuée, ont montés une diminution de l'activité de la SOD, après un traitement par l'association DTX-DOX. Dans le même sens, des études de Sabina Tabaczar *et al.*, (2013), présentent également une diminution de l'activité de la SOD chez les rats traités par la doxorubicine en combinaison avec un taxane (docétaxel) par apport aux contrôles. La diminution de l'activité enzymatique de la SOD pourrait être expliquée, par l'inhibition de cette enzyme suite d'une génération intense des radicaux libres, provoqués par l'association DTX-DOX. À l'inverse de nos résultats, une augmentation de l'activité de la SOD chez

les rats traités par la doxorubicine en combinaison avec le DTX a été signalée par un autre groupe de recherche (Pieniażek *et al.*, 2013).

La présente étude a montré une amélioration significative de l'activité de SOD après traitement avec la propolis. Cette amélioration peut jouer un rôle important dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif induit par l'association DTX-DOX. Une étude antérieure de Benguedouar *et al.*, (2008) a prouvé la diminution des radicaux anion superoxyde et l'inhibition de la Peroxydation lipidique chez les animaux recevant 100 mg / kg d'extrait de propolis. La normalisation de l'activité de la SOD montre l'effet antioxydant de la propolis qui dépend des polyphénols présents dans cette substance. De plus la propolis est une source riche d'éléments essentiels, y compris Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ et Ca²⁺ (Haro *et al.*, 2002), qui pourraient également être responsables de la réactivation des enzymes antioxydantes en fournissant des oligo-éléments optimaux.

5.5. Effet de la propolis sur l'activité enzymatique de la GST

La figure 22 montre l'effet de la propolis sur l'activité de la GST hépatique chez les rats prétraités ou non par la propolis.

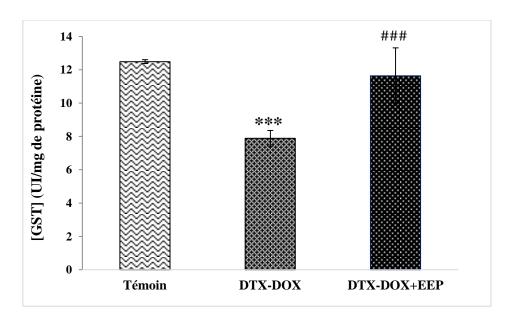


Figure 22. Variations du taux du GST cytosolique hépatique après administration de DTX-DOX (75mg/m²; 200 mg/m²) seul, en association avec EEP (25 mg/kg)

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type .test de student : ***P< 0,01désigne un effet très hautement significatif ; comparaison avec le témoin, ****P< 0,001 désigne un effet très hautement significatif ; comparaison avec le traité.

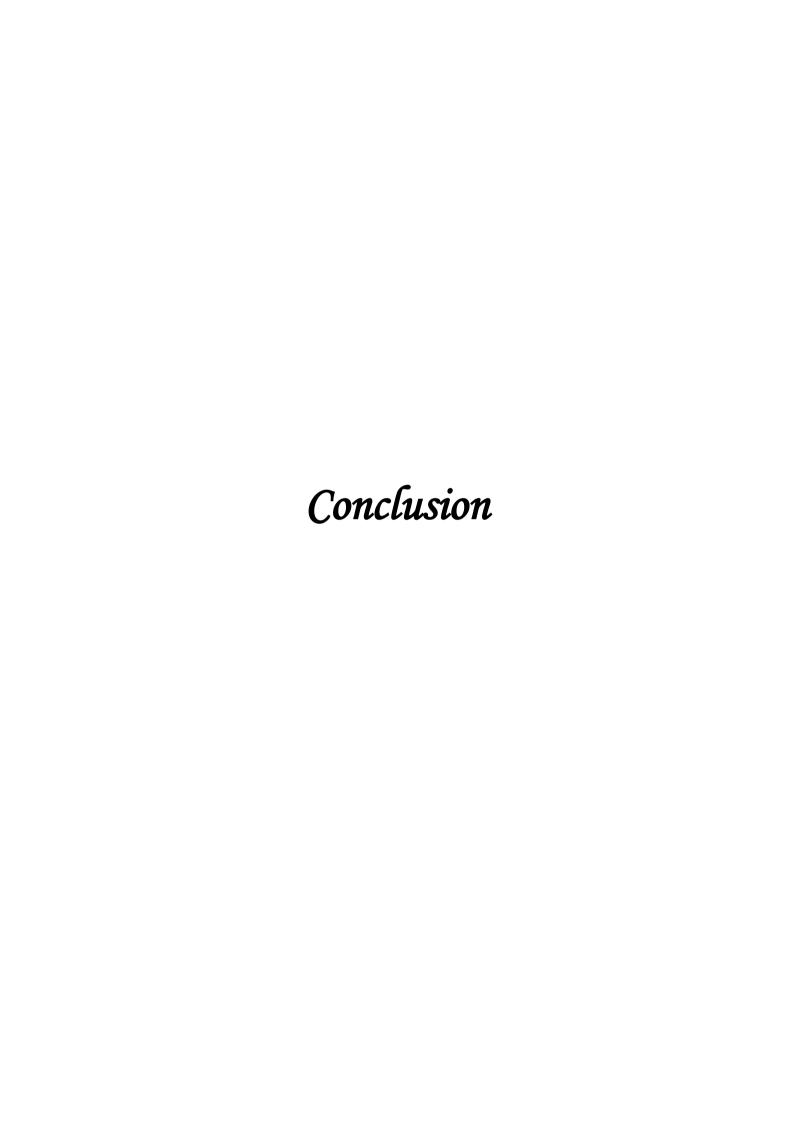
Notre étude montre que l'administration de TX-DOX a induit une déplétion très hautement significative (P<0,001) de la GST hépatique par rapport aux rats témoins (7,89±0,53contre

12,49±0,11UI/mg de protéine). Concernant les rats prétraités par l'extrais de la propolis nous avons observé une augmentation très hautement significative (P<0,001) de cette activité (11,64±0,91UI/mg de protéine) en comparaison avec les rats traités.

Les glutathions S - transférases (GST) sont des enzymes qui protègent la cellule des molécules toxiques par S-conjugaison avec le GSH. Il existe trois formes de GST; les deux premières comprennent des enzymes solubles cytosoliques et mitochondriales, alors que la dernière regroupe des GST microsomales. La GST protège les cellules ou les tissus contre le stress oxydatif et les dommages en détoxifiant divers substrats toxiques dérivés des processus oxydatifs cellulaires (Sharma et al., 2004; Hassan et al., 2012)

Nos résultats ont révélés, une diminution significative de l'activité enzymatique de la GST après traitement par l'association DTX-DOX. Cette diminution est due à une production accrue des radicaux libre ou en raison d'une diminution significative de la machinerie antioxydante (Abdel-Ghaffar, 2013). La diminution de l'activité de la GST observée dans cette étude pourrait résulter également de la diminution de la teneur en GSH, un substrat de mesure dans la réaction catalysée par la GST. De plus cette diminution pourrait avoir contribué à la peroxydation lipidique augmentée, comme le montrent les niveaux accrus de MDA (Zaidi et Banu, 2004).

En revanche, le traitement des rats par l'extrait de la propolis a rétabli les taux du GST à leurs niveaux normaux cela est expliquée par l'activité antioxydante des polyphénols qui semble être les constituants chimiques majeurs responsable des activités biologiques de la propolis. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Singla *et al.*, (2014), où la propolis a prouvé son effet antioxydant via l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydants dont la GST.



Malgré les effets secondaires liés à leurs utilisations dans la thérapie combinatoire, dont la néphrotoxicité, la cardiotoxicité, et l'hépatotoxicité, la doxorubicine et le docétaxel (taxotère), sont largement utilisés dans le traitement de nombreux types de cancers, et plus particulièrement le cancer du sein.

La propolis était le sujet de plusieurs recherches, dans le cadre de diminution des effets indésirables des médicaments anticancéreux, suite de ces activités biologiques intéressantes.

Selon notre étude expérimentale, l'augmentation de l'activité enzymatique des transaminases, et du taux de la bilirubine directe, dans le sérum des rats traité par l'association DTX-DOX, montre l'effet hépatotoxique de cette dernière, cette toxicité est liée principalement à la formation de radicaux libres dans le tissu hépatique et aux dommages oxydatifs des macromolécules biologiques, provoqués par les médicaments anticancéreux, ces dommages sont prouvés par un déficit au niveau du système antioxydant enzymatique et non enzymatique, et une augmentation de la peroxydation lipidique.

Nos résultats confirment que le prétraitement par la propolis diminue significativement la toxicité hépatique de l'association DTX-DOX, par la normalisation de l'activité des transaminases et du taux de la bilirubine directe, d'une part, et une amélioration dans l'activité des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, et une diminution de la peroxydation lipidique, d'autre part.

Néanmoins des études complémentaires sont nécessaires pour mieux expliquer, comment l'association DTX-DOX altère le tissu hépatique, et comment la propolis puisse protéger ce tissu. Enfin et sur la base de nos résultats, nous pouvons conclure l'efficacité de la propolis dans la diminution des dommages induit par l'association taxotère-doxorubicine au niveau hépatique.





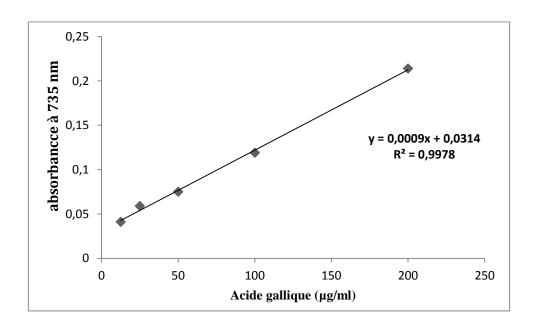


Figure 01. Courbe étalon du dosage des polyphénols (l'acide gallique comme standard)

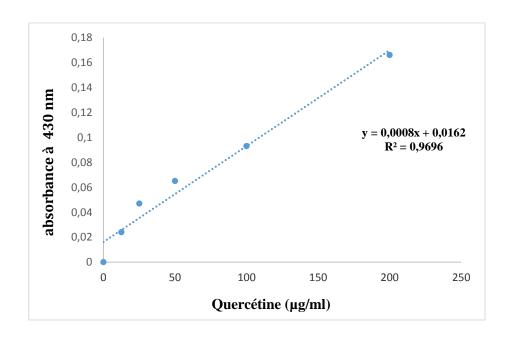


Figure 02. Courbe étalon du dosage des flavonoïdes (quercétine comme standard)

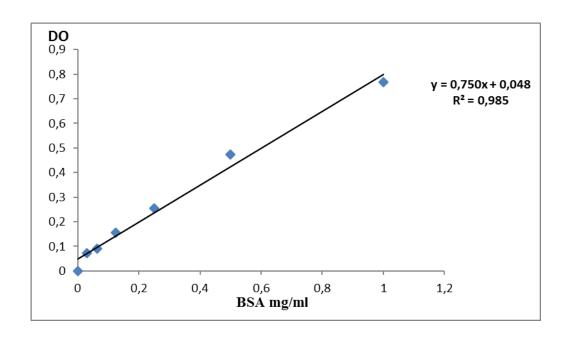


Figure 03. Courbe étalon du dosage des protéines (BSA comme standard).

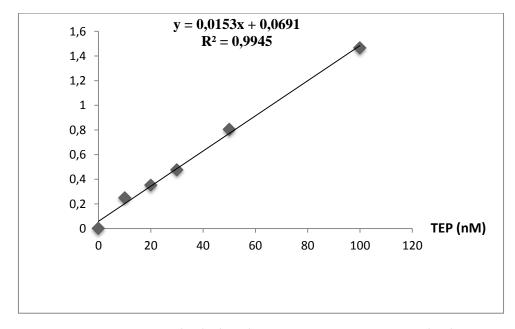


Figure 04 : Courbe étalon du MDA (TEP comme standard)

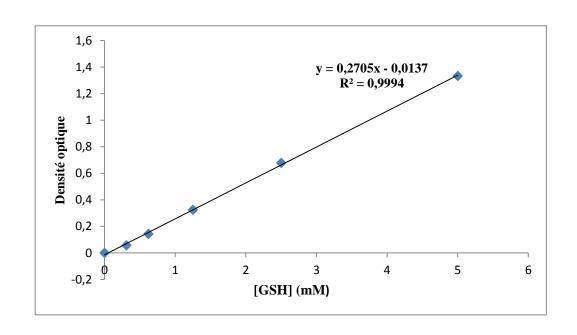


Figure 05. Courbe étalon de GSH.

Annexe 2

Tableau 01 : pourcentage d'inhibition de la propolis à différente concentration en fonction du temp

	Temps	0s	30s	60s	90s	120s	150s	180s	210s	240s	270s	300s	%
D1 10- 1mg/ml	1	0,42	0,34	0,278	0,255	0,231	0,212	0,2	0,192	0,185	0,181	0,177	55.41%
Tilig/illi	2	0,522	0,4	0,351	0,317	0,292	0,276	0,265	0,257	0,251	0,247	0,243	33.4170
	Moye n	0,471	0,37	0,3145	0,286	0,2615	0,244	0,232 5	0,2245	0,218	0,214	0,21	
D2 10-	1	0,533	0,514	0,504	0,5	0,491	0,485	0,482	0,476	0,474	0,466	0,465	
2g/ml	2	0,533	0,515	0,511	0,504	0,498	0,494	0,49	0,487	0,478	0,471	0,468	12.48%
	Moye n	0,533	0,5145	0,5075	0,502	0,4945	0,4895	0,486	0,4815	0,476	0,468 5	0,466 5	1
D3 10-	1	0,508	0,498	0,495	0,491	0,49	0,49	0,484	0,48	0,48	0,48	0,479	
3mg/ml	2	0,523	0,52	0,518	0,515	0,514	0,516	0,512	0,479	0,484	0,48	0,482	6.79%
	Moye n	0,5155	0,509	0,5065	0,503	0,502	0,503	0,498	0,4795	0,482	0,48	0,480 5	1
D4 10-	1	0,523	0,521	0,523	0,52	0,518	0,517	0,515	0,514	0,51	0,51	0,496	
4mg/ml	2	0,531	0,521	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,518	3.80%
	Moye n	0,527	0,521	0,5215	0,52	0,519	0,5185	0,5175	0,517	0,515	0,515	0,507	
D5 10- 5mg/ml	1	0,55	0,559	0,554	0,552	0,548	0,546	0,546	0,545	0,545	0,545	0,54	
	2	0,531	0,518	0,52	0,517	0,516	0,516	0,514	0,514	0,514	0,514	0,514	2.50%
	Moye n	0,5405	0,5385	0,537	0,5345	0,532	0,531	0,53	0,5295	0,5295	0,5295	0,527	
D6 10- 6mg/ml	1	0,556	0,548	0,5746	0,548	0,546	0,546	0,545	0,545	0,545	0,545	0,545	1.89%

Tableau 02 : pourcentage d'inhibition de la vitamine C à différente concentration en fonction du temp

	T	0s	30s	60s	90s	120s	150s	180s	210s	240s	270s	300s	%
10 ⁻¹ mg/ml	1	0,565	0,157	0,156	0,156	0,162	0,169	0,168	0,172	0,17	0,169	0,172	
	2	0,476	0,085	0,081	0,082	0,082	0,081	0,081	0,082	0,082	0,082	0,082	75.60%
	M oyen	0,520 5	0,121	0,118 5	0,119	0,122	0,125	0,124 5	0,127	0,126	0,125 5	0,127	
10 ⁻² mg/ml	1	0,376	0,236	0,249	0,284	0,248	0,248	0,249	0,25	0,249	0,248	0,248	
	2	0,473	0,26	0,255	0,255	0,256	0,255	0,255	0,256	0,255	0,255	0,255	40.75%
	M oyen	0,424 5	0,248	0,252	0,269 5	0,252	0,251 5	0,252	0,253	0,252	0,251 5	0,251 5	
10 ⁻³ mg/ml	1	0,551	0,476	0,465	0,454	0,453	0,452	0,452	0,442	0,442	0,442	0,439	
	2	0,426	0,422	0,422	0,378	0,375	0,375	0,372	0,372	0,373	0,368	0,371	17.09%
	M oyen	0,488 5	0,449	0,443 5	0,416	0,414	0,413 5	0,412	0,407	0,407 5	0,405	0,405	
10 ⁻⁴ mg/ml	1	0,566	0,53	0,529	0,529	0,527	0,528	0,526	0,526	0,525	0,525	0,527	
	2	0,445	0,458	0,45	0,447	0,443	0,441	0,437	0,443	0,44	0,439	0,44	4.35%
	M oyen	0,505 5	0,494	0,489 5	0,488	0,485	0,484 5	0,481 5	0,484 5	0,482 5	0,482	0,483 5	
10 ⁻⁵ mg/ml	1	0,557	0,555	0,552	0,551	0,553	0,552	0,551	0,55	0,55	0,55	0,55	
	2	0,533	0,545	0,54	0,53	0,536	0,536	0,534	0,535	0,53	0,53	0,53	0.92%
	M oyen	0,545	0,55	0,546	0,540	0,544	0,544	0,542	0,542	0,54	0,54	0,54	
10 ⁻⁶ mg/ml	1	0,527	0,536	0,531	0,53	0,529	0,529	0,524	0,524	0,524	0,524	0,524	
	2	0,504	0,517	0,508	0,507	0,504	0,501	0,502	0,504	0,502	0,501	0,502	0.48%
	M oyen	0,5155	0,526	0,519	0,518	0,516	0,515	0,513	0,514	0,513	0,512	0,513	

Théme: Effet de la propolis sur l'hépatotoxicité de l'association DTX-DOX

Encadreur: M^{me} ROUIBAH Hassiba

Présenté par : BOUCHELIT bouchra KEMEL amira SAYOUD fayza

Soutenue le : 01/07/2017

Résumé: L'augmentation de l'efficacité des traitements anticancéreux nécessite une combinaison de plusieurs agents ce qui induit des toxicités systémiques. Les combinaisons de taxanes avec la doxorubicine sont largement utilisées pour traiter le cancer du sein avancé et métastatique et d'autres tumeurs solides. La propolis est un produit naturel produit par les abeilles qui a été découvert à travers l'étude des remèdes traditionnels et la connaissance des populations autochtones à travers le monde. Les études actuelles ont été menées pour déterminer l'efficacité de la propolis dans l'atténuation de la toxicité de l'association DTX-DOX sur les paramètres biochimiques, les enzymes antioxydantes et la peroxydation lipidique des rats Wistar Albino mâles. L'administration simultanée de DOX et de DTX a provoqué, une perturbation des paramètres biochimiques (transaminases, bilirubine directe), ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique, et un déficit au niveau du système antioxydant enzymatique et non enzymatique. Le prétraitement par la propolis à (25 mg /kg /orale) pendant 5 jours a corrigé la toxicité hépatique de l'association (DOX –DTX), en renforçant les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

Mots clés: hépatotoxicité, taxotère, doxorubicine, bilirubine, transaminases, stress oxydant.

Abstract: Increasing the effectiveness of cancer treatment requires a combination of several agents which induces systemic toxicities. Combinations of taxanes with DOX are widely used to treat advanced and metastatic breast cancer and other solid tumors. Propolis is a natural product produced by bees that has been discovered through the study of traditional remedies and knowledge of indigenous peoples around the world. Current studies have been conducted to determine the efficacy of propolis in attenuating the toxicity of the DTX-DOX combination on biochemical parameters, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in male Wistar Albino rats. The simultaneous administration of DOX and PTX resulted in a disruption of biochemical parameters (transaminases, direct bilirubin) as well as an increase in lipid peroxidation and a deficiency in the enzyme antioxidant and non-enzymatic system. Pretreatment with propolis (25 mg / kg / oral) for 5 days corrected the (DOX-DTX) hepatic toxicity, by enhancing both enzymatic and non-enzymatic antioxidants.

Key words: hepatotoxicity, doxorubicin, taxoter, bilirubin, transaminases, oxidative stress.

ملخص: زيادة فعالية الأدوية المضادة للسرطان يتطلب مزيجا من العوامل التي تسبب سمية جهازية. وتستخدم مجموعات من taxanes مع DOX على نطاق واسع لعلاج سرطان الثدي المتقدم والمنتشر والأورام الصلبة الأخرى. الدنج هو نتاج طبيعي تنتجه النحل التي تم اكتشافها من خلال دراسة الأدوية ومعارف الشعوب الأصلية في جميع أنحاء العالم التقليدية. وقد أجريت الدراسات الحالية لتحديد مدى فعالية الدنج في التخفيف من سمية مزيج DOX-DOX من القياسات البيو كيميائية، والانزيمات المضادة للأكسدة وبيروكسيد الدهون في الفئران الذكور ويستار البيضاء. تسبب الحقن في وقت واحد من DOX و DTX في اختلال القياسات البيو كيميائية (الترانساميناسات، البيليروبين المباشر)، وزيادة في بيروكسيد الدهون، والعجز في نظام مضادات الأكسدة الأنزيمية. المعالجة مع الدنج (25 ملغ / كغ / عن طريق الفم) لمدة 5 أيام ساهم في تصحيح السمية الكبدية للمزيج (DOX-DTX)، وتعزيز مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية وغير الأنزيمية.

الكلمات المفتاحية: السمية الكبدية، الدوكسوروبيسين، التاكسوتير، بيليروبين، الترانساميناسات، الإجهاد التأكسدي.