

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل -

Université Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel -

Faculté des Sciences de la Nature

et de la Vie

Département : Biologie Moléculaire

et Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

### *Mémoire de fin d'étude*

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

Option : **Pharmacologie Expérimentale**

### *Thème*

**Effet hémato-protecteur de la propolis contre la toxicité induite par l'association Taxotère-Anthracyclines**

#### **Membres de Jury :**

**Présidente :** M<sup>me</sup>. Rezzagui Abir

**Examinatrice :** M<sup>me</sup>. Azzouz Wassila

**Encadreur :** Pr. Lahouel Masbah

#### **Présenté par :**

\*Hariti Leyla.

\*Kider Nadjah.

\*Lakehel Wafa.

**Année Universitaire : 2016 - 2017**

Numéro d'ordre : .....



## **Remerciements**

*Avant tout, nous remercions ''Allah'' le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur Professeur Lahouel Mesbah qui nous dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nous lui exprimons notre profond respect et nos chaleureux remerciements.*

*Nous exprime nos estimes et notre vif remerciement aux honorables membres de jury : M<sup>me</sup> Azzouz et M<sup>me</sup> Rezzagui pour avoir accepté d'examiner et de juger ce modeste travail qu'elles soient assurées de nos profonds respects et de notre sincère reconnaissance.*

*Nous tenons à remercier profondément M<sup>me</sup> Bouaroudj Zahra, médecine de laboratoire d'analyse de l'hôpital Mejdoub Saïd - Taher, pour son aide, son support et ses encouragements. Nous le remercions pour sa bienveillance et ces conseils. Nos remerciements s'adressent aussi à tous les travailleurs du laboratoire et surtout Tibouche Noura, chef de service de même laboratoire. Sans oublier l'équipe de laboratoire de l'hôpital Mohammed Seddik Ben Yahia - Jijel. Grand merci !*

*Nous offrons nos plus sincères remerciements à toute l'équipe du Laboratoire de recherche de Toxicologie Moléculaire où nous avons fait notre travail pratique : M<sup>me</sup> Kbsa Widad, M<sup>me</sup> Brihoum Hadjer, M<sup>me</sup> Bouhafes leyla, M<sup>me</sup> Bengdouar Lamia et monsieur Yahia. Sans oublier le personnel des laboratoires pédagogique de l'Université de Jijel.*

*Nos remerciements vont également à tous les enseignants et tous les responsables de la faculté de sciences de la nature et de la vie.*

*Enfin nous nous remercions gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Merci*



## *Dédicace*

*À l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail  
que je dédie :*

*À mes très chers parents en témoignage de ma reconnaissance  
pour leur patience, leurs sacrifices et leur soutien tout au long  
de mes études. Qu'Allah leurs prête santé*

*À mes frères: Fatih, Amine et surtout mon petit prince Achraf*

*À ma très chère soeur: Souaâd et À ma grand-mère  
en témoignage de mon affection et ma reconnaissance pour  
leurs encouragements*

*À tous mes amis et collègues en témoignage de mes sentiments  
les meilleurs*

*À tout le groupe de ma promotion*

*À tous ceux que j'aime, sans lesquels tout ceci n'aurait aucun  
sens....*

*Leyla*



## *Dédicace*

*En premier lieu je remercie le Dieu tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté pour terminer ce travail qui je le dédie:*

*À mes parents les personnes les plus chères dans mon cœur pour leur soutien moral et matériel durant toutes mes années d'études que dieu me les gardera pour moi une bougie qui ne s'éteindra jamais.*

*À mon fiancé Abderrahmane Zeraoulia qui, m'a aidé par sa patience et son encouragement.*

*À mes chers frères : Seyfddine, Nadjemaddine et Mohamed pour leurs permanentes présence à mes cotés.*

*À mes très chères sœurs : Nabila, Youssra et Khaoula.*

*À toute les membres de la famille Kider et Zeraoulia.*

*À mes collègues Leyla et Wafa pour les moments de joie et de peine qui nous avons partagé ensemble durant toute la période de nos études.*

*À tous ceux et celles que j'aime et respecte je dédie ce travail...*

*Nadjah*



## *Dédicace*

*En premier lieu je remercie Allah le tout puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.*

*Je dédie ce mémoire :*

*À mes parents :*

*Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux,*

*À mes chers frères : Habib et Hicham.*

*À ma très chère grande sœur Abida et son mari Fateh.*

*À mes belles chères sœurs : Miyada et Faiza.*

*À tous les membres de ma famille, petits et grands.*

*À ma très chère amie Kadi Souhila*

*À mon trinôme Leyla et Nadjah qui sont partagées avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.*

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

*wafa*

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Schéma de l'hématopoïèse chez l'homme.	<b>04</b>
<b>2</b>	L'origine hémisynthétique du Taxotère.	<b>05</b>
<b>3</b>	Biotransformation du Docétaxel.	<b>07</b>
<b>4</b>	Structure des anthracyclines.	<b>09</b>
<b>5</b>	Voies d'induction du stress oxydant par la doxorubicine.	<b>12</b>
<b>6</b>	Structure de base des flavonoïdes.	<b>19</b>
<b>7</b>	Les sites de liaison des ions métalliques sur les flavonoïdes.	<b>20</b>
<b>8</b>	Réduction du DPPH° par un antioxydant.	<b>23</b>
<b>9</b>	Principe de dosage de MDA.	<b>26</b>
<b>10</b>	Principe de dosage de GSH.	<b>27</b>
<b>11</b>	Évaluation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait de la propolis Algérienne (Jijel).	<b>31</b>
<b>12</b>	Évaluation de l'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis à différentes concentration contre le DPPH°.	<b>33</b>
<b>13</b>	Variation du nombre des globules rouges ( $10^6/\mu\text{l}$ ) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose de 25mg/kg de la propolis.	<b>35</b>
<b>14</b>	Variation du taux de l'hémoglobine (g/dl) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose de 25mg/kg de la propolis.	<b>36</b>
<b>15</b>	Variation du pourcentage de l'hématocrite (%) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose de 25mg/kg de la propolis.	<b>36</b>
<b>16</b>	Variation du taux des plaquettes ( $10^3/\mu\text{l}$ ) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose de 25mg/kg de la propolis.	<b>38</b>
<b>17</b>	Variation du nombre des globules blancs ( $10^3/\mu\text{l}$ ) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose de 25mg/kg de la propolis.	<b>39</b>

<b>18</b>	Variation du pourcentage des granulocytes (%) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose 25mg/kg de la propolis.	<b>40</b>
<b>19</b>	Variation du pourcentage des lymphocytes (%) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose de 25mg/kg de la propolis.	<b>40</b>
<b>20</b>	Variation du pourcentage des monocytes (%) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose de 25mg/kg de la propolis.	<b>41</b>
<b>21</b>	Variation des taux du MDA érythrocytaire (nmole/ml) après administration d'une dose unique du Tax (75 mg/m <sup>2</sup> ) et Epi (200 mg/m <sup>2</sup> ) seule ou associée avec l'EEP (25mg/kg).	<b>43</b>
<b>22</b>	Variation des taux du GSH érythrocytaire (µmole/mg d'HB) après administration d'une dose unique du Tax (75 mg/m <sup>2</sup> ) et Epi (200 mg/m <sup>2</sup> ) seule ou associée avec l'EEP (25mg/kg).	<b>44</b>
<b>23</b>	Variation de l'activité enzymatique de la CAT érythrocytaire (UI/mg d'Hb) après administration d'une dose unique du Tax (75 mg/m <sup>2</sup> ) et Épi (200 mg/m <sup>2</sup> ) seule ou associée avec l'EEP (25mg/kg).	<b>46</b>
<b>24</b>	Variation de l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire (UI/ml) après administration d'une dose unique du Tax (75 mg/m <sup>2</sup> ) et Epi (200 mg/m <sup>2</sup> ) seule ou associée avec l'EEP (25mg/kg).	<b>47</b>



## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Évaluation qualitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait de la propolis Algérienne (Jijel).	<b>31</b>
<b>02</b>	variations de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis et de l'acide ascorbique (vitamine C) à différentes concentrations contre le DPPH°.	<b>32</b>
<b>03</b>	Variation de poids corporel (PC) chez les trois groupes de rats au 21 <sup>ème</sup> jour	<b>34</b>
<b>04</b>	Variations du VGM en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une dose de 25mg/kg de la propolis.	<b>37</b>
<b>05</b>	Variations du MCH en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75mg/m <sup>2</sup> et Epi 200mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à une doses de 25mg/kg de la propolis.	<b>37</b>
<b>06</b>	Variations du TCMH en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m <sup>2</sup> et Epi 200 mg/m <sup>2</sup> seule ou associée à doses de 25mg/kg de la propolis.	<b>37</b>

## Liste des abréviations

**BBC** : Réactif de Bradford.

**BSA**: Bovine Sérum Albumine.

**CAT** : Catalase.

**CLP**: Progéniteurs Commus Lymphoïdes.

**CCMH**: Concentration Corpusculaire Moyen en Hémoglobine.

**CMP**: Progéniteurs Commus Myéloïdes.

**CSH**: Cellules Souches Hématopoïétiques.

**DTNB** : Acide 5,5'- Dinitrobenzoïque.

**EAG** : Équivalent Acide Gallique.

**EDTA**: Ethylene Diamine Tetraacetic Acid.

**EEP** : Extrait Ethanolique de Propolis.

**Épi** : Épirubicine.

**EQ** : Équivalent Quercétine.

**FNS** : Formule et Numération Sanguine.

**GMP** : Précurseurs Granulo-Macrophagique.

**GSH** : Glutathion réduit.

**GSSG** : Glutathion Oxydé.

**Hb**: Hémoglobine.

**MDA** : Malondialdéhyde.

**MEP** : Précurseurs Érythro-Mégacaryocytes.

**PNN** : Polynucléaires Neutrophiles.

**RNS**: Reactifs Nitrogen species.

**ROS**: Reactifs Oxygen species.

**SA** : Acide Salicylique.

**SOD** : Superoxyde Dismutase.

**Tax** : Taxotère.

**TBA** : Acide Thioberbiturique.

**TCMH**: Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine.

**TNB**: Acide Thionitrobenzoïque.

**VGM** : Volume Globulaire Moyen.

## Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

### *Sommaire*

<b>Introduction.....</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre I: Analyse bibliographique.....</b>	<b>02</b>
<b>1. Le sang.....</b>	<b>02</b>
1.1 Les composants du sang.....	02
1.1.1. Plasma.....	02
1.1.2. Éléments figurés du sang.....	02
1.2. L'hématopoïèse.....	03
<b>2. Généralité sur les médicaments anticancéreux.....</b>	<b>05</b>
2.1 Taxotère.....	05
2.1.1. Structure et Origine.....	05
2.1.2. Pharmacocinétique et Métabolisme.....	06
2.1.3. Mécanisme d'action anticancéreuse.....	07
2.2. Anthracyclines.....	08
2.2.1. Structure et Origine.....	08
2.2.2. Pharmacocinétique e Métabolisme.....	09
2.2.3. Mécanisme d'action anticancéreuse.....	10
2.3. Association Taxotère-Anthracyclines.....	12
<b>3. Toxicité hématologique des anticancéreux.....</b>	<b>13</b>
3.1. Leuco-neutropénie.....	14
3.2. Lymphopénie.....	15
3.3. Anémie.....	15
3.4. Thrombopénie.....	16
3.5. Toxicité hématologique de l'association Taxotère-Anthracyclines.....	16

3.5.1. Hématotoxicité du Taxotère.....	16
3.5.2. Hématotoxicité des anthracyclines.....	17
3.5.3. Hématotoxicité de l'association.....	17
<b>4. Propolis.....</b>	<b>18</b>
4.1. Composition chimique.....	18
4.2. Activité antioxydante de la propolis.....	19
4.3. Toxicité.....	21
<b>Chapitre II: Matériel et Méthodes.....</b>	<b>22</b>
1. Étude phytochimique de la propolis.....	22
1.1. Préparation de l'extrait éthanolique de la propolis.....	22
1.2. Dosage des polyphénols (TP).....	22
1.3. Dosage des flavonoïdes (TF).....	22
1.4 Évaluation des propriétés anti-radicalaires par le test du DPPH.....	23
2. Étude <i>in vivo</i> .....	24
2.1. Entretien des animaux.....	24
2.2. Traitement des animaux.....	24
2.3. Prélèvement sanguins et préparation des échantillons.....	25
2.4. Méthodes de dosage des paramètres hématologiques (FNS).....	25
2.5. Détermination des marqueurs érythrocytaires du statu oxydant /antioxydant.....	25
2.5.1. Dosage de malondialdéhyde (MDA) érythrocytaire.....	25
2.5.2. Dosage du glutathion (GSH) érythrocytaire.....	26
2.5.3. Dosage de l'activité antioxydante de la catalase (CAT) érythrocytaire.....	28
2.5.4. Dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD) érythrocytaire...	29
3. Analyse statistique des résultats.....	30
<b>Chapitre III : Résultats et Discussion.....</b>	<b>31</b>
1. Nature phytochimique de la propolis.....	31
1.1. Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes.....	31
1.2. Effet anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis vis-à-vis le radical DPPH	32
2. Étude <i>in vivo</i> .....	34
2.1. Sémiologie des animaux.....	34
2.2. Variation des paramètres hématologique (FNS) chez les rats traités et les rats prétraités.....	35
2.3 Variation des paramètres érythrocytaires du statu oxydant/antioxydant chez les rats traités et les rats prétraités.....	42

2.3.1. Variation des concentrations en malondialdéhyde (MDA).....	42
2.3.2. Variation des concentrations en glutathion (GSH).....	44
2.3.3. Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) érythrocytaire.....	45
2.3.4. Variation de l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire.....	47
<b>Conclusion.....</b>	<b>49</b>
<b>Références bibliographique.....</b>	<b>50</b>
<b>Annexes</b>	

Il n'y a aucun traitement qui puisse guérir la majorité des tumeurs malignes, alors que tous les régimes thérapeutiques produisent beaucoup d'effets secondaires, particulièrement la toxicité hématologique. Il est généralement admis que l'administration de différents agents chimiothérapeutiques, même en une seule dose, entraîne une aplasie précoce de la moelle osseuse (Orsolich et *al.*, 2010).

En effet, le Taxotère et l'Épirubicine sont largement utilisés dans la chimiothérapie de différents types du cancer (Radaideh, 2008). Leur association est très efficace, mais elle potentialise les effets secondaires (Peng, 2005). Chacun des deux a une toxicité hématologique marquée, portant surtout sur la lignée granulocytaire (la neutropénie), ainsi que sur les érythrocytes (l'anémie) et les thrombocytes (la thrombocytopenie) ce qui peut entraîner l'arrêt ou le report des cures de la chimiothérapie.

Plusieurs hypothèses ont été suggérées concernant les mécanismes de la toxicité hématologique induite par le Taxotère et l'Épirubicine. La plupart des études mettent en jeu le rôle du stress oxydatif qui est induit par la formation des radicaux libres oxygénés découlant de la métabolisation de ces médicaments (Cao, 2005 ; Koceva-Chyla, 2005).

La propolis représente un formidable espoir dans les traitements du cancer. De nombreux travaux ont montré qu'elle possède des potentialités capables de renforcer les défenses de l'organisme et de réduire la toxicité des médicaments anticancéreux, notamment la toxicité hématologique (Lahouel et *al.*, 2004).

Cependant, il est important de connaître l'origine de cette toxicité. En d'autres termes, est ce que l'association du Taxotère avec l'Épirubicine influence sur les cellules circulantes de sang périphérique ou bien sur les cellules souches hématopoïétiques ? Or, nous pouvons nous interroger à quel niveau intervient la propolis ? Et par quel mécanisme arrive-t-elle à améliorer la formule sanguine et diminuer les différents types de la toxicité hématologique ?

Dans notre recherche, nous nous sommes intéressés à étudier de façon approfondie l'effet hématoprotecteur de la propolis sur la toxicité résultante de l'association Taxotère - Épirubicine.

## **1. Le sang**

Le sang est un tissu conjonctif fluide vital qui compose 8 % de notre poids corporel, se déplace en circuit fermé d'artères et de veines sous l'impulsion du cœur. Il est constitué d'une matrice liquide, le plasma sanguin (55%), où se trouvent les différents éléments figurés (45%) en suspension ; globules rouges, globules blancs et plaquettes (Tortora et Derrickson, 2016).

Le sang assure les principales fonctions de l'organisme telles que le transport de nombreuses molécules (oxygène, dioxyde de carbone, substance nutritives, métabolites, électrolytes), la transmission des signaux hormonaux entre les organes, la défense immunitaire et la régulation de la constante du milieu intérieur en termes de pH (7,4 en moyenne) et de température (38°C) (Silbernagl et Despopoulos, 2001).

### **1.1. Les composants du sang**

#### **1.1.1. Plasma**

Le plasma est un liquide complexe de couleur jaunâtre qui compose 55% du volume total du sang, constitué de 90% d'eau. Il contient plus de 100 solutés, dont des nutriments, des gaz respiratoires, des hormones, des protéines (les albumines, les globulines et le fibrinogène), des déchets de l'activité cellulaire, des ions et des produits résultants du métabolisme des hormones et des médicaments (Ramé et Therond, 2011).

#### **1.1.2. Éléments figurés du sang**

##### **A. Érythrocytes (les hématies)**

Les érythrocytes ou globules rouges, sont des cellules anucléées d'un diamètre d'environ 7.5µm. Elles ne contiennent pas des organites, mais, elles se caractérisent par la présence de l'hémoglobine. Cette molécule, formée d'une protéine (la globine) et de quatre pigments (les hèmes), joue un rôle essentiel dans les échanges gazeux (O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub>). C'est l'ion de fer contenu par chaque hème qui, en s'oxydant, donne sa couleur rouge au sang oxygéné (Marieb, 2009).

Après une durée de vie de 120 jours, l'érythrocyte meurt par vieillissement qui produit une hémolyse physiologique effectuée par les macrophages. La plupart des globules rouges vieillissent terminent leur existence dans la rate dont le réseau de fins capillaires tortueux est un passage à risque pour les cellules fragiles (Sherwood, 2006).

## B. Leucocytes

Les leucocytes (leukos : blanc) ou globules blancs, sont les seuls éléments figurés du sang à posséder un noyau et les organites habituels. Ces cellules ont le rôle de protéger et de défendre l'organisme contre les bactéries, les substances étrangères, les virus, les parasites, les toxines et les cellules tumorales. Le nombre normale des leucocytes est situé entre 4000 à 11 000/mm<sup>3</sup>, on distingue deux grandes catégories (Marieb, 2009) :

\* **Les granulocytes ou les polynucléaires** : leur noyau est plus ou moins segmenté en lobes et leur cytoplasme contient de nombreux granules enveloppés de membrane. Ils sont divisés en trois classes: les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. La fonction principale et commune des polynucléaires est la phagocytose (Sherwood, 2006).

\* **Les agranulocytes** : sont des cellules mononucléaires ayant un noyau volumineux non segmenté et ne contient pas les granules cytoplasmiques. Elles sont classées en deux groupes : des monocytes qui sont des macrophage peuvent phagocyter des fragments de très grande taille et des lymphocytes capables de produire des anticorps ou de sécréter des substanses chimique pour combattre les cellules infectées (Sherwood, 2006).

## C. Thrombocytes

Les thrombocytes ou plaquettes sanguines, sont de petits fragments cytoplasmiques anucléés de forme discoïde à un diamètre de 2 à 4 µm, possédant de nomdreuses granulations. Un litre de sang contient de 150 à 400 × 10<sup>9</sup> thrombocytes. Lorsqu'un vaisseau est lésé, il se produit une adhésion et une agrégation des thrombocytes au niveau de la lésion afin de former un bouchon appelé clou plaquettaire, leurs grannulation contiennent également des substances chimiques qui favorisent la coagulation (Versteeg et al., 2013).

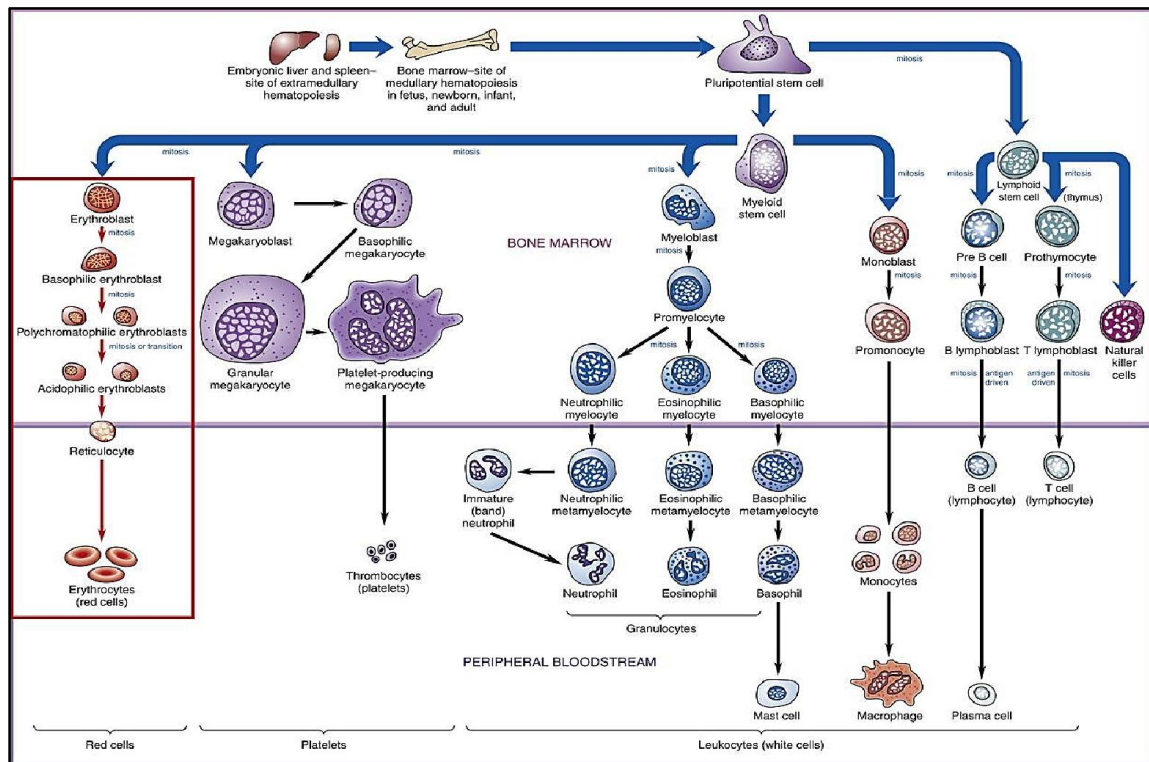
Les plaquettes circulent dans le sang pendant une durée de dix jours, leur destruction se fait ensuite essentiellement dans la rate et le foie par l'intermédiaire des macrophagocytes (Sherwood, 2006).

### 1.2. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse (figure 1) est le processus permettant à l'organisme de renouveler constamment ses réserves cellulaires sanguines et ainsi, de maintenir son homéostasie (Cloutier et al., 2014). Au cours du développement embryonnaire, l'hématopoïèse se déroule d'abord dans les îlots sanguins de la vésicule vitelline puis dans le foie, la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse au



cours des trois derniers mois du développement intra-utérin. Chez l'adulte, elle se déroule uniquement dans la moelle osseuse de l'os sternal, des os iliaques et de la tête fémorale (Tortora et Derrickson, 2016).



**Figure 1 :** Hématopoïèse chez l'homme (Tortora et Derrickson, 2016).

Ce processus est initié dans la moelle osseuse rouge par des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pluripotentes ou hémocytoblastes ayant un haut pouvoir de prolifération, capable d'autorenouvellement et de différenciation en réponse à des stimulus provenant de certaines hormones vers toutes les lignées du système hématopoïétique (Tortora et Derrickson, 2016). Les CSH s'engagent dans une différenciation pyramidale, elles perdent d'abord leur capacité d'autorenouvellement, et s'engagent vers des cellules multipotentes, capables de donner des progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) à l'origine des lymphocytes (NK, T et B) et des progéniteurs communs myéloïdes (CMP). Ces derniers donneront les précurseurs des lignées granulo-macrophagiques (GMP), qui donneront les polynucléaires et les macrophages, et les précurseurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) qui fourniront les globules rouges et les plaquettes (Sherwood, 2006 ; Dingli *et al.*, 2007).

Avant de quitter la moelle osseuse vers le sang périphérique pour le maintien de l'homéostasie, ces cellules acquièrent progressivement la morphologie et les composants cellulaires de leur lignée (Merthelsman *et al.*, 2011).

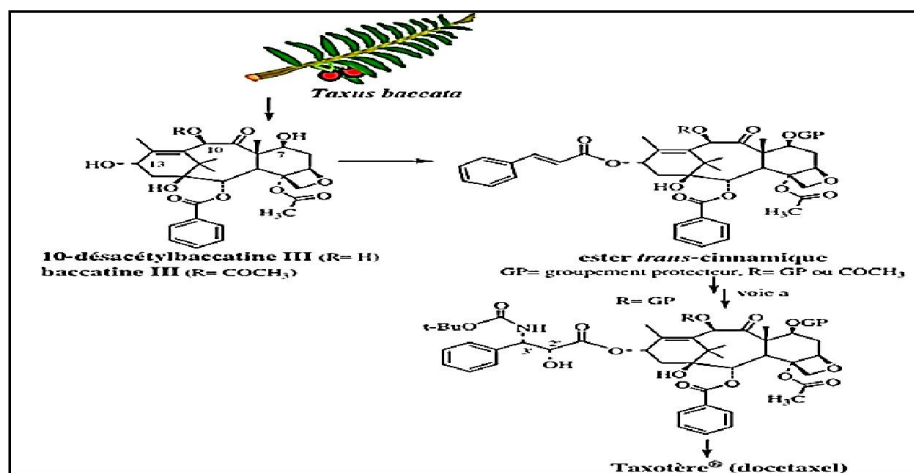
## 2. Généralité sur les médicaments anticancéreux : Taxotère et Anthracyclines

### 2.1. Taxotère

#### 2.1.1. Origine et Structure

Le Taxotère (Docétaxel :  $C_{43}H_{53}NO_{14} \cdot 3H_2O$ ) est un taxoïde de seconde génération qui a une forte cytotoxicité et une activité de type antimétabolique (Guénard et *al.*, 2003 ; Al Nakouzi, 2011). C'est un dérivé hémisynthétique d'un précurseur ; qui possède déjà la partie diterpénique complexe des taxanes, isolé des feuilles de l'if d'Europe (*Taxus baccata*), le 10-déacétyl-baccatine III (figure 2), synthétisé en 1986 par l'Institut Français de Chimie des Substances Naturelles en collaboration avec le Centre National de la Recherche Scientifique par chimie extractive (Vallata, 2009 ; Al Nakouzi, 2011; Parent et *al.*, 2013).

Ce produit naturel peut être isolé facilement d'une source naturelle renouvelable, les feuilles d'if, avec des rendements satisfaisants (environ 1 g/kg de feuilles sèches) contrairement à l'extraction de Taxol à partir des écorces qui est laborieuse, peu rentable (environ 100 mg/kg d'écorces sèches), et nécessite l'abattage des arbres (Guénard et *al.*, 2003).



**Figure 2** : Origine hémisynthétique du Taxotère (Guénard et *al.*, 2003).

Sur le plan structural, le Taxotère est un diterpène tricyclique formé d'un squelette « taxane » avec un noyau « oxétane » et d'une chaîne latérale estérifiée sur C13 (figure 3). Ces éléments sont indispensables pour conférer son activité cytotoxique.

Ce médicament, mis sur le marché depuis 1995, est utilisé en chimiothérapie anti-cancéreuse, notamment, dans le traitement des cancers du sein, le cancer du poumon non à petites cellules, le

cancer de la prostate, les cancers de la tête et du cou, le cancer gastrique et d'autres indications. (El-m'hadi et *al.*, 2016).

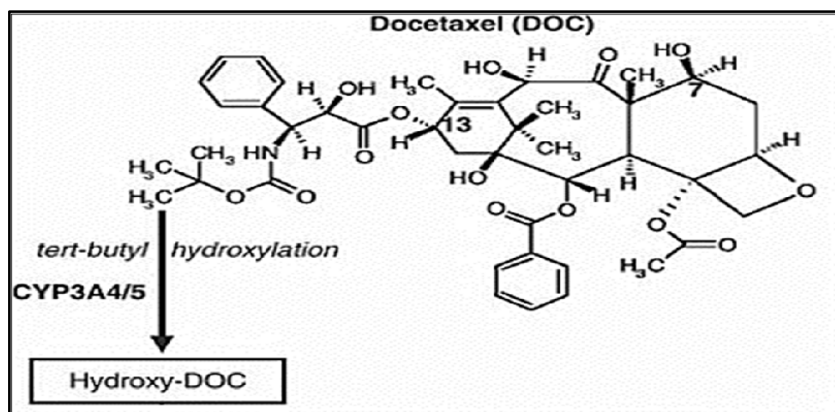
### 2.1.2. Pharmacocinétique et Métabolisme

Les études de pharmacocinétique ont montré que le Taxotère suit un profil cinétique plasmatique multiphasique à 3 compartiments caractérisé par des demi-vies  $\alpha$  (4 min),  $\beta$  (36 min) et  $\gamma$  (11.1 h) respectivement et qui est indépendant de la dose, de la fréquence et de la durée d'administration (Clarke et Rivory, 1999 ; Sanofi Aventis, 2016). Ce médicament a une bonne distribution tissulaire et un métabolisme hépatique important :

Lorsqu'il est administré par voie intraveineuse, le docétaxel se distribue dans tous les tissus et les organes, sauf le cerveau (des taux extrêmement faibles). Il est également détecté chez le fœtus, dans le tissu tumoral et le lait maternel (Sanofi Aventis, 2016). De plus, le docétaxel se fixe fortement aux protéines plasmatiques avec une proportion qui dépasse 95 % de manière concentration indépendante (sachant que : seulement la fraction libre est cliniquement active) (Baker et *al.*, 2005). Il peut se lier aux lipoprotéines, à l'albumine et avec une grande affinité à l' $\alpha$ 1-glycoprotéine acide (AAG ; qui est souvent élevée au cours des inflammations chroniques et des cancers avancés) (Bruno et *al.*, 1998).

L'élimination du docétaxel à partir de l'organisme est très rapide, mais à partir de tissu tumoral est plus lente (Sanofi Aventis, 2016). De plus, leur clairance d'élimination est diminuée chez les patients âgés ou chez les patients dont le taux d'AAG ou d'enzymes hépatiques sont élevés (Parent et *al.*, 2013). Il est éliminé principalement par excrétion fécale, après avoir subi un métabolisme et une excrétion hépatiques (75%) du produit administré se retrouve dans les fèces, essentiellement sous forme de métabolites et en faible quantités sous forme inchangée) (Sanofi Aventis, 2016). Ce médicament avec ses métabolites sécrétés dans la bile subissent un cycle entéro-hépatique et sont encore sécrétés directement par les entérocytes (Parent et *al.*, 2013). De plus, il n'est pas absorbé considérablement par l'appareil digestif ainsi que leur excrétion urinaire est très limitée (Sanofi Aventis, 2016).

Des études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont montré que le métabolisme du docetaxel (figure 3) implique l'action des mono-oxygénases, en particulier les isoenzymes CYP3A4 et CYP3A5 du cytochrome P450 (Sanofi Aventis, 2016). Le principal métabolite est l'hydroxydocétaxel issue après monohydroxylation du groupe tert-butyl de la chaîne latérale en C1 (Rodriguez-Antona et Ingelman-Sundberg, 2006).



**Figure 3 :** Biotransformation du Docétaxel (Rodriguez-Antona et Ingelman-Sundberg, 2006).

En outre, il n'a été établi aucune interaction pharmacocinétique durant une étude clinique qui a été effectuée pour évaluer le profil pharmacocinétique du docétaxel (Taxotère) en traitement d'association (TAC) (Sanofi Aventis, 2016).

### 2.1.3. Mécanisme d'action anticancéreuse

Le Taxotère est un antinéoplasique dont l'action est dû à la désorganisation du réseau de microtubules (Sanofi Aventis, 2016). Ces derniers affectent un grand nombre de fonctions cellulaires vitales et dans la formation du fuseau mitotique permettant les mouvements des chromosomes lors de la mitose avant la division cellulaire (Parent et *al.*, 2013).

Dans la cellule, il existe un équilibre dynamique entre la formation de ces microtubules par la polymérisation de tubuline, formée de 2 sous unités ( $\alpha$  et  $\beta$ ), et leur dépolymérisation (Parent et *al.*, 2013). L'activité globale du docétaxel est de favoriser la polymérisation de tubuline en microtubules sans modifier le nombre de protofilaments tout en inhibant leur dépolymérisation, ce qui aboutit à la formation continue de microtubules stables non fonctionnels (Parent et *al.*, 2013; Sanofi Aventis, 2016) et donc, à l'interruption de la mitose et de la réplication cellulaire, responsable d'un effet cytotoxique (antiprolifératif) quatre fois plus important que les autres taxanes (Zhou et *al.*, 2005).

Le docétaxel est actif particulièrement au cours de la phase S du cycle cellulaire (Braakhuis et *al.*, 1994). Kofschoten et *al.*, (2002) ont indiqué que l' $IC_{50}$  du docétaxel était comprise entre 0.23 et 2.30 nM. De plus, il a été montré que le docétaxel est 10 à 100 fois plus puissant sur la

phosphorylation de Bcl-2 que le paclitaxel, ce qui pourrait expliquer son efficacité supérieure à celle du paclitaxel (Haldar *et al.*, 1997).

D'après des études récentes, il a été prouvé que le docétaxel pourrait avoir un double mécanisme selon la concentration utilisée (Hernandez *et al.*, 2007): à forte dose, il permet de stabiliser les microtubules en induisant une activation prolongée du point de contrôle (Checkpoint), ce qui conduit à l'apoptose (Hernandez *et al.*, 2007 ; Kops *et al.*, 2005 ). Par contre, à faible dose, il modifie la dynamique des microtubules sans les stabiliser en induisant une activation transitoire du point de contrôle, ce qui conduit à un court arrêt de la mitose et les descendants seront aneuploïdes (Kops *et al.*, 2005).

Des études ont été faites pour évaluer l'effet de traitements associant le docétaxel à plusieurs autres produits anticancéreux de référence et aucune synergie n'a été décelée entre le cisplatine ou la doxorubicine. Tandis qu'avec la vincristine, il a été observé un effet additif et une synergie avec le cyclophosphamide et le 5-fluorouracil (Sanofi Aventis, 2016).

## 2.2. Anthracyclines

### 2.2.1. Origine et Structure

Les anthracyclines sont des antibiotiques antinéoplasiques (Sawyer *et al.*, 2010), isolées pour la première fois naturellement à partir des *streptomyces* (des actinobactéries) en 1960 (daunorubicine et doxorubicine). Après, elles sont produites par hémisynthèse à partir de la daunorubicine tels que l'épirubicine (Andrieu-Abadie, 2004 ; Ben Moussa, 2012), qui est produite suite à l'apparition d'une résistance des cellules à la doxorubicine et des effets secondaires indésirables. Mais, différentes études montrent qu'il peut induire les mêmes effets secondaires, bien que la dose cumulative pour l'apparition des symptômes est deux fois plus élevée pour l'épirubicine que pour la doxorubicine (Minotti *et al.*, 2004). Cependant, aujourd'hui, elles sont produites synthétiquement, comme l'idarubicine et l'amrubicine (Nikitovic *et al.*, 2014 ; Kumar *et al.*, 2015 ; Fernandes *et al.*, 2016).

Actuellement, ils sont largement utilisés en clinique pour le traitement de différent types de cancer, dont les leucémies, les lymphomes et pour les tumeurs solides, ainsi qu'elles sont considérées comme des molécules références (Tacar *et al.*, 2013).

La structure moléculaire des anthracyclines (figure 4) comporte une partie aglycone qui est composée d'un noyau polyaromatique tétracyclique hydrophobe responsable du caractère coloré des anthracyclines (groupe chromophore), portant la complexe hydroquinone et quinone (accepteur et donneur d'électrons), attaché au niveau du C7 du cycle A à une partie glucidique hydrophile ; la daunosamine. La structure moléculaire des diverses anthracyclines diffèrent par l'ajout de radicaux (Mazevet, 2015).

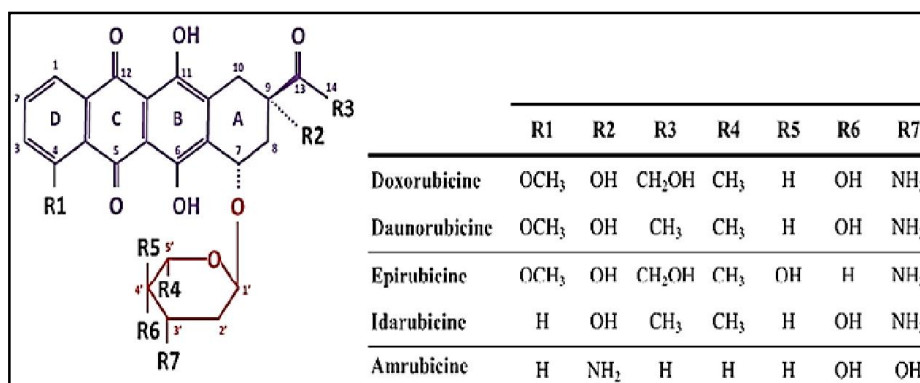


Figure 4 : Structure des anthracyclines (Mazevet, 2015).

### 2.2.2. Pharmacocinétique et Métabolisme

Les études pharmacocinétiques montrent que les anthracyclines possèdent un profil triphasique (distribution, métabolisme et élimination) (Hortobágyi, 1997 ; Tannock et Hill, 1998). Après injection intraveineuse (afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradées), elles sont fortement liées aux protéines plasmatiques (75%) surtout l'albumine et rapidement éliminées de la circulation sanguine pour atteindre les différents organes, notamment les poumons, le foie, le cœur, la rate, la moelle osseuse et les reins (Robert et Gianni, 1993 ; Hande, 1998 ; Campos et al., 2012). Mais elles ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique (Hande, 1998).

Les anthracyclines diffusent passivement à travers les membranes plasmiques par un mouvement de flip-flop grâce à leur hydrophobicité (Ferte, 2000 ; Regev et al., 2005). Leur accumulation intracellulaire dépend de la cinétique d'incorporation qui est fonction des mécanismes d'influx par diffusion passive et d'efflux actif par la P-glycoprotéine (P-gP) (Gallois et al, 1996).

Ces molécules subissent un métabolisme hépatique rapide, via le cytochrome P450 (Tacar, 2013). Elles sont métabolisées en deux métabolites actifs : un métabolite aglycone (agly-doxorubicine dans le cas de la doxorubicine) qui résulte de la réduction de la liaison O-glycosidique et de la perte de la daunosamine et un métabolite alcool secondaire, issue de la réduction de la fonction cétone en C13, appelé doxorubicinol qui est le principale métabolite de la doxorubicine et l'épirubicinol pour l'épirubicine (Gambliel et al., 2002 ; Lal et al, 2010 ; Pfizer Canada, 2014).

L'excrétion biliaire est la principale voie d'élimination des anthracyclines et de ses métabolites ; environ 40-50 % de la dose administrée sont récupérés dans la bile. Cependant, 5 à 15% de la dose administrée de la doxorubicine et 9 à 10 % de l'épirubicine serait excrété par la voie rénale (Pfizer Canada, 2014).

### **2.2.3. Mécanismes d'action anticancéreux**

#### **2.2.3.1. Intercalation dans l'ADN**

Dans ce mécanisme, les anthracyclines se lient de façon covalente aux doubles-brins de l'ADN. Leur structure multicyclique plane leur permet de former des adduits ou ponts (crosslink) en s'insérant de façon réversible entre deux paires de bases azotées adjacentes dans la double hélice au niveau de la guanine du côté 5' (5'-GCN) et d'y contracter des liaisons hydrophobes et électrostatiques pour former un complexe [ADN-Anthracycline] (Szulawska et Czyz, 2006).

De ce fait, les anthracyclines modifient le cadre de lecture lors de la synthèse par les polymérases, ce qui entraîne l'inhibition de la réplication, la transcription et donc la synthèse des diverses protéines nécessaires à la survie de la cellule. De plus, le complexe ADN-anthracycline est plus susceptible d'être clivé et d'activer ainsi une réponse cellulaire liée aux bris simples brins en induisant l'apoptose des cellules (Wallace, 2003).

#### **2.2.3.2. Inhibition de l'enzyme topoisomérase II**

Les anthracyclines sont capable d'inhiber la topoisomérase II, enzyme nucléaire qui a un rôle clé dans les processus de réplication, de réparation, de transcription, de condensation de la chromatine et de ségrégation chromosomique (Corbett et *al.*, 2004 ; Rao, 2013 ; Hang et *al.*, 2016 ).

La stabilisation de l'enzyme par l'intercalation des anthracyclines et la formation d'un complexe ternaire stable [anthracycline-ADN-topoisomérase II] produit des cassures mono ou double brin de l'hélice d'ADN empêchant ainsi la religation des brins (Chabner et *al.*, 2006). Ce qui entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M et la mort de la cellule par apoptose (Dal Ben et *al.*, 2007 ; Chen et *al.*, 2013). Les cellules en phase G0, ne possédant que peu de topoisomérases II, sont peu sensibles à ces agents (Lansiaux et Pourquier, 2011).

### 2.2.3.3. Inhibition de la synthèse d'ADN

L'action pro-apoptotique des anthracyclines est en partie initiée par les radicaux libres, qui activent la protéine p53 et sa fixation sur l'ADN. La p53 y inhibe la transcription du gène Bcl-XL (médiateur anti apoptotique) et active celle du gène Bax (médiateur pro apoptotique) qui induit la libération du cytochrome c par la mitochondrie. Cette libération du cytochrome c entraîne la formation de l'apoptosome, complexe effecteur comprenant l'apoptosis activating factor-1 (Apaf-1), le cytochrome c et la pro-caspase-9. La p53 interagit aussi avec la topoisomérase II, dont elle inhibe la fonction ligase (Minotti et *al.*, 2004).

### 2.2.3.4. Production du stress oxydatif

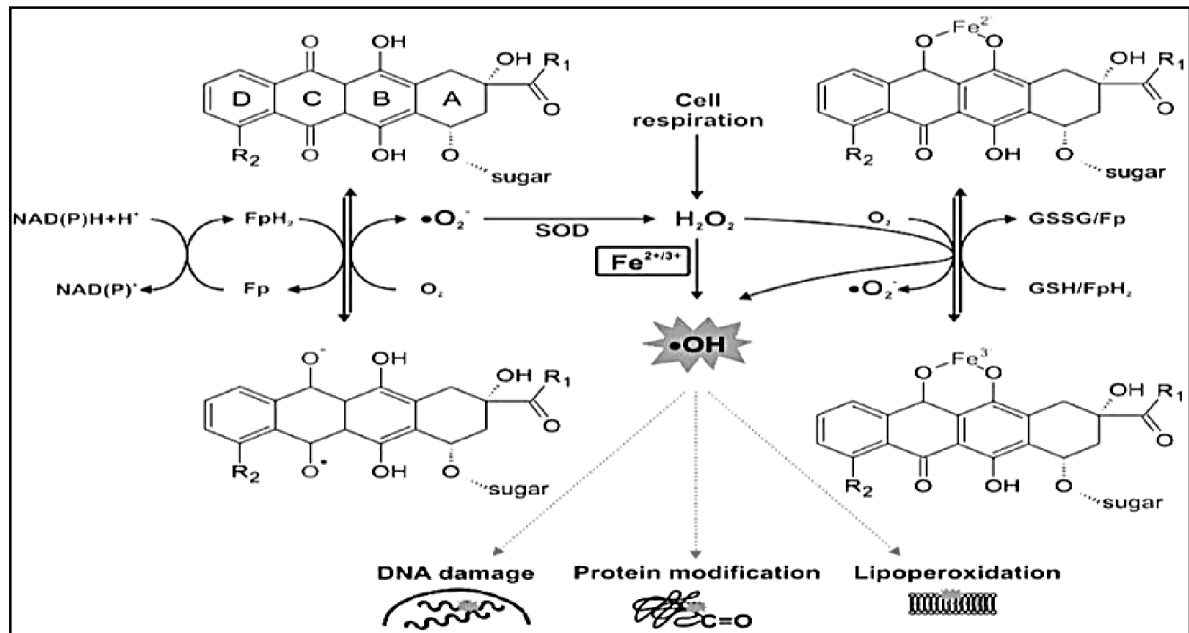
Le métabolisme des anthracyclines entraîne la formation des espèces oxygénées hautement réactives (figure 5), principalement l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyl ( $\bullet OH$ ) (Singal et *al.*, 1997).

Ainsi, la réduction de la forme quinone présent dans le cycle C des anthracyclines en forme semi-quinone radicalaire par l'addition d'un électron peut être générée par différentes enzymes telles que la xanthine oxydase, la NADH déhydrogénase et la NADPH cytochrome P-450 réductase (Yang et *al.*, 2014).

Lors de l'oxydation de la forme semi-quinone d'anthracyclines, l'électron perdu peut être transféré à une molécule d'oxygène ( $O_2$ ) pour former l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) qui sera également oxydé par le superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). A ce stade, le  $H_2O_2$  peut entraîner la formation de radicaux hydroxyls ( $\bullet OH$ ), un des radicaux libres les plus réactifs et destructifs, mais peut aussi être éliminé par la catalase et la glutathion peroxydase (Iarussi et *al.*, 2001).

Une deuxième voie de génération de radicaux libres par les anthracyclines fait intervenir la formation d'un complexe organo-métallique entre les anthracyclines et le fer (figure 5). Au sein de la cellule, l'ion ferrique  $Fe^{3+}$  libre se lie à trois molécules d'anthracyclines pour former un complexe très stable :  $Fe^3$  (anthracycline)<sup>3</sup>. Ce complexe peut subir un cycle interne d'oxydo-réduction, donnant naissance à un complexe radicalaire  $Fe^2$  (anthracycline)<sup>3</sup>. Ce dernier peut céder son électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire et aboutir ainsi à la formation des ROS.





**Figure 5 :** Voies d'induction du stress oxydant par la doxorubicine (Stërba et *al.*, 2013).

Ces molécules instables capables d'endommager l'ADN et les protéines, ainsi qu'elles provoquent l'oxydation des lipides polyinsaturés (peroxydation lipidique) avec la désorganisation des membranes cellulaires et le dysfonctionnement de la respiration mitochondriale (Yang et *al.*, 2014). Les dégâts induits sont souvent très importants et provoquent la mort de la cellule par apoptose (Yang et *al.*, 2014). Cela est dû lorsque la concentration des anthracyclines est supérieure à celle normalement administrée en clinique (Volkova et Russell, 2011 ; Yang et *al.*, 2014).

De plus, l'usage de molécules antioxydantes en même temps que l'administration des anthracyclines n'empêche pas son activité antinéoplasique (Takemura et Fujiwara, 2007).

### 2.2.3.5. Interaction avec les membranes plasmiques

Les anthracyclines s'associent avec les phospholipides par interactions ionique et exerce son action cytotoxique directement en modifiant les propriétés de fluidité membranaire (Lubgan et *al.*, 2006).

## 2.3. Association Taxotère-Anthracyclines

Le docétaxel a montré une activité synergique *in vitro* et *in vivo* en association avec d'autres agents cytotoxiques, tels que le 5-fluorouracile, le cyclophosphamide et le méthotrexate (mais seulement une activité additive avec des anthracyclines) (Minckwitz, 2007).

Le profil pharmacocinétique du docétaxel n'est pas modifié par l'épirubicine, la doxorubicine ou le cyclophosphamide, même lorsque les deux derniers sont co-administrés avec le docétaxel en tant que traitement combiné (TAC). Cependant, une augmentation transitoire, mais significative, des

concentrations plasmatiques d'épirubicine a été observée lorsqu'il a été co-administrée avec du docétaxel (Ceruti et *al.*, 1999).

La majorité des données des essais cliniques suggèrent que l'ajout des taxanes à une chimiothérapie adjuvante à base d'anthracycline améliore de manière significative la survie par rapport au régime à base d'anthracycline sans taxane (De Laurentiis et *al.*, 2008).

Une combinaison de doxorubicine et de docétaxel (AT) a été comparée à FAC dans une étude néerlandaise comprenant 216 patientes atteintes de cancer du sein métastatique (Bontenbal et *al.*, 2005). Tous les résultats étaient en faveur du régime AT, avec une amélioration significative du taux de réponse global de 37% avec FAC à 58% avec AT ( $p = 0,003$ ) (Bontenbal et *al.*, 2005).

### 3. Toxicité hématologique des anticancéreux

La chimiothérapie reste le traitement de référence dans de nombreux types de cancer avec un bénéfice certain sur la survie sans récurrence et la survie globale (Viret et *al.*, 2006). La plupart des cytotoxiques antinéoplasiques n'affectent que la propriété proliférative des cellules (Maire, 2010). Ils sont donc particulièrement actifs sur les tissus à renouvellement rapide comme le sont les cellules tumorales, mais également sur certaines cellules de tissus sains, comme par exemple, les cellules sanguines, les cellules de la moelle osseuse, des follicules pileux et de la reproduction (Bouchard et *al.*, 2005 ; Poirot, 2014). Autrement dit, son mode d'action ne permet pas de distinguer les cellules saines des cellules tumorales ; donc, cette non spécificité est à l'origine de différents effets secondaires (Poirot, 2014).

Les cellules saines possèdent cependant une aptitude remarquable à retrouver leur fonction normale, donc généralement, la plupart des effets toxiques sont rapidement réversibles et disparaissent à la fin du traitement, comme l'aplasie médullaire (Bouchard et *al.*, 2005).

La majorité des patients traités pour le cancer présente à un moment une perturbation de la fonction hématopoïétique (synthèse des cellules sanguines, figure 1) (Poirot, 2014). La myélotoxicité (la myélosuppression) ou toxicité sur les cellules souches hématopoïétiques est la plus précoce et la plus fréquente des toxicités aiguës des anticancéreux (c'est une toxicité dose-limitante) (Viret et *al.*, 2006).

Cette toxicité peut toucher toutes les lignées hématopoïétiques se manifestant sous la forme d'une leucopénie (la plus précoce et la plus fréquente), d'une anémie ou d'une thrombopénie. Cette différence en fonction des lignées provient des différences de durée de vie de ces éléments figurés

du sang (4-5 jours pour les leucocytes, 8-12 jours pour les plaquettes et 120 jours pour les hématies) (Monassier, 2012). De plus, en fonction des médicaments anticancéreux utilisés, elle peut :

- Soit affecter les cellules souches en voie de différenciation vers les 3 lignées cellulaires ; leucocytes, érythrocytes et plaquettes. Alors que les cellules souches auto-renouvelables sont épargnées. Ce qui est à l'origine de la réversibilité de cet effet indésirable sérieux et potentiellement mortel. Habituellement, elle est rapidement réversible, non cumulatif et dose-dépendant (Madelaine et al., 2008 ; Monassier, 2012).

- Soit toucher les cellules souches totipotentes, et donc, elle sera retardée, cumulative et durable. Ce cas est observé avec certains cytotoxiques comme les Nitroso-urées, la Mitomycine C, le Busulfan et le Carboplatine (Joly-Lobbedez, 2011 ; Monassier, 2012).

Cette hématotoxicité provoque le plus souvent des retards dans les traitements et des réductions de doses. Presque tous les agents entraînent un certain degré de cytopénie qui peut porter sur les trois lignées cellulaires. Cependant, les complications potentiellement graves sont liées à la neutropénie ou à la thrombopénie. L'anémie, quant à elle, est le plus souvent modérée et ne limite pas la dose (Marie, 2012).

### 3.1. Leuco-neutropénie

La diminution du nombre de PNN (Polynucléaires neutrophiles) est la première manifestation de la myélosuppression. Elle s'accompagne d'accidents infectieux lorsqu'elle chute en-dessous de 1 G/l, la gravité de cette dernière dépendra de sa profondeur et de sa durée (Goyette, 2012). Les patients neutropéniques ont comme principal facteur de risque la survenue d'une neutropénie fébrile (Viret, 2006), qui se définit par une fièvre ( $>38,5^{\circ}\text{C}$ ) et une importante neutropénie ( $<500 \times 10^6/\text{L}$ ) (Freifeld, 2011 ; Goyette, 2012).

La réserve médullaire en précurseurs de cellules matures circulants de la lignée leucocytaire peut compenser leur diminution pendant 8 à 10 jours. Au-delà, le taux de neutrophiles chute pour devenir minimal entre le 14<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour avant d'être compensé à partir du 21<sup>ème</sup> jour et de se normaliser le 28<sup>ème</sup> (Daly-Schweitzer, 2008). La chimiothérapie des tumeurs solides entraîne des neutropénies de courte durée (3-7 jours), le plus souvent entre le 8<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour après la cure de la chimiothérapie (Goyette, 2012).

La numération des PNN et la détermination du grade de neutropénie constitue un des paramètres majeurs dans la décision de débuter ou retarder une cure ou de modifier les doses (Madelaine et *al.*, 2008). Toutes les molécules sont neutropéniantes. Les associations ont un effet synergique sur la myélotoxicité (Aapro et *al.*, 2011). Parmi les chimiothérapies pour lesquelles le pourcentage de patients ayant développé une neutropénie fébrile élevée (Aapro et *al.*, 2011) : Docétaxel (33%), Etoposide/Cisplatine (54%), Protocole TAP « Paclitaxel, Doxorubicine, Cisplatine » (59%), Protocole A/NCVB « Doxorubicine ou Mitoxantrone, Cyclophosphamide, Vindésine, Bléomycine » (78%) (Aapro et *al.*, 2011).

### 3.2. Lymphopénie

La lymphopénie est souvent observée en parallèle de la neutropénie et elle peut induire une immunodépression. Ses manifestations cliniques sont représentées par des infections opportunistes bactériennes, mycosiques, virales ou parasitaires. La récupération d'une lymphopénie est lente (Monassier, 2012 ; Poirot, 2014). Parmi les chimiothérapies lymphopéniantes : les agents alkylants (Cyclophosphamide et les antimétabolites puriniques). Ainsi que l'Alemtuzumab, le Pazopanib, le Rituximab, le Sorafé-nib, le Sunitinib et l'Everolimus (Poirot, 2014).

### 3.3. Anémie

La plupart des chimiothérapies entraîne à long terme une anémie, qui peut être d'origine centrale ou périphérique par hémolyse (Monassier, 2012). Elle est définie par un taux d'hémoglobine (Hb) plasmatique atteignant moins de 11g/dl chez la femme et 12g/dl chez l'homme. Elle est la conséquence de la diminution du taux des érythrocytes.

La toxicité est inconstante et souvent associée à des signes de dysérythropoïèse d'où le fait que l'anémie soit très souvent normocytaire (érythrocytes de taille normale), normo ou hypochrome (taux d'Hb diminué) avec un taux de ferritine et de réticulocytes élevés et parfois, elle est macrocytaire (cisplatine notamment) (Poirot, 2014).

Le Sunitinib, le Sorafénib et l'Everolimus provoquent une anémie dans plus de 50% des cas. Une méta-analyse a démontré que l'utilisation des thérapies ciblées en monothérapie augmentait le risque d'anémie (Even et Pecuchet, 2011 ; Joly-Lobbedez, 2011 ; Barni et *al.*, 2012).

### 3.4. Thrombopénie

La chute du taux de thrombocytes (ou plaquettes) est due à la toxicité cumulative des anticancéreux sur la lignée mégacaryocytaire. Le nadir est plus tardif que pour les PNN : 2 à 4 semaines et la récupération des valeurs normales est plus lente : jusqu'à 6 semaines. Certains anticancéreux (Gemcitabine) provoquent des thrombopénies non cumulatives par toxicité spécifique sur les plaquettes. Le risque majeur de cette toxicité est l'hémorragie, non corrélée au taux de plaquettes mais devenant importante lorsque elle chute sous 30 g/L (Madelaine et *al.*, 2008).

Les cytotoxiques les plus thrombopéniants sont : les Nitroso-urées, la Mitomycine C, le Témzolomide, le Carboplatine, le Topotécan, le Busulfan et le Cyclophosphamide à fortes doses et le Melphalan en traitement continu ou à fortes doses (Joly-Lobbedez, 2011).

### 3.5. Toxicité hématologique de l'association Taxotère-Anthracyclines

#### 3.5.1 Hématotoxicité du Taxotère

Malgré les effets prometteurs récemment signalés du docétaxel, ce médicament est lié à une toxicité systémique qui limite la dose et la durée du traitement, surtout chez les patients âgés (Petrylak, 2006). Les effets indésirables les plus fréquentes (grade 3/4) liés au traitement par le docétaxel incluent : la neutropénie (75,4%), la leucopénie (31,6%), la neutropénie fébrile (11,0%), l'anémie (8,8%), les infections (6,1%), la suppression de la moelle osseuse (3,6%) (Petrylak, 2006 ; El m'hadi et *al.*, 2016).

La neutropénie a été l'effet indésirable le plus fréquemment observé : 75 % des patients ont connu un épisode de neutropénie sévère (<500 neutrophiles/mm<sup>3</sup>). Le nadir médian se situe à 8 jours, pour une durée médiane de 7 jours. Une anémie (hémoglobininémie <11 g/dL) a été observée chez 89 % des patients dont 9,5 % pour lesquels l'anémie a été sévère (hémoglobininémie <8 g/dL) (Lavelle et *al.*, 1995 ; Aventis Pharma SA, 2003).

D'après une récente étude comparative entre le médicament original de docétaxel et ses génériques, la toxicité hématologique était la plus fréquente (32,6% dans les médicaments génériques et 13,2% dans le médicament d'origine) avec un taux très élevé d'arrêt du traitement (39,5% pour les médicaments génériques et 7,9% pour le médicament d'origine) (El m'hadi et *al.*, 2016).

Une autre étude Canadienne rétrospective a comparé un seul générique de docétaxel avec l'original chez 364 patientes atteintes d'un cancer du sein. Les résultats ont montré que la neutropénie fébrile de grade 4 était la toxicité la plus élevée (original : 56,3% vs générique : 78,8%,) (Poirier et *al.*, 2014). Donc, pour les doses habituellement utilisées de docétaxel (60-100 mg/m<sup>2</sup>, perfusion tous les 21 jours), la toxicité est principalement hématologique (Petrylak, 2004).

### 3.5.2. Hématotoxicité des anthracyclines

Les anthracyclines (doxorubicine et l'épirubicine) sont des anticancéreux cytotoxiques largement utilisés dans la chimiothérapie. Mais, malgré les effets prometteurs récemment signalés, ces agents sont capables d'altérer les cellules normales et de provoquer différentes toxicités, notamment la toxicité hématologique qui fait partie des préoccupations majeures limitant l'efficacité du traitement ou altérant la qualité de vie des patients traités aux anthracyclines (Shivakumar et *al.*, 2012 ; Pfizer Canada, 2014).

L'emploi de ces molécules peut provoquer une dépression médullaire grave menant à une baisse du nombre de globules sanguins. La leucopénie ou la granulocytopenie (neutropénie) sont les principales manifestations de toxicité hématologique des anthracyclines (la numération leucocytaire peut descendre jusqu'à 1000/mm<sup>3</sup> avec l'épirubicine). La thrombopénie et l'anémie sont également possibles. Une dépression profonde et tenace de la fonction médullaire peut se traduire par une surinfection ou une hémorragie (Pfizer Canada, 2014).

Dans une étude menée chez des patientes atteintes d'un cancer du sein au stade précoce traités par la doxorubicine, la fréquence des cas de dépression médullaire grave a été de 0,3 % pour la leucopénie de grade 4, de 3 % pour la leucopénie de grade 3 et de 0,1 % pour la thrombopénie de grade 4. En outre, l'administration d'épirubicine peut causer une neutropénie (Pfizer Canada, 2014). Donc, l'emploi de ces agents exige une attention particulière, compte tenu du risque de complications cliniques dues à une dépression profonde de la fonction médullaire. Ainsi que les manifestations de leur toxicité hématologique peuvent exiger la diminution de la dose, le report ou l'arrêt du traitement (Pfizer Canada, 2014).

### 3.5.3 Hématotoxicité de l'association (TA)

La combinaison de docétaxel et des anthracyclines induit une neutropénie (de grade 4 chez 93% des patients sans G-CSF) et une neutropénie fébrile. Le nadir a été observé le 9<sup>ème</sup> jour. Cependant, en

utilisant la prophylaxie primaire du G-CSF, le taux de neutropénie de grade 3/4 pourrait être réduit à 56% avec la doxorubicine et à 35% avec l'épirubicine (Sparano et al., 2000 ; Morales et al., 2004).

## 4. Propolis

Les abeilles ouvrières (*Apis mellifera L.*) récoltent une résine présente sur les bourgeons, les jeunes rameaux, les blessures de certains arbres et arbustes (Cardinault et al., 2012 ; Wagh, 2013). En mélangeant cette résine à la cire et aux enzymes sécrétées par leur système glandulaire, elles obtiennent une sorte de glu que l'on nomme : propolis (du grec pro : devant, à l'entrée et polis : cité ou ville) (Ghedira, 2009 ; Kędzia, 2009 ; Cardinault et al., 2012). Cette dernière désigne un groupe de substances résineuses, gommeuses et balsamiques de consistance visqueuse (Jean-Proste et Le Conte, 2005).

Elle a une couleur variable selon ses origines végétales allant du jaune clair au brun très foncé presque noir, en passant par toutes les gammes des bruns (brun jaune, brun vert et brun rouge) (Tosi et al., 2006).

Chez les abeilles, elle est prévue pour l'assemblage de ses ruches et comme barrière de protection contre les micro-organismes et les envahisseurs extérieurs (Wagh, 2013). Leur extrait éthanolique (EEP) est largement utilisé à des fins médicales, diététiques et cosmétiques en raison de ses activités biologiques et pharmacologiques (Kakoolaki et al., 2013; Zizic et al., 2013; Kurek-Górecka et al., 2014).

### 4.1. Composition chimique

La propolis est un produit bioactif qui possède une diversité de sources botaniques, compatible avec la flore native (Tartik, 2016). Il existe des différences significatives de composition entre les propolis, selon la région géographique de la ruche, les végétaux employés, les espèces d'abeilles et la disponibilité des végétaux nécessaires à l'élaboration de la propolis (Olczyk et al., 2007).

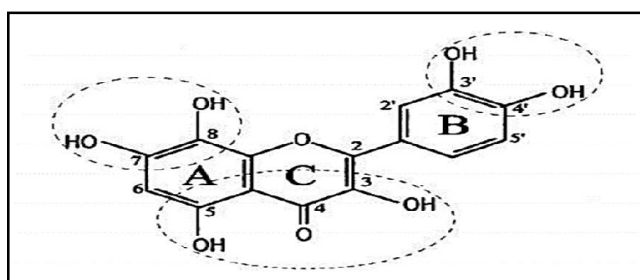
De manière générale, la propolis est constituée de 50 à 55 % de résines et baumes, de 30 % de cires et acides gras, de 10 % d'huiles essentielles, de 5 % de pollen et de 5 % de substances organiques et minérales (Viuda-Martos et al., 2008 ; Kędzia, 2009). Bien que plus de 300 composés ont été identifiés dans la propolis, y compris les différents flavonoïdes (flavones, flavanones, flavonols, dihydroflavonols et chalcones), les acides phénoliques, les acides caféïques et leurs esters, les

terpénoïdes, les stéroïdes, les acides aminés, les aldéhydes aromatiques et les alcools, les acides gras et les composés inorganiques (Kumazawa *et al.*, 2004 ; Akyol, 2013).

La propolis algérienne et plus particulièrement celle de la région de Jijel (Est de l'Algérie) est constituée majoritairement de trois classes de polyphénols : les flavonoïdes, les chalcones (dihydrochalcone) et les acides phénoliques. Les flavonoïdes les plus identifiés sont : pinostrobin chalcone, pinocembrine, galangine, naringénine, chrysin et tectochrysin (Lahouel *et al.*, 2010), et pour la première fois : pilosine, apigénine, pectolinarigénine et ladanéine (Segueni *et al.*, 2016). En outre les deux derniers composants sont identifiés pour la première fois dans la propolis (Segueni *et al.*, 2016).

#### 4.2. Activité antioxydante de la propolis

La richesse de la propolis en composés polyphénoliques et en flavonoïdes lui confère une puissante activité antioxydante (El-Naggar *et al.*, 2015), qui dépend de la structure aromatique de ces composés (Geckil *et al.*, 2005) :



**Figure 6 :** Structure de base des flavonoïdes (Amic *et al.*, 2003)

- Le groupe ortho-dihydroxy (catechol) au niveau du cycle B présente une capacité significative à "piéger" les radicaux libres (ROS et RNS) et assure une haute stabilité du radical phénoxye créé (Heim *et al.*, 2002 ; Ostrowska et Skrzydlewska, 2005 ; Gulcin, 2012).

- La double liaison entre le carbone C-2 et C-3 et la présence du groupe 4-oxo dans le cycle C facilitent la dislocation d'un électron dans le cycle B. Ce qui est à l'origine de leurs propriétés antioxydantes. Au cours de la réaction de ces composés avec les radicaux libres, les radicaux phénoxyes sont créés et stabilisés par l'effet de la résonance du cycle aromatique (Heim *et al.*, 2002; Ostrowska et Skrzydlewska, 2005 ; Gulcin, 2012).

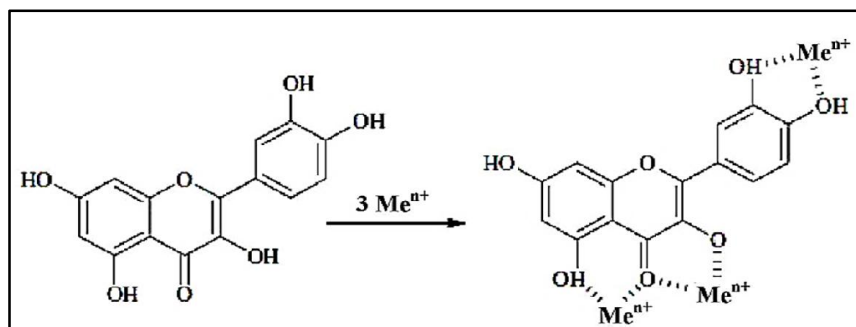


-Les groupes hydroxyle proches du carbone C-3 et C-5 en présence de groupes 4-oxo dans le cycle A et C génèrent le maximum des effets piègeurs des radicaux libres (Heim *et al.*, 2002; Ostrowska et Skrzydlewska, 2005 ; Gulcin, 2012).

Le mécanisme de l'activité antioxydante des polyphénols consiste à (Majewska et Cieczot, 2009) :

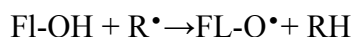
- Inhiber l'activité des enzymes qui participent à la création de formes réactives d'oxygène comme : la xanthine oxydase (Majewska et Cieczot, 2009), l'acide ascorbique oxydase, les cyclooxygénases, les lipoxygénases, la phosphodiesterase AMPc et les nitriques oxydes synthases (NOS) (Olszewska, 2003).

- Chélater efficacement les ions métalliques, principalement le fer et le cuivre, qui sont les principaux cofacteurs enzymatiques et qui jouent un rôle crucial dans le métabolisme de l'oxygène (Olszewska, 2003 ; Yao *et al.*, 2004). De ce fait, leur chélation permet d'inhiber plusieurs réactions enzymatiques (la réaction de Fenton), et donc d'empêcher la production des ROS (Gulcin, 2012).



**Figure 7** : Sites de liaison des ions métalliques sur les flavonoïdes (Gulcin, 2012).

- Piéger les formes hautement réactives d'oxygène (ROS), en raison de leur faible potentiel redox, par transfert d'un atome d'hydrogène (HAT) (Ostrowska et Skrzydlewska, 2005 ; Gulcin, 2012) :



Où :  $R^{\bullet}$  : l'anion superoxyde, le radical hydroxyle ou les radicaux lipidiques,  $Fl-OH$  : flavonoïdes et  $Fl-O^{\bullet}$  : radical phénoxyde.

- L'action synergique avec d'autres antioxydants : Les composés polyphénoliques ont une influence protectrice sur les antioxydants endogènes tels que l'acide ascorbique ou le tocophérol par chélation des métaux qui catalysent leurs réactions d'oxydation (Ostrowska et Skrzydlewska, 2005).

En outre, les flavonoïdes préviennent efficacement les réactions d'oxydation des lipides, dans lesquelles le cuivre, en tant que catalyseur, permet l'oxydation des lipoprotéines LDL (Olszewska, 2003 ; Gulcin, 2012). Ainsi qu'ils diminuent l'activité des enzymes participant à la peroxydation (la phospholipase A2) (Ostrowska et Skrzydlewska, 2005).

### **4.3. Toxicité**

La toxicité de la propolis est très faible. Chez le rat, la DL<sub>50</sub> d'un extrait concentré de propolis a été évaluée à 15 g/kg. Une saisine de l'Afssa (2007-SA-0231) rapporte que la dose la plus élevée sans effets indésirables (NAOEL) est de 1 400 mg/kg chez l'animal et qu'une supplémentation de 1,95 g/j pendant 30 jours n'a pas entraîné d'effets indésirables chez l'homme (Jasprica et *al.*, 2007). Cependant, il peut exister des cas d'allergies de contact (dermatose, eczéma) avec un allergène bien identifié : le 3,3-diméthylallyl caffeate (Gardana et Simonetti, 2011).

Notre travail est réalisé au niveau du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de Nature et de la Vie, Université de Jijel. Notre étude porte sur l'évaluation de l'effet hémato-protecteur de la propolis contre la toxicité induite par l'association Taxotère-Anthracyclines.

## 1. Étude phytochimique de la propolis

### 1.1. Préparation de l'extrait éthanolique de la propolis

Dans notre travail, nous avons utilisé la propolis de la région de Jijel à la dose de 25mg/kg sous forme hydroéthanolique. Ce dernier a été préparé par la dissolution de la poudre (de couleur jaune) dans l'éthanol absolu puis dilué dans l'eau distillée de façon que la concentration finale d'éthanol soit 1%.

### 1.2. Dosage des polyphénols totaux(TP)

L'estimation du taux des polyphénols totaux est effectuée selon la méthode décrite par Singleton et Rossi (1965) en utilisant le réactif de 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.

À 500  $\mu$ l de l'extrait dilué en 1/100<sup>ème</sup> ; 2.25 ml d'eau distillée et 250  $\mu$ l de réactif du Folin-Ciocalteu (5%) sont ajoutés. Après 5 min de repos ; 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5%) sont additionnés, puis le mélange est incubé pendant 60 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite la densité optique est lue à 760 nm en utilisant un spectrophotomètre (UV mini 1240, UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, SHIMADZU).

La teneur en composés phénoliques dans les extraits est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (12.5 - 200  $\mu$ g/ml). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de propolis. Toutes les mesures sont répétées 3 fois (Voir annexe 1).

### 1.3. Dosage des flavonoïdes totaux(TF)

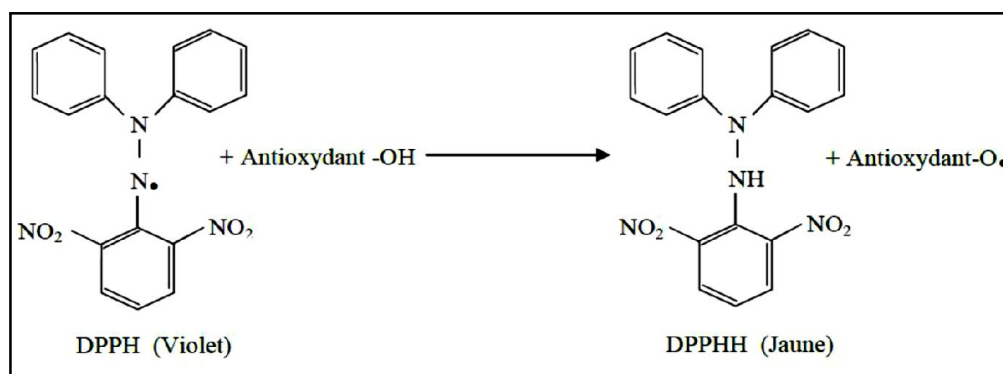
Le dosage des flavonoïdes totaux est réalisé selon la méthode de Dewanto et *al.* (2002). Brièvement, 250  $\mu$ l de l'extrait dilué en 1/1000<sup>ème</sup> sont mélangé avec 75  $\mu$ l de NaNO<sub>2</sub> (5%). Après

un repos de 6 min, 150  $\mu\text{l}$  d' $\text{AlCl}_3$  (2%) et 500  $\mu\text{l}$  de NaOH (1M) sont ajoutés, le volume est complété par 2.5 ml d'eau distillée, ensuite la DO est lu 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 quercétine (12.5 - 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Tous les dosages sont réalisés 3 fois (Voir annexe 2).

#### 1.4. Etude des propriétés anti-radicalaires par le test au DPPH° (2,2-Diphenyl picrylhydrazyl)

La capacité de piégeage des radicaux libres de l'extrait éthanolique est déterminée en utilisant la méthode au DPPH°, comme elle est décrite par Brand et *al.* (1995). Le principe est basé sur la capacité de l'extrait à réduire le radical DPPH° en 2,2-diphényl picrylhydrazine (DPPHH). Cette réduction change la couleur du DPPH° du violet vers le jaune pâle quand il réagit avec un antioxydant, ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction de temps. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire de l'extrait.



**Figure 8 :** Réduction du DPPH° par un antioxydant (Talbi et *al.*, 2015).

Brièvement, à 15  $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations ( $10^{-6}$ - $10^{-1}$ mg/ml) 1.5 ml de la solution éthanolique de DPPH (100  $\mu\text{M}$ ) est ajouté. Après agitation, le mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance est effectuée chaque 30 secondes pendant 5 min à 515 nm contre un blanc (éthanol).

L'activité antioxydante de l'extrait est comparée avec l'activité de la vitamine C. leur activité a été déterminée par la même façon que l'extrait. L'effet anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres est exprimé en pourcentage selon la relation suivante :

$$\text{I\% inhibition} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

Dont :

$A_C$  : Absorbance du contrôle négatif.

$A_E$  : Absorbance de l'échantillon.

## 2. Étude *in vivo*

### 2.1. Entretien des animaux

Pendant notre étude expérimentale (mois de Mars 2017), nous avons utilisés 16 rats mâles *Wistar Albinos* ayant un poids variant entre 160 et 200g, qui proviennent de l'institut pasteur d'Alger.

L'élevage de ces animaux s'est déroulé au niveau de l'animalerie du département de Biologie. Dès leur arrivée, les rats sont mis en quarantaine pendant 15 jours. Ils sont hébergés dans des cages spécialisées et maintenus dans les conditions favorables d'élevage et disposés d'eau et de nourriture standard, la litière est renouvelée deux fois par semaine.

Les rats mâles ont été abrités dans les conditions climatiques suivantes : Température et humidité ambiantes (printemps) et une photopériode naturelle.

### 2.2. Traitement des animaux

Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé deux types importants de médicaments anticancéreux : le Taxotère à une dose thérapeutique de 75 mg/m<sup>2</sup> (Sanofi Aventis, 2016) au même temps avec l'Épirubicine à une dose thérapeutique de 200 mg/m<sup>2</sup>.

L'extrait éthanolique de la propolis, le Taxotère et l'Épirubicine sont administrés aux rats selon le protocole suivant :

- ✓ **Groupe 1 (témoin= 04 rats) :** les rats recevant 1ml d'eau physiologique (NaCl 9‰) par *voie orale* pendant 5 jours (avant le j<sub>0</sub>; le jour d'administration des médicaments anticancéreux).
- ✓ **Groupe 2 (traités = 06 rats) :** les rats recevant le taxotère (75 mg/m<sup>2</sup>) avec l'épirubicine (200 mg/m<sup>2</sup>) par *voie intraveineuse* à j<sub>0</sub>.
- ✓ **Groupe 3 (prétraités = 06 rats) :** les rats recevant la propolis (25 mg/kg) par *voie orale* pendant 5 jours avant le j<sub>0</sub> où ils ont reçu le même traitement chimiothérapeutique précédent.

### 2.3. Prélèvements sanguins et préparation des échantillons

Le prélèvement du sang de chaque rat est effectué à l'aide d'un tube capillaire d'hématocrite à partir d'une ponction au niveau du sinus retro-orbitale de l'œil. Le sang est récupéré dans des tubes contenant l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) et agité immédiatement pour éviter la coagulation.

Une partie est conservée à 4°C pour le dosage des paramètres hématologiques et l'autre partie est centrifugée à 3000 tours par minutes pendant dix minutes afin de récupérer le culot qui est lysés avec 3 volumes d'eau distillée glacée, puis incubé pendant 15 min au réfrigérateur (2-8°C). Ensuite, il est centrifugé à 4000 tours par minutes pendant dix minutes pour éliminer les débris cellulaires et obtenir le lysat ou l'homogénat érythrocytaire et le conserver à -20°C. Ce dernier va être utilisé pour le dosage des marqueurs érythrocytaires du statut oxydant/ antioxydant. Les prélèvements sanguins sont effectués chaque semaine selon l'ordre suivant : J<sub>3</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub>.

### 2.4. Méthodes de dosage des paramètres hématologiques (FNS)

La réalisation de la numération sanguine des rats est effectuée après chaque prélèvement du sang au niveau de l'hôpital de Jijel. L'hémogramme est réalisé à l'aide d'un Coulter électronique (BECKMAN COULTER, Coulter A<sup>C</sup>T).

La réalisation des frottis sanguins permet l'étude précise de la morphologie cellulaire ainsi que la caractérisation des différents types de cellules. Chaque frottis est effectué par étalement d'une goutte de sang sur une lame propre et dégraissée. Il est ensuite rapidement séché à l'air pendant au moins une demi-heure. Après le séchage, le frottis est coloré par la coloration de May Grünwald Giemsa. Le frottis est examiné au microscope optique (OPTICA Axiom 2000) à l'aide de l'objectif à immersion (Objectif X 100).

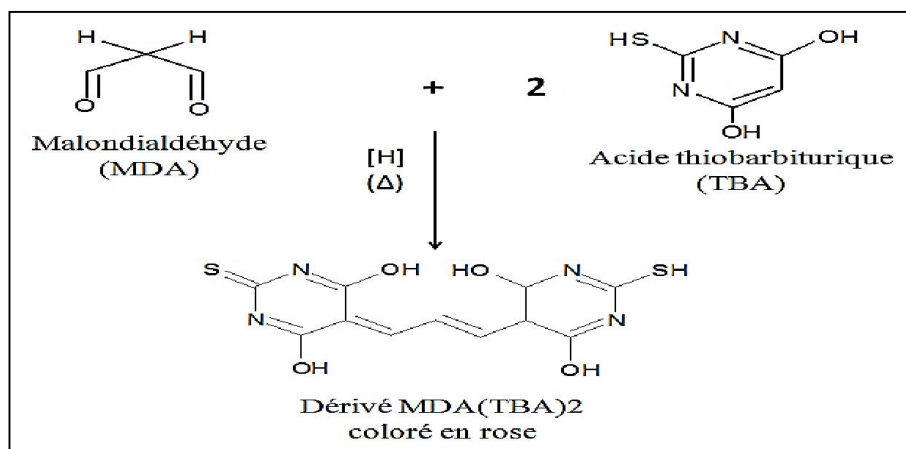
### 2.5. Détermination des marqueurs érythrocytaires du statu oxydant / antioxydant

#### 2.5.1. Dosage de malondialdéhyde (MDA) érythrocytaire

Le malondialdéhyde (MDA) érythrocytaire représente le marqueur le plus utilisé pour évaluer la peroxydation lipidique, notamment par la simplicité et la sensibilité de la méthode de dosage.

Le dosage de MDA érythrocytaire est effectué selon la méthode d'Ohkawa et *al.* (1979). Le principe de cette méthode (figure 9) est basé sur la réaction de malondialdéhyde (MDA) avec deux molécules de l'acide thiobarbiturique (TBA) à chaud pour donner un produit chromogène/

fluorescent de couleur rose absorbant à 532 nm et extractible par les solvants organiques comme le n-butanol.



**Figure 9 :** Principe de dosage de MDA (Ohkawa *et al.*, 1979).

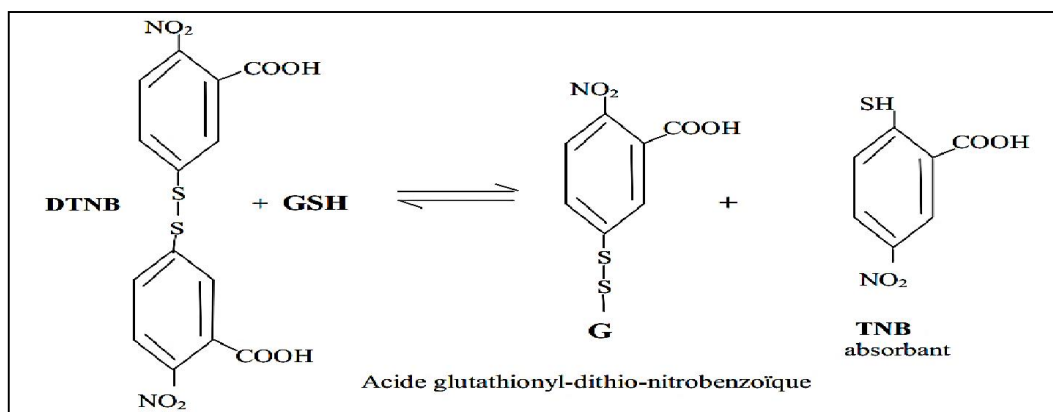
Pour cela, nous avons additionné à 0.5 ml de l'homogénat 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67%. Ce mélange est chauffé à 100°C pendant 15 min, puis refroidis et additionné de 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, l'absorbance est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 532 nm contre un blanc.

Les concentrations du MDA sont déduites à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant le tétraéthoxypropane (son hydrolyse donne le MDA) et les résultats sont exprimés en nmol/ml (Voir annexe 3)

### 2.5.2. Dosage de GSH érythrocytaire

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine) qui joue un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Lushchak, 2011). Il agit comme un antioxydant non enzymatique, soit directement en interagissant avec les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS) et les électrophiles ou en agissant comme un cofacteur de plusieurs enzymes (Lushchak, 2011).

Le dosage du glutathion réduit (GSH) érythrocytaire est réalisé par la méthode colorimétrique en utilisant le réactif d'Ellman (DTNB) (Ellman, 1959). La réaction (figure 10) consiste à couper la molécule d'acide 5,5-dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction suivante :



**Figure 10 :** Principe de dosage de GSH (Ellman, 1959)

Le thionitrobenzoïque (TNB) à pH alcalin (8-9) présente une absorbance à 412 nm avec un coefficient d'extinction égal à  $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

La procédure expérimentale du dosage du GSH nécessite une déprotéinisation de l'homogénat par un acide afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

Brièvement, à 800  $\mu\text{l}$  d'homogénat érythrocytaire sont ajoutés 200  $\mu\text{l}$  de l'acide salicylique SA (0.25%). Mélanger avec l'agitateur et laisser 15 minutes dans le réfrigérateur puis centrifuger à 1000 trs/min pendant 5 min. Ensuite, 500  $\mu\text{l}$  de surnageant sont mélangés avec 1000  $\mu\text{l}$  de tampon tris (tris 0.4 M, NaCl 0.02 M, pH=8.9) et 25  $\mu\text{l}$  de DTNB (0,01 M dissous dans le méthanol absolu 99%). Après 5 min d'incubation à température ambiante pour la stabilisation de la couleur, la réaction colorimétrique se développe instantanément et la lecture de l'absorbance s'effectue à  $\lambda = 412 \text{ nm}$  contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le SA (0.25%).

La concentration du GSH est exprimée en  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de protéines et calculée selon la formule suivante :

$$[\text{GSH}] (\mu\text{M GSH}/\text{mg protéines}) = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1.525}{13.6 \times 0.8 \times 0.5 \times \text{mg protéines}}$$

Où :

- ✓ **DO :** Densité optique (Absorbance).
- ✓ **1 :** Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8 ml homogénat + 0.2 ml d'acide salicylique) (ml).



- ✓ **1.525** : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant + 1ml Tris + 0.025 ml DTNB) (ml).
- ✓ **13.6** : Coefficient d'absorption des groupes SH à 412 nm.
- ✓ **0.8** : Volume de de l'homogénat trouvé dans 1ml (ml).
- ✓ **0.5** : Volume de surnageant trouvé dans 1.525 ml (ml).

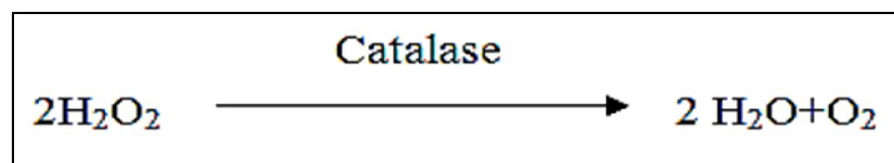
La teneur en protéines est évaluée par la méthode de Bradford (1976). Cette méthode est basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu de coomassie qui se lie avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présent dans les protéines. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant la concentration en protéines dans l'échantillon.

Le lysat érythrocytaire est au préalable dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans l'eau distillée. Cinquante (50)  $\mu$ l d'échantillons dilués sont ensuite ajoutés à 2 ml du réactif de Bradford (BBC). Après agitation la réaction se poursuit à T°C ambiante pendant 5 min puis l'absorbance est lue à 595 nm.

Les résultats sont déterminés à partir d'une droite d'étalonnage de protéines standard obtenue avec l'albumine sérique bovine (BSA) (Voir annexe 4).

### 2.5.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase érythrocytaire

La catalase (CAT) est un antioxydant enzymatique largement distribué dans tous les cellules, notamment les érythrocytes (Rupeshkumar et *al.*, 2012). Elle est capable d'éliminer le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) par une transformation en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène ( $O_2$ ) :



L'affinité de la catalase pour l' $H_2O_2$  est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues (Buldak et *al.*, 2014). L'évaluation de l'activité enzymatique de la catalase érythrocytaire est effectuée selon la méthode de Claiborne (1985). Le principe repose sur la disparition de l' $H_2O_2$  à 25°C en présence de la catalase.

Pour cela, dans la cuve de mesure, nous avons introduit 1 ml de tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1M,  $\text{pH}=7.2$ ), 0.95 ml de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) fraîchement préparé (0.019 M) et 0.025 ml de l'homogénat érythrocytaire. La lecture de l'absorbance se fait chaque minute pendant deux minutes à une longueur d'onde  $\lambda = 240 \text{ nm}$ . L'activité enzymatique est exprimée en UI/mg de protéines selon la relation suivante :

$$\text{UI/mg} = (2,303 / T \times \log A1 / A2) / \text{mg de protéines}$$

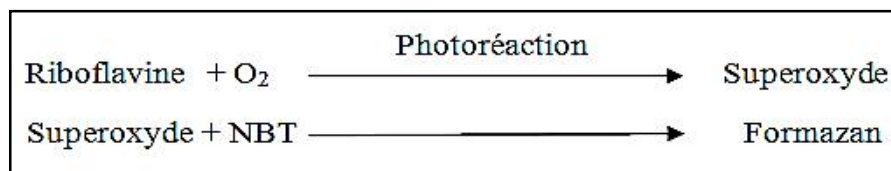
Sachant que :

- ✓ **2,303** : Constante de vitesse de la réaction.
- ✓ **A1** : Absorbance à la première minute.
- ✓ **A2** : Absorbance à la deuxième minute.
- ✓ **T** : Intervalle de temps en minute.

#### 2.5.4. Mesure de l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire

Le superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme antioxydante ubiquitaire appartenant à une famille de métalloenzymes, qui représente une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Elle catalyse la dismutation des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène moléculaire (Haleng *et al.*, 2007; Sánchez-Venegas *et al.*, 2009; Buldak *et al.*, 2014).

L'évaluation de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD) est effectuée selon la méthode de Friedrich et Beauchamp (1971). Cette méthode consiste à déterminer la capacité de la SOD à inhiber la réduction de nitrobluetetrazolium (NBT) par l'anion superoxyde. L'anion superoxyde est produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron (méthionine) selon la réaction suivante :



Pour cela : 2 ml du milieu réactif (Cyanide de Sodium  $10^{-2}\text{M}$ , solution de NBT  $1.76 \times 10^{-4}\text{M}$ , EDTA  $66 \times 10^{-3}\text{M}$ , Methionine  $10^{-2}\text{M}$ , Riboflavine  $2 \times 10^{-6}\text{M}$  et à  $\text{pH} = 7.8$ ) sont additionnés à  $5\mu\text{L}$  de l'homogénat érythrocytaire. Ensuite ce mélange est irradié pendant 10 min par une lampe de 15 Watt. La réduction de NBT par les anions superoxydes en formazan est suivie par le

spectrophotomètre à 560 nm. L'activité de la SOD est exprimée en U.ml<sup>-1</sup> de sang au niveau des érythrocytes, de tel :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A \text{ de control} - A \text{ de l'essai}) / A \text{ de control}] \times 100$$

$$\text{SOD UI/ml} = \% \text{ d'inhibition} \times 6.35$$

### 3. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes et d'écart-types. L'évaluation statistique est effectuée par le logiciel "Excel" en utilisant le test « t » de Student. La valeur trouvée par le calcul du « t » peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur  $p$  tel que :

- $p > 0.05$  : la différence n'est pas significative (ns).
- $p < 0.05$  : la différence est significative (\*) ou (#).
- $p < 0.01$  : la différence est hautement significative (\*\*) ou (##).
- $p < 0.001$  : la différence est très hautement significative (\*\*\*) ou (###).

**Comparaison avec le contrôle : non significatif  $p > 0.05$  (ns), significatif  $p < 0.05$  (\*), hautement significatif  $p < 0.01$  (\*\*) et très hautement significatif  $p < 0.001$  (\*\*\*) .**

**Comparaison avec le groupe traité par la chimiothérapie (TE) : non significatif  $p > 0.05$  (ns), significatif  $p < 0.05$  (#), hautement significatif  $p < 0.01$  (##) et très hautement significatif  $p < 0.001$  (###) .**



## 1. Nature phytochimique

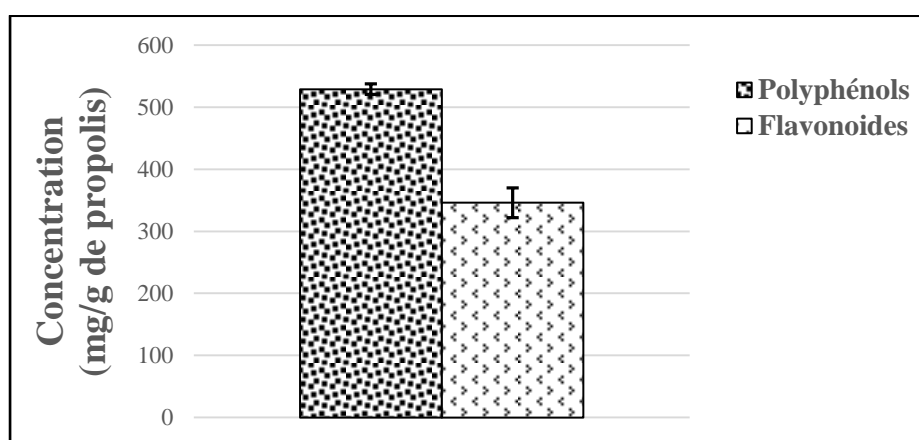
Les résultats de l'étude phytochimique et de l'activité anti-radicalaire sont représentés ci-dessous.

### 1.1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes

La quantité des composés phénoliques et des flavonoïdes dans l'extrait éthanolique de la propolis de la région de Jijel, exprimée en mg équivalent acide gallique/g de propolis (mg EAG/g) et en mg équivalent quercétine/g de propolis (mg EQ/g propolis) respectivement, est illustrée dans le tableau 1 et la figure 11.

**Tableau 1** : Évaluation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait de la propolis Algérienne (Jijel).

	<b>Polyphénols</b> <b>(mg EAG/g de propolis)</b>	<b>Flavonoïdes</b> <b>(mg EQ/g de propolis)</b>
<b>EEP</b>	528.75 ± 8.55	345.96 ± 23.84



**Figure 11** : Évaluation quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait de la propolis Algérienne (Jijel).

D'après ces résultats, on constate que l'extrait éthanolique de la propolis de Jijel contient des concentrations élevées en polyphénols et en flavonoïdes (528.75 ± 8.55 mg EAG/g de propolis et 345.96 ± 23.84 mg EQ/g de propolis respectivement). De ce fait, cette propolis semble être riche en flavonoïdes, qui sont considérés comme étant la classe la plus abondante des polyphénols (environ 65%).

Comparant nos résultats, on constate que le taux des polyphénols enregistré dans notre étude est plus élevé que celui obtenu par Bazmandegan *et al.* (2016). La teneur en polyphénols totaux de la propolis Egyptienne est de l'ordre de 88,17 mg EAG/g d'extrait (Alm-Eldeen *et al.*, 2017). L'étude réalisée sur la propolis de l'Espagne indique des résultats plus bas que les résultats obtenus dans notre étude, ces teneurs en composés phénoliques oscillent entre 21,118 et 22,762 mg EAG/100 g de propolis (Osés *et al.*, 2016).

En ce qui concerne les flavonoïdes, nous avons constaté que notre échantillon renferme une quantité plus élevée en flavonoïdes que celle obtenue par Turan *et al.* (2015) dans la propolis Turquie ( $42,1 \pm 0,8$  mg EQ/g de la propolis). En outre, la teneur en flavonoïdes totaux de 20 échantillons de la propolis Coréenne trouvée par Wang *et al.* (2016) varient entre 21 et 50 mg/g, ces valeurs sont plus bas que la valeur de notre étude.

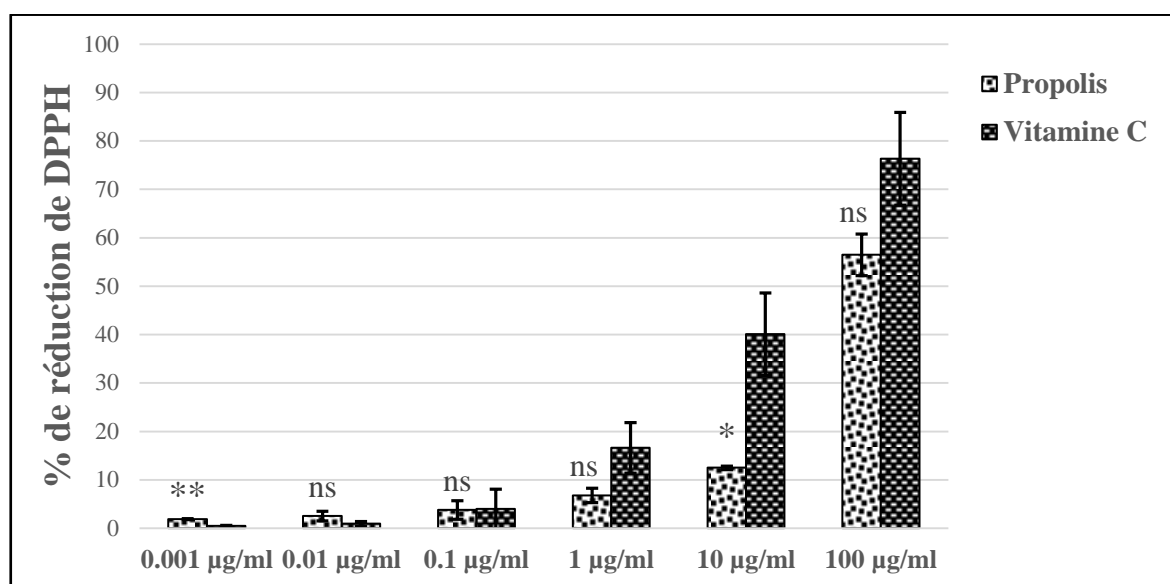
D'autre part, Boufadi et ses collaborateurs (2014) ont signalé que les taux en polyphénols et en flavonoïdes totaux de la propolis Algérienne varient de 55 à 279 mg/g et de 10 à 69 mg/g respectivement. Cette variation observée dans les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dépend essentiellement des caractéristiques phytogéographiques du site de collecte, c'est-à-dire, l'origine de la propolis, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique et les conditions de conservation.

### 1.2. Effet anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis vis-à-vis le radical DPPH°

Le tableau 2 et la figure 12 montrent les variations de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis et de l'acide ascorbique (vitamine C) à différentes concentrations contre le DPPH°.

**Tableau 2 :** Evaluation de l'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis à différentes concentrations contre le DPPH° en %.

	0.001 µg/ml	0.01 µg/ml	0.1 µg/ml	1 µg/ml
<b>Acide ascorbique</b>	0.47 ± 0.12	0.9 ± 0.48	4 ± 4.08	16.61 ± 5.23
<b>Propolis</b>	1.88 ± 0.12**	2.5 ± 0.98 ns	3.8 ± 1.92 ns	6.76 ± 1.5 ns
	10 µg/ml	100 µg/ml	IC <sub>50</sub> µg/ml	
<b>Acide ascorbique</b>	40.06 ± 8.51	76.33 ± 9.59	47.79 ± 0.06	
<b>Propolis</b>	12.47 ± 0.39*	56.48 ± 4.29 ns	45.62 ± 0.47*	



**Figure 12 :** Evaluation de l'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis à différentes concentrations contre le DPPH°.

Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis et de la vitamine C a été évalué en se basant sur le pourcentage de réduction du radical libre DPPH°. On a constaté que la capacité de piégeage de l'extrait éthanolique de propolis et de la vitamine C vis-à-vis le radical DPPH° est concentration dépendante. À faible concentration (0.001- 0.01 µg/ml) la propolis a montré un effet scavenger mieux que celui obtenu avec la vitamine C. Cependant, à 100 µg/ml, elle réduit le DPPH° avec seulement  $56.48 \pm 4.29$  % contre  $76.33 \pm 9.59$  % observé avec la Vitamine C.

L'IC<sub>50</sub> obtenu pour l'extrait de la propolis est meilleur que celle de la molécule référence. De ce fait, la propolis de Jijel possède le pouvoir anti-radicalaire le plus puissant ( $p < 0.05$ ) avec une IC<sub>50</sub> égale à  $45.62 \pm 0.47$ . Cette dernière est en accord avec les résultats obtenus par Boufadi et *al.* (2014), leurs résultats sont compris entre 19.4 et 50 µg/ml.

Nos résultats indiquent que la propolis Algérienne, et plus spécifiquement celle de la région de Jijel, mérite d'autres études comme étant un antioxydant potentiel, bien que l'activité de l'extrait éthanolique de cette propolis est plus bas que celle de la vitamine C.

Une étude a révélée qu'il y a une corrélation significative ( $p < 0.01$ ) entre la teneur en polyphénols et l'activité réductrice des échantillons analysés de la propolis algérienne (Bejaia et Oued Ghir). Cela montre que les composés phénoliques, essentiellement les flavonoïdes, sont les molécules responsables de l'activité antiradicalaire. Le degré d'hydroxylation et de méthylation du composé phénolique et la présence d'autres composés non phénoliques tels que les enzymes (glucose oxydase

et catalase) et les matériaux non enzymatiques (vitamines et acides aminés) peuvent être impliqués dans cette activité (Mouhoubi-Tafinine et al., 2016).

Dans notre étude, l'échantillon possède une teneur élevée en polyphénols, ce qui leur confère un effet scavenger très puissant. Ainsi, l'étude effectuée par Kebsa et al. (2014) renforce nos résultats ; la propolis de Jijel présente un effet scavenger très puissant suite à la capacité des flavonoïdes ainsi que d'autres polyphénols qu'elle contient à piéger et à neutraliser les radicaux libres.

## 2. Étude *in vivo*

Le but de cette étude est d'analyser la possibilité d'utiliser la propolis comme complément de la thérapie anticancéreuse standard. Une autre partie de notre hypothèse proposée est que l'utilisation de la propolis en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques standard tel que l'association Taxotère-Anthracycline (épirubicine) peut réduire leur toxicité hématologique.

### 2.1. Sémiologie des animaux

La chimiothérapie combinée (Taxotère à 75 mg/m<sup>2</sup> avec l'Épirubicine à 200 mg/m<sup>2</sup>) provoque, dès les 48 premières heures, une asthénie importante chez les rats traités, leur activité est diminuée et ils perdent presque 18% de leur poids de façon significative par rapport au groupe 1 (témoin) à la fin de l'étude (21<sup>ème</sup> jour), comme le montre le tableau 3. En revanche, l'administration de la propolis à la dose de 25 mg/kg chez le 3<sup>ème</sup> groupe a protégé les rats contre ces effets secondaires. Concernant les rats du groupe 1, ils ne subissent aucun changement, sauf la prise du poids (de 160 g au début de l'étude jusqu'à 188 g à la fin de l'étude).

**Tableau 3 :** Variation de poids corporel (PC) chez les trois groupes de rats au 21<sup>ème</sup> jour.

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
PC (g)	188 ± 22.13	155.25 ± 14.1*	187.25 ± 28.53 <sup>#</sup>

En outre, des éruptions cutanées ont été observées chez les rats recevant les anticancéreux, ainsi qu'un œdème au niveau de la base de la queue (lieu de l'injection) (Voir annexe 5).

L'analyse de la survie des animaux tout au long de l'étude (21 jours) a montré qu'une seule mortalité (1/6) est observée entre le 15<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour dans le groupe recevant les médicaments



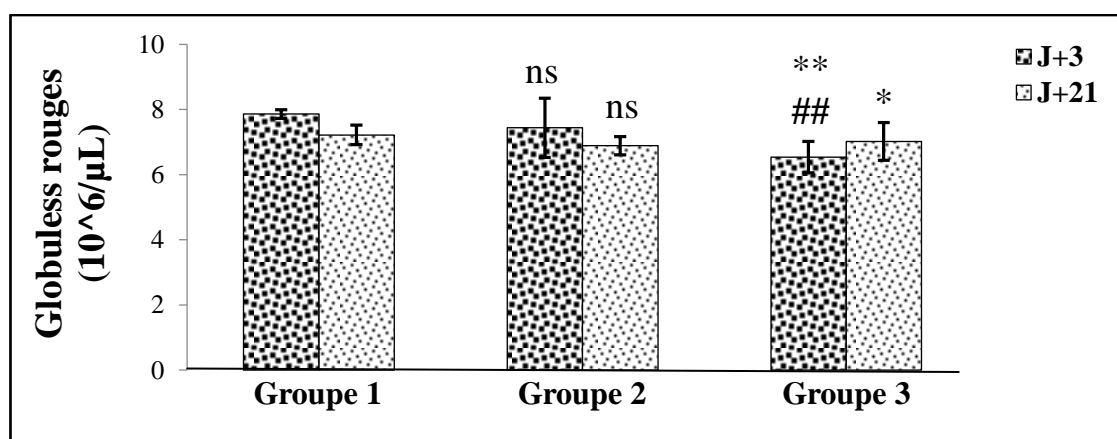
anticancéreux seuls. En revanche, aucune mortalité n'a été enregistrée dans le groupe recevant la propolis à la dose de 25 mg/kg pendant 5 jours avant l'administration des mêmes médicaments.

## 2.2. Variation des paramètres hématologiques (FNS) chez les rats traités et les rats prétraités

Administrés séparément aux rats et aux doses thérapeutiques humaines, le Taxotère (75 mg/m<sup>2</sup>) et l'Épirubicine (200 mg/m<sup>2</sup>) provoquent des perturbations assez profondes dans les formules sanguines. Ces perturbations sont caractérisées par une aplasie médullaire.

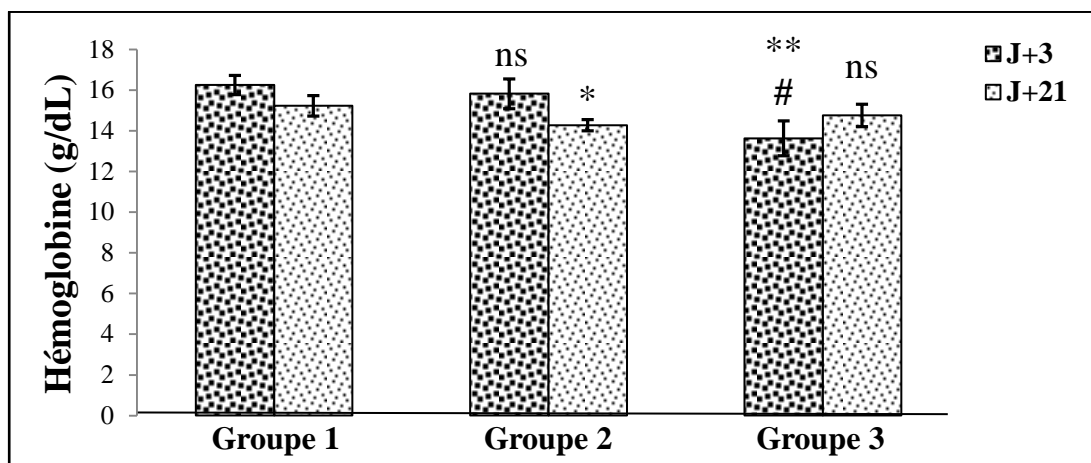
En effet, cette chimiothérapie combinée entraîne une diminution modérée du taux des globules rouges, d'hémoglobine et d'hématocrite chez le groupe 2. Tandis qu'elle n'entraîne aucune modification significative du taux du VGM du CCMH et du TCMH par rapport au groupe 1 (témoin).

Des constatations renforcées par les variations du taux des érythrocytes au cours du traitement, données par la figure 13, au cours desquelles nous observons que la chimiothérapie seule induit une diminution non significative du nombre absolu d'érythrocytes le 3<sup>ème</sup> jour du traitement ( $p > 0.05$ ). Misiti *et al.* (2003) confirment ce résultat par une étude qui démontre clairement que non seulement la doxorubicine, mais aussi ses métabolites principaux, à savoir le doxorubicinol et les dérivés aglycones, affectent considérablement le métabolisme des globules rouges. De ce fait, le Taxotère aussi avec ses métabolites peuvent affecter le métabolisme des érythrocytes.

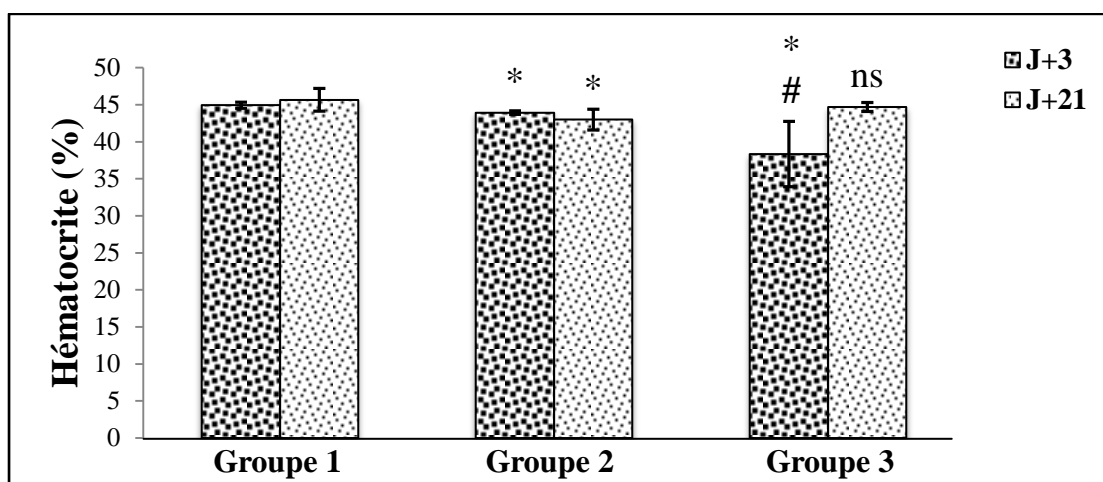


**Figure 13 :** Variation du nombre des globules rouges (10<sup>6</sup>/μl) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et Epi 200 mg/m<sup>2</sup> seul ou associés à une dose 25 mg/kg de la propolis.

Après 3 jours de l'administration des anticancéreux, nous avons remarqué une diminution non significative d'hémoglobine ( $15.83 \pm 0.73$  g/dl contre  $16.26 \pm 0.47$  g/dl chez le groupe 1 "témoin") avec une légère diminution significative de l'hématocrite ( $p < 0.05$ ).



**Figure 14 :** Variation du taux de l'hémoglobine (g/dl) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax  $75 \text{ mg/m}^2$  et Epi  $200 \text{ mg/m}^2$  seul ou associés à une dose de  $25 \text{ mg/kg}$  de la propolis.



**Figure 15 :** Variation du pourcentage de l'hématocrite (%) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax  $75 \text{ mg/m}^2$  et Epi  $200 \text{ mg/m}^2$  seul ou associés à une dose de  $25 \text{ mg/kg}$  de la propolis.

Concernant les constantes érythrocytaires (VGM, CCMH et TCMH), il n'y a pas un changement assez prononcé entre le groupe 2 "traité par les médicaments anticancéreux seuls" et le groupe 1 "témoin", que ce soit au 3<sup>ème</sup> ou au 21<sup>ème</sup> jour, seulement des variations très légères, de l'ordre de 1%.

**Tableau 4 :** Variations du VGM en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et Epi 200 mg/m<sup>2</sup> seule ou associée à doses 25 mg/kg de la propolis.

	<b>Groupe 1</b>	<b>Groupe 2</b>	<b>Groupe 3</b>
<b>J+3</b>	56.85 ± 0.47	56.1 ± 0.46 *	55.73 ± 1.01 *
<b>J+21</b>	60.15±3.09	60.88 ± 4.76 ns	60.93 ± 6.86 ns

**Tableau 5 :** Variations du CCMH en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et Epi 200 mg/m<sup>2</sup> seule ou associée à doses 25 mg/kg de la propolis.

	<b>Groupe 1</b>	<b>Groupe 2</b>	<b>Groupe 3</b>
<b>J+3</b>	36.23 ± 0.73	36.43 ± 0.53 ns	35.88 ± 0.29 #
<b>J+21</b>	33.35 ± 0.05	34.18 ± 1.34 ns	34.58 ± 1.47 ns

**Tableau 6 :** Variations du TCMH en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et Epi 200 mg/m<sup>2</sup> seule ou associée à doses 25 mg/kg de la propolis.

	<b>Groupe 1</b>	<b>Groupe 2</b>	<b>Groupe 3</b>
<b>J+3</b>	20.58 ± 0.55	20.45 ± 0.17 ns	20 ± 0.29 #
<b>J+21</b>	20.08 ± 1.01	20.78 ± 0.9 *	20.98 ± 1.64 * #

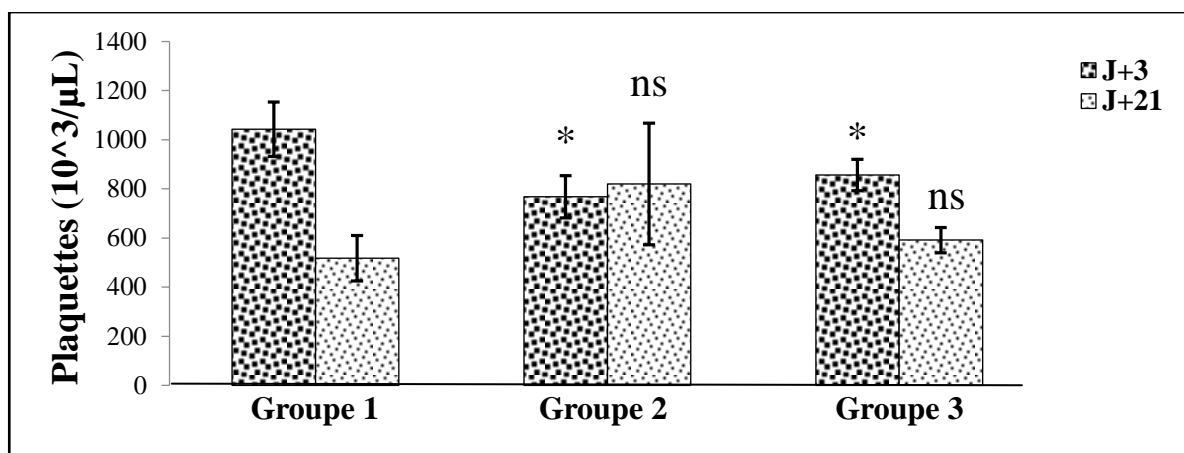
Après 21 jours de traitement, la même observation a été remarquée sur le taux des globules rouges que celle du 3<sup>ème</sup> jour, où il y a une réduction non significative ( $6.89 \pm 0.28 \times 10^6/\mu\text{l}$  contre  $7.22 \pm 0.3 \times 10^6/\mu\text{l}$  chez le groupe 1 "témoin"). Ces résultats sont confirmés par l'analyse microscopique des frottis sanguins où nous avons constaté une poikilocytose avec une anisocytose et une anisochromie chez les rats recevant la chimiothérapie seule, par contre les hématies des rats témoins sont normochromes et normocytaires à contour régulier (Voir annexe 6).

De même, l'analyse de l'action de l'association Taxotère-Épirubicine sur les valeurs d'hémoglobine et d'hématocrite montre une diminution légère de façon significative au 21<sup>ème</sup> jour (Figures 14 et 15).

En revanche, l'administration de 25 mg/kg de la propolis n'a aucun effet protecteur sur le taux des érythrocytes, d'hémoglobine, d'hématocrite et des constantes érythrocytaires au 3<sup>ème</sup> jour. Ce résultats est similaire à celui observé par Orsolich *et al.* (2010). En effet, il y a une réduction hautement significative ( $p < 0.01$ ) du taux des hématies et d'hémoglobine avec une diminution significative ( $p < 0.05$ ) d'hématocrite, de VGM, de CCMH et de TCMH.

La chute du taux des globules rouges avec ses paramètres a été suivie d'un effet rebond au 21<sup>ème</sup> jour, où il y a une normalisation dans la formule érythrocytaire.

D'autre part, la thrombopénie apparaisse d'une façon plus exprimée que l'anémie, juste après 72 heures de l'administration de la chimiothérapie, le taux des plaquettes (figure 13) est diminué de façon significative ( $767.66 \pm 86.21 \times 10^3/\mu\text{l}$  contre  $1042.33 \pm 110.81 \times 10^3/\mu\text{l}$  chez le groupe 1 "témoin").



**Figure 16 :** Variation du nombre des plaquettes ( $10^3/\mu\text{l}$ ) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et Epi 200 mg/m<sup>2</sup> seul ou associés à une dose 25 mg/kg de la propolis.

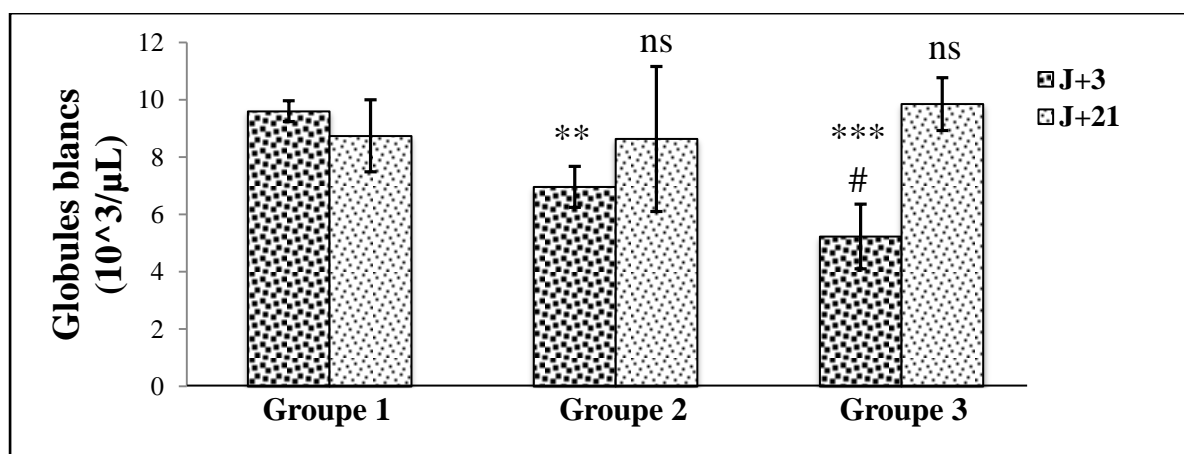
La chute des taux de thrombocytes a été suivie d'un effet rebond au 21<sup>ème</sup> jour où les valeurs augmentent de façon non significative ( $820 \pm 247.58 \times 10^3/\mu\text{l}$  contre  $517.66 \pm 92.04 \times 10^3/\mu\text{l}$  chez le groupe 1 "témoin") traduisant leur production massive à partir de mégacaryocytoses suite à l'activation des cellules souches totipotentes ou unipotentes de la moelle osseuse. Les mêmes observations ont été relevées dans d'autres études (Ray *et al.*, 2000).

Cependant, l'administration préalable d'extraits éthanolique de la propolis a permis de prévenir la survenue d'une thrombopénie précoce constatée chez les rats traités par les médicaments anticancéreux testés (Taxotère et Épirubicine). En effet, après 72 h de l'injection des anticancéreux

nous avons enregistré chez les rats recevant la propolis une réduction du taux des plaquettes moins que celle observée chez les rats traités par rapport au groupe1 "témoin", comme le montre la figure 16 ( $856.33 \pm 64.26 \times 10^3/\mu\text{l}$  contre  $1042.33 \pm 110.81 \times 10^3/\mu\text{l}$  chez le groupe1). Par la suite, nous avons constaté une normalisation dans le taux des plaquettes par rapport au groupe1 ( $591.66 \pm 51.4 \times 10^3/\mu\text{l}$  contre  $517.66 \pm 92.04 \times 10^3/\mu\text{l}$  chez le groupe1).

Parallèlement à l'anémie et à la thrombopénie, une leucopénie précoce est enregistrée dès le début du traitement par l'association Taxotère-Épirubicine. Elle concerne aussi bien les granulocytes que les lymphocytes et les monocytes (figures 17, 18, 19, 20).

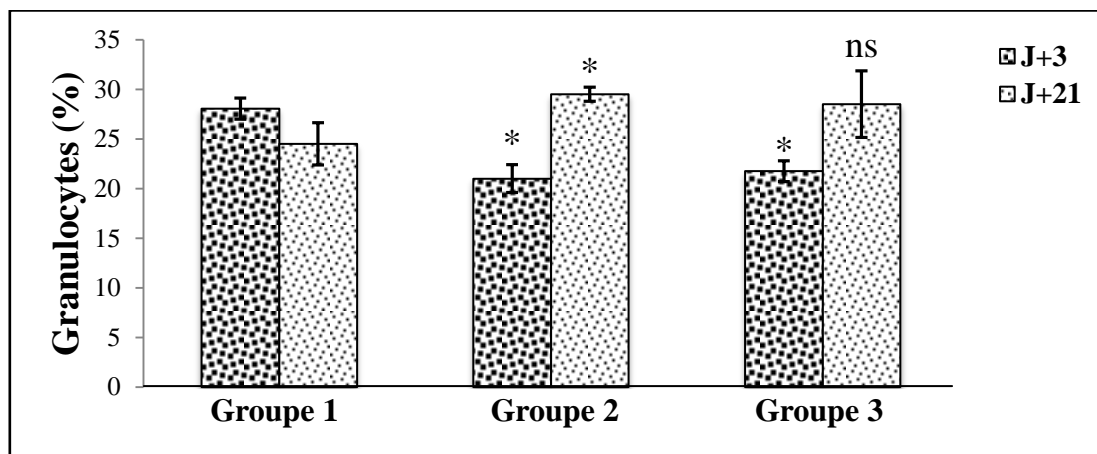
On assiste à une baisse hautement significative ( $p < 0.01$ ) du nombre des leucocytes et du taux des lymphocytes ( $6.96 \pm 0.72 \times 10^3/\mu\text{l}$  contre  $9.6 \pm 0.36 \times 10^3/\mu\text{l}$  chez le groupe1 et  $65.53 \pm 0.83 \%$  contre  $73.1 \pm 4.24 \%$  chez le groupe1 respectivement), avec une réduction significative du taux des granulocytes (neutrophiles) et des monocytes qui passe de  $21 \pm 1.41\%$  contre  $28.05 \pm 1.06 \%$  chez le groupe1 et de  $6.93 \pm 3.31\%$  contre  $14.23 \pm 2.92\%$  chez le groupe1 respectivement. Ceci traduit l'action toxique du médicament anticancéreux sur la lignée leucocytaire (Lahouel et al., 2004). Cette baisse dans la formule leucocytaire peut être liée à la suppression des cellules progéniteurs dans la moelle osseuse.



**Figure 17 :** Variation du nombre des globules blancs ( $10^3/\mu\text{l}$ ) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax  $75 \text{ mg/m}^2$  et Epi  $200 \text{ mg/m}^2$  seul ou associés à une dose de  $25 \text{ mg/kg}$  de la propolis.

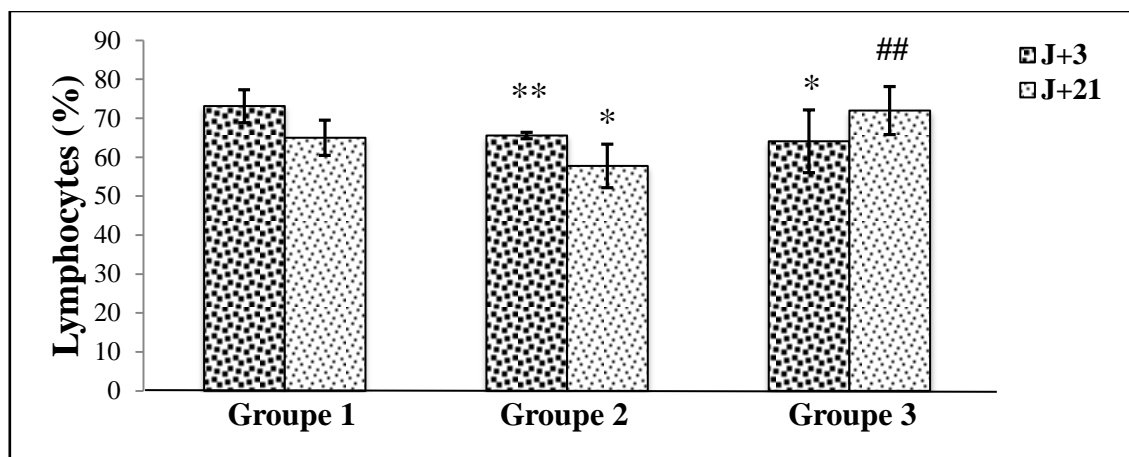
Au 21<sup>ème</sup> jour, nous avons constaté une augmentation du nombre des globules blancs qui dépasse le taux initial, il apparait un phénomène de rebond dans la formule leucocytaire qui épargne les lymphocytes et les monocytes. En effet les leucocytes passent de  $6.96 \pm 0.72 \times 10^3/\mu\text{l}$  à

$8.63 \pm 2.53 \times 10^3/\mu\text{l}$  et les granulocytes de  $21 \pm 1.41\%$  à  $29 \pm 0.7\%$ . Cet effet rebond pourrait être lié à la stimulation de la granulopoïèse.

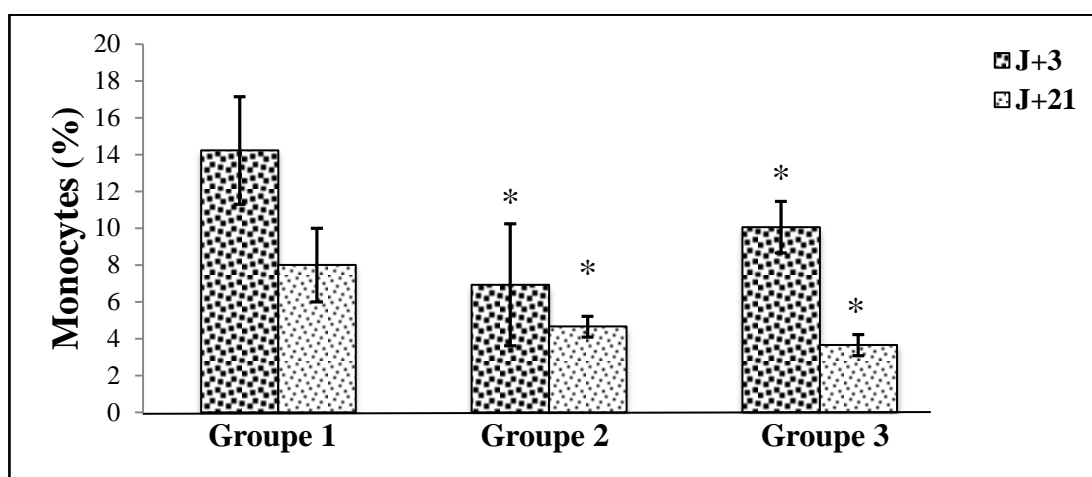


**Figure 18 :** Variation du pourcentage des granulocytes (%) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax  $75 \text{ mg/m}^2$  et Epi  $200 \text{ mg/m}^2$  seul ou associés à une dose de  $25 \text{ mg/kg}$  de la propolis.

Par contre le taux des lymphocytes et des monocytes diminue de façon significative pour atteindre la valeur de  $57.75 \pm 5.61\%$  contre  $65.53 \pm 0.83\%$  et de  $4.66 \pm 0.57\%$  contre  $6.93 \pm 3.31\%$ . Ceci peut s'expliquer par l'intensité des foyers de nécroses dans les tissus au niveau central (Lahouel, 1985).



**Figure 19 :** Variation du pourcentage des lymphocytes (%) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax  $75 \text{ mg/m}^2$  et Epi  $200 \text{ mg/m}^2$  seul ou associés à une dose de  $25 \text{ mg/kg}$  de la propolis.



**Figure 20 :** Variation du pourcentage des monocytes (%) en fonction du temps après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et Epi 200 mg/m<sup>2</sup> seul ou associés à une dose 25 mg/kg de la propolis.

Notre étude montre que malgré l'EEP n'a pas pu prévenir la réduction très hautement significative des globules blancs et significative des lymphocytes par rapport au groupe1 "témoin", le 3<sup>ème</sup> jour du traitement, mais il induit un effet rebond plus élevé que celui observé chez le groupe2 "traité" ( $9.85 \pm 0.92 \times 10^3/\mu\text{l}$  contre  $8.63 \pm 2.53 \times 10^3/\mu\text{l}$  des leucocytes chez le groupe2 et  $72 \pm 6.16\%$  contre  $57.75 \pm 5.61\%$  des lymphocytes chez le groupe2). Ainsi qu'il peut réduire les dommages causés par les agents chimiothérapeutiques sur l'ADN des leucocytes (Orsolich et *al.*, 2008).

Comme il est indiqué dans la figure 18, le pourcentage des granulocytes (neutrophiles) pour le 3<sup>ème</sup> jour était significativement plus élevé dans le groupe3 "prétraité" ( $21.75 \pm 1.06\%$ ) que dans le groupe2 "traité" ( $21 \pm 1.41\%$ ), avec un effet rebond similaire à celui du groupe2 au 21<sup>ème</sup> jour. De même le pourcentage des monocytes (figure 20) était significativement plus élevé chez les rats prétraités "groupe3" ( $10.06 \pm 1.4\%$ ) que chez les rats traités "groupe2" ( $6.93 \pm 3.31\%$ ). Cependant, il diminue de façon significative le 21<sup>ème</sup> jour ( $p < 0.05$ ).

Donc, en générale, les animaux recevant quotidiennement 25 mg/kg de l'extrait éthanolique de la propolis pendant 5 jours suivie par le traitement anticancéreux montrent des formules sanguines mieux que celles des rats traités par la chimiothérapie seule. En effet, ce prétraitement a permis d'éviter la thrombopénie et la leucopénie constatée chez les animaux traités seulement par le Taxotère avec l'Épirubicine. De plus les résultats obtenus sont en accord avec plusieurs études (Orsolich et Basic, 2005 ; El-Aidya et *al.*, 2015 et Boufadi et *al.*, 2016).

### 2.3. Variation des paramètres érythrocytaires du statu oxydant / antioxydant chez les rats traités et les rats prétraités

La propolis présente une forte activité antioxydante due à sa richesse en flavonoïdes et en composés phénoliques qui ont la capacité de donner des ions d'hydrogènes pouvant attaquer les radicaux libres pour empêcher les réactions d'oxydation dans la cellule. De ce fait, elle inhibe la formation des radicaux libres et réduit le stress oxydatif (Nirala et *al.*, 2008 ; El Sohaimy et Masry, 2014). L'efficacité de la propolis en tant qu'un chimioprotecteur a été évaluée en fonction des changements dans les principaux biomarqueurs de stress oxydatif tels que MDA, GSH, SOD et Catalase.

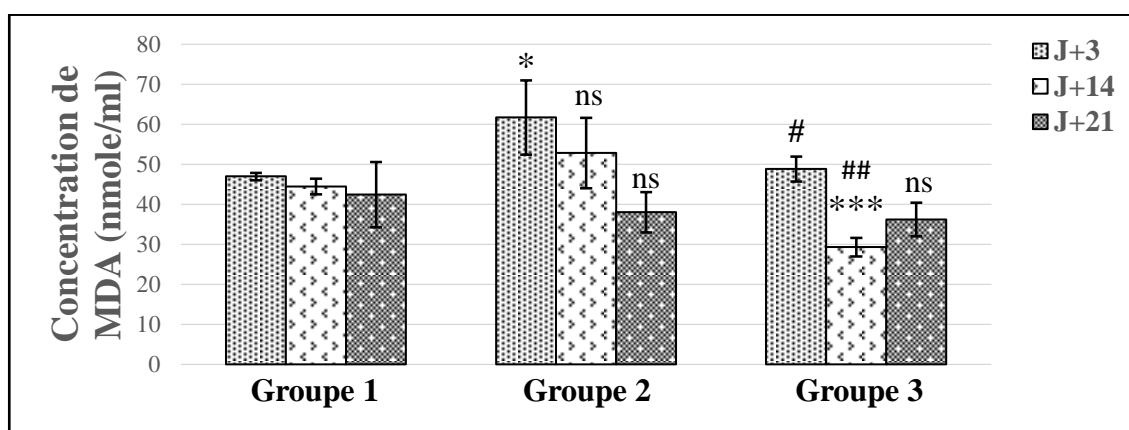
#### 2.3.1. Variations des concentrations en malonyldialdéhyde (MDA)

Une augmentation significative ( $p < 0.05$ ) en MDA a été constatée dès le 3<sup>ème</sup> jour de traitement chez les rats recevant les anticancéreux seuls (Taxotère à 75 mg/m<sup>2</sup> et Épirubicine à 200 mg/m<sup>2</sup>) par rapport aux témoins "groupe1". En revanche, l'extrait éthanolique de propolis a exercé un effet inhibiteur envers la peroxydation lipidique des cellules sanguines, comme le montre la figure 21. Une réduction significative des concentrations de malonedialdéhyde chez les rats prétraités "groupe3" avec 25 mg/kg d'extrait de propolis administré quotidiennement pendant 5 jours avant l'administration des médicaments est observée ( $48.82 \pm 3.13$  nmol/ml contre  $61.68 \pm 9.25$  nmol/ml chez les rats traités "groupe2"), et qui se maintient jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour, où il y a une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ).

D'après les résultats obtenus au 21<sup>ème</sup> jour, nous avons enregistré une réduction non significative dans le taux du MDA chez le groupe2 "traité par la chimiothérapie seule" par rapport au groupe1 "témoin". De même, il y a une diminution non significative du taux du MDA chez le groupe3 "prétraité" par rapport au groupe1 et au groupe2.

En effet, l'extrait de propolis fournit une protection contre les radicaux libres formés pendant le métabolisme de l'épirubicine et le taxotère. Donc, il empêche la liaison de ces métabolites réactifs avec les membranes lipidiques des cellules sanguines, ce qui a entraîné des taux décroissants de la peroxydation lipidique.





**Figure 21 :** Variation des taux du MDA érythrocytaire (nmole/ml) après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et l'Épi 200 mg/m<sup>2</sup> seule ou associée avec l'EEP 25 mg/kg.

Les résultats de notre étude sont consacrés à l'effet préventif de la propolis contre la toxicité hématologique du taxotère et de l'épirubicine. En effet, nous avons remarqué une augmentation significative du taux de MDA dans le groupe2 recevant les anticancéreux seuls. Cette augmentation traduit une action toxique des métabolites de ces agents anticancéreux aussi bien sur les membranes des cellules sanguines circulantes que sur celles des cellules souches totipotentes et des progéniteurs des cellules myéloïdes.

L'augmentation du MDA, produit secondaire du métabolisme de l'acide arachidonique, peut être due à la surproduction des substances réactives ou à une déplétion de la capacité de les neutraliser. Le déséquilibre entre la production des ROS et le système antioxydant a provoqué la peroxydation lipidique (Kirschvink *et al.*, 2008).

Les radicaux libres formés par l'épirubicine et le taxotère lors de la chimiothérapie, vont provoquer la peroxydation lipidique des cellules souches hématopoïétique, celle-ci induit une altération irréversible des propriétés fonctionnelles des cellules, pouvant aller jusqu'à la lyse cellulaire (Milane, 2004) ce qui provoque une réduction significative du nombre des cellules périphériques du sang. Par ailleurs, les membranes des globules rouges sont susceptibles d'être attaqués par les radicaux libres formés à cause de leur richesse en acides gras polyinsaturés. En effet les ROS vont détruire ces membranes et provoquent ainsi la lyse de érythrocytes (Senthilkumar *et al.*, 2006). En outre, nos résultats confirment également des rapports antérieurs sur la toxicité de l'association Taxotère-Anthracycline sur les lipides (Aluise *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009).

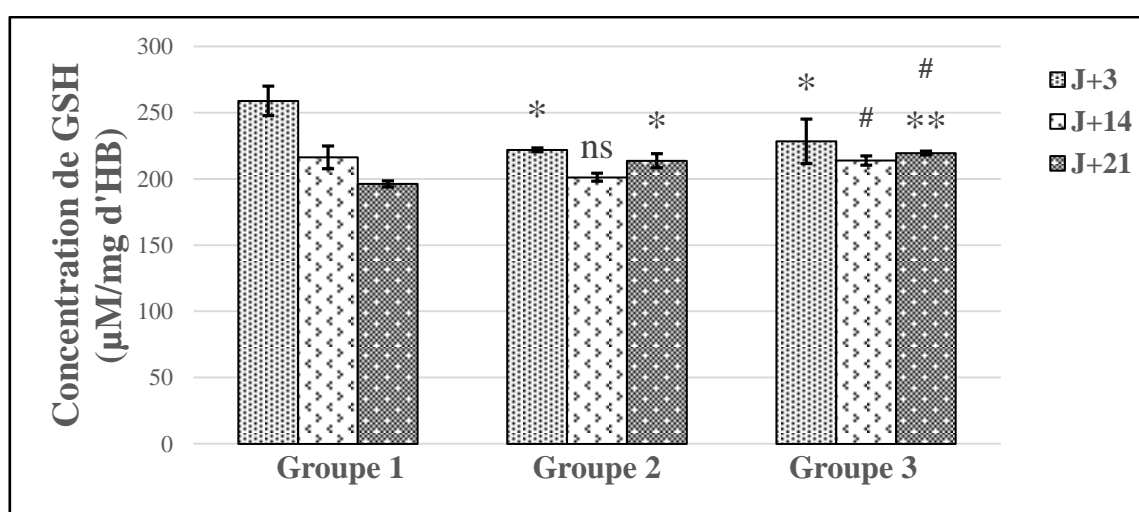
En revanche, nos résultats montrent que l'administration orale et pendant 5 jours de la propolis prévient efficacement la peroxydation lipidique induite par la chimiothérapie (TE). Nous avons

enregistré une nette diminution des taux de MDA dans les rats recevant l'extrait de la propolis avant le traitement médicamenteux. Ce qui prouve l'effet préventif des flavonoïdes de la propolis sur la toxicité hématologique, c'est-à-dire, ils peuvent réagir avec la plupart des radicaux libres susceptibles d'arracher un hydrogène sur le groupement  $\text{CH}_2$  situé entre les deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés, ce qui est un élément important pour la protection des membranes cellulaires (Milane, 2004).

### 2.3.2. Variations des concentrations en glutathion (GSH)

Les variations des taux de glutathion sont fonction du temps. Nous avons constaté une diminution significative des taux de glutathion érythrocytaire chez les rats traités par les médicaments anticancéreux seuls "groupe2". Elle s'accroît au 14<sup>ème</sup> jour où elle atteint son niveau le plus bas ( $201.18 \pm 3 \mu\text{M}/\text{mg}$  d'Hb contre  $216.26 \pm 8.57 \mu\text{M}/\text{mg}$  d'Hb chez les témoins "groupe1"). Au délai de 21 jours, le taux en glutathion a augmenté de façon significative ( $p < 0.05$ ) par rapport à celui du groupe1. Ceci nous laisse penser à un recouvrement des capacités de synthèse du glutathion par les cellules sanguines après l'élimination des anticancéreux de l'organisme.

De même, au délai de 3 jours, nous avons remarqué une diminution significative du taux de glutathion chez les rats prétraités par l'extrait de propolis "groupe3" par rapport à celui du groupe1 ( $p < 0.05$ ), mais de façon moins prononcée que chez les rats traités par la chimiothérapie seule "groupe2" ( $228.35 \pm 16.8 \mu\text{M}/\text{mg}$  d'Hb contre  $221.97 \pm 1.47 \mu\text{M}/\text{mg}$  d'Hb chez le groupe2). Cette diminution en GSH reflète l'induction d'un stress oxydatif étendu.



**Figure 22 :** Variation des taux du GSH érythrocytaire ( $\mu\text{mole}/\text{mg}$  d'Hb) après administration d'une dose unique du Tax  $75 \text{ mg}/\text{m}^2$  et s Epi  $200 \text{ mg}/\text{m}^2$  seule ou associée avec l'EEP  $25 \text{ mg}/\text{kg}$ .

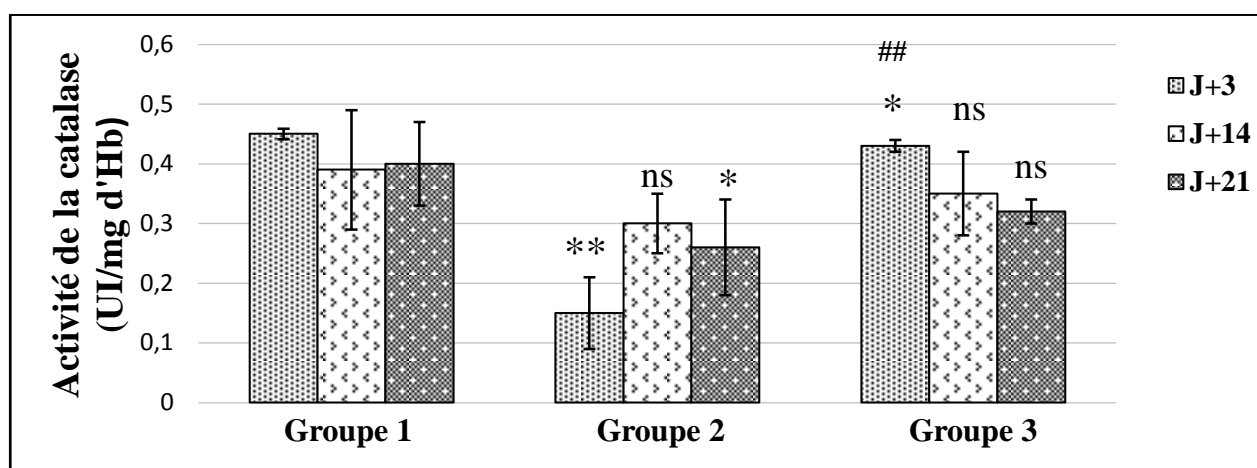
Au 14<sup>ème</sup> jour, il y a une normalisation du taux de GSH chez les rats prétraités "groupe3" ( $213.79 \pm 3.54 \mu\text{M}/\text{mg d'Hb}$ ) par rapport aux témoins "groupe1" ( $216.26 \pm 8.57 \mu\text{M}/\text{mg d'Hb}$ ), suivie par une augmentation hautement significative par rapport au groupe1 ( $p < 0.01$ ) d'une part et significative ( $219.49 \pm 1.49 \mu\text{M}/\text{mg d'Hb}$ ) par rapport au groupe2 ( $213.64 \pm 5.35 \mu\text{M}/\text{mg d'Hb}$ ) d'autre part, au délai de 21 jours.

Ces données peuvent expliquer l'effet préventif des flavonoïdes de la propolis contre le stress oxydatif induit par les anticancéreux. Le mécanisme par lequel l'extrait de propolis prévient le stress oxydatif au niveau des cellules sanguines peut impliquer l'augmentation du taux de GSH par l'induction de sa synthèse par les composés bioactifs de la propolis (Kebsa et al., 2014), ou bien par l'effet scavenger des flavonoïdes, c'est-à-dire, au lieu que les métabolites réactifs toxiques des médicaments se lient au glutathion, ils seront capturés par les flavonoïdes. Ils sont donc capables d'empêcher la chute du GSH et stimulent sa régénération à partir de GSSG suite à la neutralisation de ROS, de ce fait le taux du GSH érythrocytaire augmente chez les groupes prétraités par la propolis.

Par contre, la chimiothérapie combinée Taxotère-Épirubicine a généré des dommages oxydatifs remarquables. Chez les rats traités par les anticancéreux, nous avons constaté une augmentation en MDA avec un appauvrissement concomitant du GSH érythrocytaire par rapport aux témoins non traités. Les radicaux libres générés par les anticancéreux peuvent également favoriser l'oxydation de GSH (Oliveira, 2006). La réduction observée de sa quantité peut confirmer l'efficacité de la chimiothérapie, d'une part, et peut traduire la consommation intense du glutathion pour la détoxification des radicaux libres produits lors du métabolisme des agents anticancéreux, d'autre part (Sheeja et Kuttan, 2006).

### 2.3.3. Variation de l'activité enzymatique de la catalase érythrocytaire

L'analyse de nos résultats illustrés dans la figure 23 montre qu'après 3 jours de l'administration des médicaments anticancéreux, l'activité enzymatique de la catalase érythrocytaire a diminué de façon hautement significative ( $p < 0.01$ ) chez les rats du groupe2 recevant la chimiothérapie seule ( $0.15 \pm 0.06 \text{ UI}/\text{mg d'Hb}$ ) par rapport à celle mesurée chez les rats du groupe1 "témoins" ( $0.45 \pm 0.009 \text{ UI}/\text{mg d'Hb}$ ). Cependant, les animaux du groupe3 prétraités par l'extrait éthanolique de propolis avant le traitement par les anticancéreux montrent une élévation hautement significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de cette enzyme par rapport aux animaux traités par la chimiothérapie seule "groupe2" ( $0.43 \pm 0.01 \text{ UI}/\text{mg d'Hb}$  chez le groupe3 contre  $0.15 \pm 0.06 \text{ UI}/\text{mg d'Hb}$  chez le groupe2).



**Figure 23 :** Variation de l'activité enzymatique de la CAT érythrocytaire (UI/mg d'Hb) après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et Epi 200 mg/m<sup>2</sup> seule ou associée avec l'EEP 25 mg/kg.

Au délai de 14 jours, nous avons constaté une augmentation non significative ( $p > 0.05$ ) de l'activité de la catalase, 2 fois plus que celle enregistrée le 3<sup>ème</sup> jour chez les rats du groupe2, mais elle reste plus basse que celle des rats témoins du groupe1. Par contre, chez les rats du groupe3 prétraités par l'extrait de la propolis, nous avons enregistré une activité enzymatique plus importante par rapport aux rats du groupe2 recevant la polychimiothérapie seule ( $0.35 \pm 0.07$  UI/mg d'Hb chez le groupe3 contre  $0.3 \pm 0.05$  UI/mg d'Hb chez le groupe2).

Dans le 21<sup>ème</sup> jour, l'activité de la CAT est diminuée de façon significative ( $p < 0.05$ ) chez le groupe2 traité par les anticancéreux par rapport au groupe1 témoin. En revanche, nous constatons une augmentation non significative de leur activité chez les rats du groupe3 prétraités par la propolis ( $0.32 \pm 0.02$  UI/mg d'Hb) comparée au groupe2 traité par la polychimiothérapie seule ( $0.26 \pm 0.08$  UI/mg d'Hb).

La catalase est l'un des antioxydants enzymatiques, elle est essentiellement présente dans les peroxysomes, les érythrocytes, les hépatocytes et les reins. Cette enzyme est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) produit par la super oxyde dismutase (SOD) en eau ( $H_2O$ ) et en oxygène moléculaire ( $O_2$ ), protégeant ainsi la cellule contre les dommages oxydatifs induits par le  $H_2O_2$  et le  $OH^\circ$  (Sofa et al., 2015). Les ROS ainsi formés peuvent agir par inactivation de cette enzyme antioxydante qui perdent de ce fait leur fonction (Preetha et al., 2006).

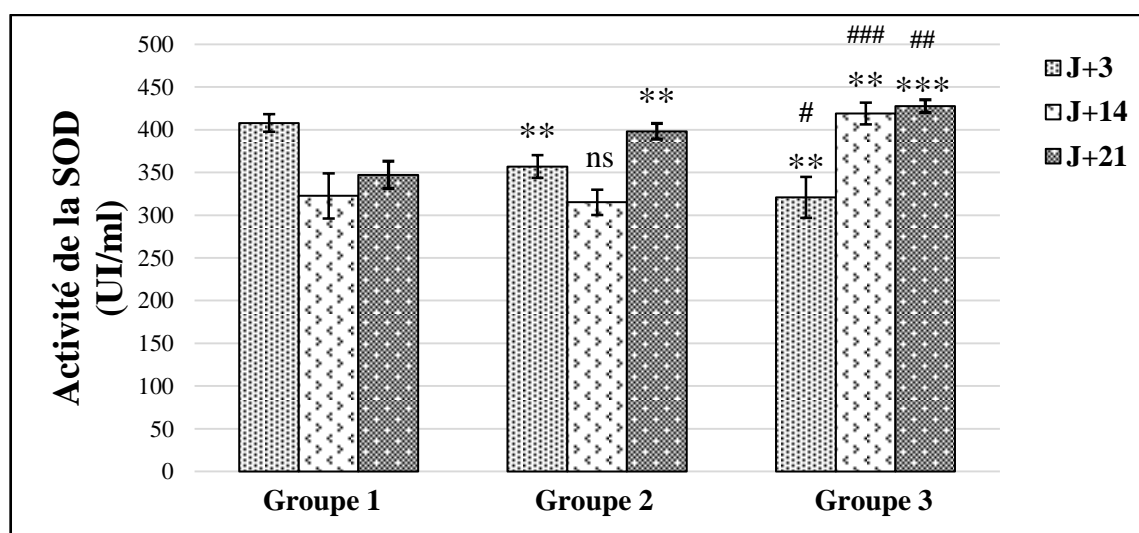
D'après les résultats obtenus, les traitements anticancéreux sont capables d'inhiber l'activité de la catalase érythrocytaire. Cette inhibition pourrait être expliquée par la production massive des

radicaux libres ainsi que l'augmentation des taux en MDA observés (Araf et *al.*, 2005 ; Koti et *al.*, 2009), indiquant ainsi que des quantités élevées du peroxyde d'hydrogène pourraient être rapportées dans ce cas-ci, et altérant l'activités de la catalase en détruisant sa partie catalytique (Halliwall et Gutteridge, 2007). Ces résultats sont en accords avec ceux de Campos et *al.* (2014) qui ont remarqué une réduction de l'activité de la catalase érythrocytaire chez des rats traités par le Paclitaxal.

En revanche, la propolis a montré clairement une élévation significative de l'activité enzymatique de la catalase érythrocytaire chez les rats prétraités. En effet, Elle a une action directe sur cet enzyme soit par leur activation, soit par l'induction de leur expression, ou bien elle empêche toute altération de leur activité induite par les radicaux libres formés (Benguedouar et *al.*, 2008). Plusieurs études suggèrent que la propolis renforce le système antioxydant par réduction des ROS et augmentation de l'activité enzymatique de la CAT (Ulusoy et *al.*, 2016).

### 2.3.4. Variation de l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire

L'administration des anticancéreux entraine dès le 3<sup>ème</sup> jour une diminution très hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'activité enzymatique de la SOD, aussi bien chez le groupe2 traité que chez le groupe3 prétraité par rapport au groupe1 témoin. Ce résultat suggère que des lésions oxydatives importantes causées par les doses élevées des anticancéreux n'ont pas pu être contrebalancées par les systèmes de défense antioxydants.



**Figure 24 :** Variation de l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaire (UI/ml) après administration d'une dose unique du Tax 75 mg/m<sup>2</sup> et Epi 200 mg/m<sup>2</sup> seule ou associée avec l'EEP 25 mg/kg.

Cependant, elle augmente de façon très hautement significative chez les rats du groupe3 prétraités par la propolis ( $419.1 \pm 12.7$  UI/ml) par rapport aux rats du groupe2 traités par la chimiothérapie seule ( $315.1 \pm 14.78$  UI/ml), au délai de 14 jours. La dose de 25 mg/kg de la propolis entraîne une augmentation hautement significative de l'activité enzymatique de SOD par rapport au groupe2 ( $p < 0.01$ ) et très hautement significative par rapport au groupe1 ( $p < 0.001$ ), au 21<sup>ème</sup> jour.

Les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes qui transforment l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène beaucoup moins réactif. Cette réaction considérée la plus rapide à ce jour, constitue le facteur déclenchant les mécanismes de la défense naturelle (Marfak, 2003).

La SOD se comporte contre les ROS de deux façons différentes. En premier lieu, l'organisme réagira lors d'un stress oxydant modéré en sur exprimant la SOD. Si le stress persiste et produit de façon massive des ROS, la concentration en SOD chutera. En effet, la réduction significative de l'activité enzymatique de la SOD érythrocytaires chez le groupe traité par la chimiothérapie seule peut être due à cause d'une production intense de l'anion superoxyde suite au traitement des animaux par les médicaments anticancéreux, qui dépasse largement les capacités disponibles de la SOD à éliminer l'anion superoxyde. Par contre, le prétraitement des animaux par la propolis atténue complètement ces effets puisque les taux de la SOD reviennent à la normale. Ces résultats explique la propriété antioxydante des flavonoïdes démontrée dans plusieurs travaux (Lahouel et *al.*, 2010 ; Kebsa et *al.*, 2014).

Globalement, les résultats de notre étude sur l'effet de la chimiothérapie seule ou associée à la propolis sur les variations des paramètres érythrocytaires du statu oxydant/antioxydant chez les rats traités et les rats prétraités sont similaires à ceux de la littérature (Lahouel et *al.*, 2004 ; Tabaczar et *al.*, 2012).



La chimiothérapie reste d'un apport considérable dans le traitement du cancer, et ce, malgré ses effets secondaires qu'elle entraîne, notamment l'hématotoxicité. Elle serait plus bénéfique si on arrive à diminuer ces risques.

Dans notre étude, la toxicité hématologique de la chimiothérapie combinée (TAX, EPI) est prouvée. Ces médicaments anticancéreux entraînent des troubles assez profonds dans les formules sanguines chez les rats, exprimés par une neutropénie et une thrombopénie très sévère, et liés à un stress oxydatif induisant un déficit dans le système antioxydant que ce soit enzymatique (SOD et CAT) ou non enzymatique (GSH) avec une augmentation accrue de la peroxydation lipidique.

L'administration préventive de la propolis jouent un rôle protecteur contre la toxicité des anticancéreux sur les cellules souches hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse, ainsi que l'épuisement des systèmes antioxydants. En effet, il y a une amélioration remarquable de la formule sanguine. De même, le statut redox du sang est maintenue à son équilibre en normalisant le taux des antioxydants GSH, SOD et CAT chez les rats prétraités par la propolis ce qui empêche la peroxydation lipidique et donc, améliore la cytopénie résultante suite à la chimiothérapie.

D'après nos résultats, il est clairement établi que la propolis exerce par leur activité antioxydante un effet préventif contre la toxicité hématologique causée par l'association TÉ.

En outre, les résultats de la présente étude chez les rats nous ont donné l'espoir que la propolis peut conférer la prévention ou la réduction de la toxicité hématologique des agents chimiothérapeutiques et peut être utilisée chez les humains à l'avenir en tant qu'adjuvant à la chimiothérapie standard contre le cancer, d'autant qu'elle est sélective contre les radicaux libres sans affecter les propriétés anti-tumorales des médicaments anticancéreux.

En effet, des études complémentaires et approfondies sur des animaux de laboratoires porteurs d'un cancer sont nécessaires. Aussi bien, d'étudier l'effet de la propolis lors de plusieurs cycles de la chimiothérapie (TÉ), c'est-à-dire, d'élargir la durée de l'étude au-delà de 21 jours dans le but d'obtenir des résultats plus conformes et réels.



**-A-**

- Aapro, M.S., Bohlius, J., Cameron, D.A., Dal Lago, L., Donnelly, J. P., & Kearney, N. 2010update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumors. *Eur. J. Cancer*, 2011; 47(1): 8- 32.
- Akyol, S., Ozturk, G., Ginis, Z., Armutcu, F., Yigitoglu, M.R., & Akyol, O. In vivo and in vitro antineoplastic actions of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): therapeutic perspectives. *Nutr. Cancer*, 2013; 65: 515-526.
- Alm-Eldeen, A.A., Basyony, M.A., Elfiky, N.K., & Ghalwash, M. M. Effect of the Egyptian propolis on the hepatic antioxidant defense and pro-apoptotic p53 and anti-apoptotic bcl2 expressions in aflatoxin B1 treated male mice. *Biomed. Pharmacother.*, 2017; 87: 247-255.
- Al-Nakouzi, N. Établissement d'un nouveau modèle préclinique de cancer de la prostate et identification de biomarqueurs de résistance au docétaxel [Thèse]. Université Paris XI, 2011. P.1- 250.
- Aluise, C.D., Clair, D., Vore, M., & Butterfield, D.A. In vivo amelioration of adriamycin induced oxidative stress in plasma by gamma-glutamylcysteine ethyl ester (GCEE). *Cancer Lett.*, 2009; 282: 25-29.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., & Trinajstić, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica.Chemica. Acta.*, 2003; 76 (1): 55- 61.
- Andrieu-Abadie, N. Cardiotoxicity of anthracyclines: mechanisms and pharmacologic targets for prevention. *Thérapie*, 2004; 59 (1): 121-126.
- Arafa, H.M., Abd-Ellah, M.F., & Hafez, H.F. Abatement by naringinin of doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *J. Egyp. Nat. Cancer Inst.*, 2005; 17: 291-300.

**-B-**

- Baker, S.D., Li, J., Tije, A.J., Figg, W.D., Graveland, W., & Verweij, J. Sparreboom A: Relationship of systemic exposure to unbound docetaxel and neutropenia. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005; 77: 43-53.
- Barni, S., Cabiddu, M., Guarneri, P., Lonati, V., & Petrelli, F. The Risk for Anemia with Targeted Therapies for Solid Tumors. *Oncologist*, 2012; 17(5):715-24.
- Bazmandegan, G., Boroushaki, M.T., Shamsizadeh, A.,Ayoobi, F., Hakimizadeh, E., & Allahtavakoli, M. Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage

- via affecting antioxidant enzyme system in mice. *Biomed. Pharmacother.*, 2016; 57(11): 1-8.
- Benguedouar, L., Boussenane, H.N., Kebsa, W., Alyane, M., Rouibah, H., & Lahouel, M. Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *I.J.E.B*, 2008; 21: 112-119.
- Ben Moussa, M.T. Les anticancéreux d'origine naturelle Laboratoire de pharmacognosie. Batna, 2012 :1-14.
- Bontenbal, M., Creemers, G.J., & Braun, H.J. Phase II to III study comparing doxorubicin and docetaxel with fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide as first-line chemotherapy in patients with metastatic breast cancer: results of a Dutch Community Setting Trial for the Clinical Trial Group of the Comprehensive Cancer Centre. *J. Clin. Oncol.*, 2005; 23:7081-7088.
- Bouchard, L., Lespérance, B., Brisson, S., & Tremblay, F. Ce qu'il faut savoir sur la chimiothérapie. Fondation québécoise du cancer. Canada, 7<sup>e</sup> édition, 2005: 51.
- Boufadi, Y.M., Soubhye, J., Riazi, A., Rousseau, A., Vanhaeverbeek, M., Nève, J., Boudjeltia, K., & Antwerpen, P. Characterization and Antioxidant Properties of Six Algerian Propolis Extracts: Ethyl Acetate Extracts Inhibit Myeloperoxidase Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014; 15(2) : 2327–2345.
- Boufadi, M.Y., Touil, A., Tabet, F., Boufadi, F. Z., Djennas, N., & Riazi, A. Biodisponibilité et effet antioxydant et anti-inflammatoire de la propolis chez les rats Wistar. *Nutr. Clin. Metab.*, 2016; 30: 222-283.
- Braakhuis, B.J., Hill, B.T., Dietel, M., Kelland, L.R., Aapro, M.S., & Zoli, W. In Vitro antiprolifertive activity of docetaxel (Taxoter), paclitaxel (Taxol) and cisplatinagains thuman tumour and normal bone marrow cells. *Anticancer Res.*, 1994; 14(1A): 205-208.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 254- 284.
- Brand, W.W., Cuvelier, M.E., Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Leb.Wiss.Tech.*, 1995; 28: 25-30.
- Bruno, R., Hille, D., Riva, A., Vivier, N., Ten Bokkel, H., Van Oosterom, A.T., Kaye, S.B., Verweij, J., Fossella, F. V., Valero, V., Rigas, J.R., Seidman, A. D., Chevallier, B., Fumoleau, P., Burris, H.A., Ravdin, P.M., & Sheiner, L.B. Population pharmacokinetics /pharmacodynamics of docetaxel in phase II studies in patients with cancer. *J. Clin. Oncol.*, 1998; 16: 187-196.

-Buldak, L., Labuzek, K., Buldak, R. J., Kozłowski, M., Machnik, G., Liber, S., Suchy, D., Dulawa-Buldak, A., & Okopien, B. Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacol. Rep.*, 2014; 66(3):418-429.

**-C-**

-Campos, F.C., Panis, C., Rossi, T., Victorino, V.J., Cecchini, A., & Cecchini, R. Aspects related to oxidative stress-mediated toxicity of doxorubicin during chemotherapy treatment, *Appl. Cancer Res.*, 2012; 32(1) :21-25.

-Compas, F.C., Victorino, V.J., Martins-Pinge, M.C., Cecchini, A.L., & Panis, C. Cancer and various chronic conditions. *J. Carcinog.*, 2014; 5: 14.

-Cao, D., Qiao, B., Ge, Z., & Yuan, Y. Amplification loop cascade for increasing caspase activity induced by docetaxel. *J. Cell. Biochem.*, 2005; 96: 810-820.

-Cardinault, N., Cayeux, M.O., & Percie du Sert, P. La propolis : origine, composition et propriétés. *Phytother.*, 2012; 10: 298-304.

-Ceruti, M., Tagini, V., & Recalenda, V. Docetaxel in combination with epirubicin in metastatic breast cancer: pharmacokinetic interactions. *Farmaco.*, 1999; 54:733-739.

-Chabner, B.A., Amrieu, P.C., Drucker, B.J., Michaelson, M.D., Mitsides, M.S, Goss, P.E, Ryan, D. P. Ramachandra, S., Richardson, P.G, Supko, J.G., Wilson, W.H. Antineoplastic agents. Brunton L.L Ed. The pharmacological Basicof therapeutics 11th Ed. Série Goadmenet Gilmans. *Mc. G. graw. Hill. Comp.*, 2006.

-Chen, S.H., Chan, N.L., & Hsieh, T.S. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu.Rev. Biochem.*, 2013; 82:139-170.

-Claiborne, A. Catalase activity. Handbooks of Methods form Oxygen Radical Research (Ed. RA Greenwald). *C.R.C. Press. Boca. Raton. FL.*, 1985: 283-284.

-Clarke, S.J., & Rivory, L.P. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin. Pharmacokinet*, 1999; 36: 99-114.

-Cloutier, L., René, A., & Jutras, A. La formule sanguine complète. *Mistral*, 2014; 11(1): 28-32.

-Corbett, K. D., & Berger, J. M. Structure molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2004; 33: 95-118.

~~D~~

- Dal Ben, D., Palumbo, M., Zagotto, G., Capranico, G., & Moro, S. DNA topoisomerase II structures and anthracycline activity: insights into ternary complex formation. *Current Pharmaceutical Design.*, 2007; 13 (27): 2766-2780.
- Daly-Schveitzer, N. Suivi médical du patient traité pour un cancer. France: Elsevier Masson, 2008: 320.
- De Laurentiis, M., Canello, G., D'Agostino, D., Giuliano, M., Giordano, A., Montagna, E., Lauria, R., Forestieri, V., Esposito, A., Silvestro, L., Pennacchio, R., Criscitiello, C., Montanino, A., Limite, G., Bianco, A.R., & De Placido, S. Taxane-based combinations as adjuvant chemotherapy of early breast cancer: a meta-analysis of randomized trials. *J. Clin. Oncol.*, 2008; 26: 44-53.
- Dewanto, V. X., Wu, K., Adom, K., & Liu, R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 2002; 50: 3010-3014.
- Dingli, D., Traulsen, A., & Pacheco, J.M. Compartmental architecture and dynamics of hematopoiesis. *PLoS One*, 2007: 345.

~~E~~

- El-Aidya, W.K., Ebeid, A.A., Sallam, A.M., Muhammad, I.E., Abbas, A.T., Kamal, M.A., & Sohrab, S.S. Evaluation of propolis, honey, and royal jelly in amelioration of peripheral blood leukocytes and lung inflammation in mouse conalbumin-induced asthma model. *Saudi J. Biol. Sci.*, 2015; 22: 780-788.
- Ellman, G.L. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959; 82(1): 70-77.
- El m'hadi, C., Tanz, R., Khmamouche, M.R., Toreis, M., Mahfoud. T., Slimani, K. A., Errihani, H., & Ichou. M., Toxicities of docetaxel: original drug versus generics-a comparative study about 81 cases. *SpringerPlus*, 2016; 5:732.
- El-Naggar, S.A., Alm-Eldeen, A.A., Germoush, M.O., El-Boray, K.F., & Elgebaly, H.A. Ameliorative effect of propolis against cyclophosphamide-induced toxicity in mice. *Pharm. Biol.*, 2015; 53: 235-241.
- El Sohaimy, S.A., & Masry, H.D. Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian and Chinese propolis, *Am. Eur. J. Agric. Environ.*, 2014 ; 14 : 1116-1124.
- Even, C., Pecuchet, N., Pécuchet, N., & Bouvier, B. Oncologie générale et éléments de soins de support. Paris (France): Margaux Orange, 2011: 236.

-F-

- Fernandes, R.S., Silva, J.O., Lopes, S.C.A., Chondrogiannis, S., Rubello, D., Cardoso, V.N., Olivira, M.C., Ferreira, L.A.M., & de Barros, A.L.B. Technetium-99m-labeled doxorubicin as an imaging probe for murine breast tumor (4T1 cell line) identification. *Nucl. Med. Commun.*, 2016. 37(3): 307-312.
- Ferte, J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur. J. Biochem.*, 2000; 267: 94-277.
- Freifeld, A.G, Bow, E.J., & Sepkowitz, K.A. Clinical practice guideline for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with cancer: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 2011; 52 (4): 56-93.
- Fridovich, I., & Beauchamp, C. Assay of superoxide dismutase. *Anal. Biochem.*, 1971, 44: 87-276.

-G-

- Gallois, L., Fiallo, M., Laigle, A., Priebe, W., & Gamier-Suillerot, A. The overall partitioning of anthracyclines into phosphatidyl-containing model membranes depends neither on the drug charge nor the presence of the anionic phospholipids. *Eur. J. Biochem.*, 1996; 24: 87-879.
- Gambliel, H.A., Burke, B.E., Cusack, B.J., Walsh, G.M., Zhang, Y.L., & Mushlin, P.S. Doxorubicin and C-13 deoxydoxorubicin effects on ryanodine receptor gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002; 291(3): 8-433.
- Gardana, C., & Simonetti, P. Evaluation of allergens in propolis by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 2011; 25: 1675-1682.
- Geckil, H., Ates, B., Durmaz, G., Erdogan, S., & Yilmaz, I. Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal chelating characteristics of propolis. *Am. J. Biochem. Biotech.*, 2005; 1: 27-31.
- Ghedira, K., Goetz, P., & Le Jeune R. Propolis. *Phytother.*, 2009; 7: 100-105.
- Goyette, M. La neutropénie fébrile : un sujet chaud. *Oncologie*, 2012; 47(10): 57-64.
- Guénard, D., Guéritte, F., & Potier, P. Produits naturels anticancéreux la Navelbine® et le Taxotère®. *Actua. Chim.*, 2003: 89-92.
- Gulcin, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch. Toxicol.*, 2012; 86: 345-391.

**-H-**

- Haldar, S., Basu, A., & Croce, C.M. Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res.*, 1997; 57 (2): 229-233.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., & Chapelle, J.P. Le stress oxydant. *Rev. Med. Liege.*, 2007; 62(10): 628-638.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. In: Oxygen is a toxic gas- an introduction to oxygen toxicity and reactive species. New York: Fourth edition, 2007: 28.
- Hande, K.R. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1998; 1400(1-3): 173-184.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., & Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 2002; 13: 572-584.
- Herbst, R. S., & Khuri, F. R. Mode of action of docetaxel a basis for combination with novel anticancer agents. *Cancer Treat. Rev.*, 2003; 29(5): 407- 415.
- Hernández-Vargas, H., Palacios, J., & Moreno-Bueno, G. Telling cells how to die: docetaxel therapy in cancer cell lines. *Cell. Cycle*, 2007; 6(7): 780-783.
- Hong, Y., Margaret, T., & Shuren, L. Collision of Trapped Topoisomerase 2 with Transcription and Replication: Generation and Repair of DNA Double-Strand Breaks with 51 Adducts. *J. Genes*, 2016; 7(32): 2-13.
- Hortobágyi, G.N. Anthracyclines in the treatment of cancer. *An. over. Drugs*, 1997; 54(4): 1-7.

**-I-**

- Iarussi, D.P., Indolfi, F., Casale, P., Coppolino, M.A., & Tedesco M.T. Recent advances in the prevention of anthracyclinecardiotoxicity in childhood. *Curr. Med. Chem.*, 2001; 8(13): 1649-1660.

**-J-**

- Jasprica, I., Mornar, A., & Debeljak, Z. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J. Ethnopharmacol.*, 2007; 110: 548-554.
- Jean-Proste, P., Le Conte, Y. Apiculture: Connaître l'abeille, conduit le rucher. Cachan (France): Lavoisier édition, 2005.
- Joly-Lobbedez, F. Prise en charge des effets secondaires des thérapies ciblées. France: Potentiel d'action, 2011: 65.

## -K-

- Kakoolaki, S., Talas, Z.S., Cakir, O., Ciftci, O., & Ozdemir, I. Role of propolis on oxidative stress in fish brain. *Basic. Clin. Neurosci.*, 2013; 4: 153-158.
- Kebsa, W., Rouibah, H., & Lahouel, M. Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2014; 27(6):1891-1897.
- Kędzia, B. & Hołderna-Kędzia, E. The bee products in the nutrition and supplementation. *Post. Fitoter.*, 2006; 4: 213-221.
- Kędzia, B. Chemical composition of polish propolis (Part II): New Studies. *Post. Fitoter.*, 2009; 2: 122-128.
- Kirschvink, N., Moffarts, B., & Lekeux, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veter. J.*, 2008; 177: 178-191.
- Koceva-Chyla, A., Jedrzejczak, M., Skierski, J., Kania, K., & Jozwiak, Z. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis*, 2005; 10: 1497-1514.
- Kolfshoten, G. M., Hulscher, T.M., Duyndam, M.C.A, Pinedo, H.M., & Boven, E. Variation in the kinetics of caspase-3 activation, Bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 63(4): 733-743.
- Koti, B.C., Vishwanthswamy, A.H.M. Wagawade, J., & Thippeswamy, A.H.M. Cardioprotective effect of lipistat against doxorubicine induced myocardial toxicity in albino rats. *India. J. Exp. Biol.*, 2009; 47: 41-46.
- Kumar, P., Singh, B., Ghai, A., Hazari, P. P., Mittal, B. R., & Mishra, A. K. Development of a single vial kit formulation of [99mTc]-labeled doxorubicin for tumor imaging and treatment response assessment-preclinical evaluation and preliminary human results. *J. Labelled. Comp. Radiopharm.*, 2015. 58(6): 242-9.
- Kumazawa, S., Goto, H., Hamasaka, T., Fukumoto, S., Fujimoto, T., & Nakayama, T. A new prenylated flavonoid from propolis collected in Okinawa. *J. Bio. sci. Biotechnol. Biochem.*, 2004; 68 (1): 260-262.
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Świerczek-Zięba G. Structure and Antioxidant Activity of Polyphenols Derived from Propolis. *Mol.*, 2014; 19: 78-101.

-L-

- Lahouel, M. Etude de la toxicité hématologique, hépatique et rénale de deux médicaments anticancéreux : Doxorubicin et le CCNU chez le rat. [Thèse]: Université de Haute Normandie, 1985: 1-208.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., & Fillastre, J.P. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathol. Biol.*, 2004; 52: 314-322.
- Lahouel, M., Boutabet, K., Kebsa, W., & Alyane, M. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *Afr.J. Pharm. Pharmacol.*, 2010; 4(10): 712-720.
- Lal, S., Mahajan, A., Ning Chen, W., & Chowbay, B. Pharmacogenetics of Target Genes Across Doxorubicin Disposition Pathway. *Current. Drug. Metabolism.*, 2010; 11(1): 115-128.
- Lansiaux, A., & Pourquier, P. Mécanismes moléculaires et déterminants de la réponse aux inhibiteurs de topo-isomérases II. *B.cancer*, 2011; 98(11): 1299-1310.
- Lavelle, F., Bissery, M.C., & Combeau, C. Preclinical evaluation of docetaxel (Taxotere). *Semin. Oncol.*, 1995; 2: 3-16.
- Lubgan, D., Marczak, A., Walczak, M., Distel, L., & Józwiak, Z. Pharmacological mechanisms of Doxorubicin activity (DOX) - current state of knowledge. *Przegl. Lek.*, 2006; 63(9): 8-782.
- Lushchak, V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids*, 2011: 1-26.

-M-

- Madelaine, I., Faure, P., & George, B. Prévention et traitement des principaux effets indésirables liés au cancer et à son traitement. Anticancéreux: utilisation pratique, 6<sup>e</sup> édition, 2008: 61-129.
- Majewska, M., & Cieczot, H. Flavonoids in prevention and therapy of diseases. *Farm. Pol.*, 2009; 65: 369-377.
- Maire, E. Prise en charge thérapeutique des anémies associées au cancer [Thèse]. Université Henri Poincaré - Nancy1, 2010. P.1-141.
- Marie, C., Mélanie, M., Prise en charge des complications de la chimiothérapie. *Oncologie*, 2012; 47(10): 49-59.
- Marfak, A. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: Formation de Depsides [Thèse]. Université de Limoges, 2003. P. 6-34.



- Marieb, E.N. Essentials of Human Anatomy and Physiology. San Francisco: Pearson/ Benjamin Cummings, 9<sup>e</sup> édition, 2009: 632.
- Mazevet, M.H., Étude de la cardiotoxicité induite par les traitements anticancéreux: Rôle d'Epac dans la cardiotoxicité induite par la Doxorubicine [Thèse]. L'université Paris-Saclay, 2015. P. 1-302.
- Merthelsman, R., Engelhardt, M., & Berger, D.P. Précis d'hématologie et d'oncologie. Paris (France): Springer, 2011:1022.
- Milane, H. la quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques [thèse]. Université Louis Pasteur, 2004. P.1-268.
- Minckwitz, G.V. Docetaxel/anthracycline combinations for breast cancer treatment. *Expert. Opin. Pharmacother.*, 2007; 8 (4): 485-495.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, 2004; 56(2): 185-229.
- Misiti, F., Giardina, B., Mordente, A., & Clementi, M.E. The secondary alcohol and aglycone metabolites of doxorubicin alter metabolism of human erythrocytes. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2003; 36: 1643-1651.
- Monassier, L. Pharmacologie DCEM3 : Les anticancéreux. Strasbourg, 2012. P. 30.
- Mouhoubi-Tafnine, Z., Ouchemoukh, S. & Tamendjari, A. Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Ind. Crops Prod.*, 2016; 33(02): 1-6.

### -N-

- Nikitovic, D., Juranek, I., Wilks, M.F., Tzardi, M., Tsatsakis, A., & Tzanakakis, G.N. Anthracycline-dependent cardiotoxicity and extracellular matrix remodeling. *Chest.*, 2014; 146 (4): 1130-1123.
- Nirala, S.K., Li, P., Bhadauria, M., & Guo, G. Combined effects of gallic acid and propolis on beryllium-induced hepatorenal toxicity, *Integ. Zool.*, 2008; 3: 194-207.

### -O-

- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. Assay for lipidperoxydes in animal tissues by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem.*, 1979; 95: 351-358.
- Olczyk, P., Komosińska-Vassev, K., & Olczyk, K. Propolis: chemical composition, properties and application. *Farm. Pol.*, 2007; 63: 1102-1107.

- Oliveira, P.J., Santos, M.S., & Wallace, K.B. Doxorubicin-induced thiol-dependent alteration of cardiac mitochondrial permeability transition and respiration. *Biochem*, 2006; 71: 194-199.
- Olszewska, M. Flavonoids and their use in therapy. *Farm. Pol.*, 2003; 59: 391-402.
- Orsolic, N., & Basic, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomed. Pharmacother*, 2005; 59(10):561-70.
- Orsolic, N., Horvat-Knezevic, A., Benkovic, V., & Basic, I. Benefits of use of propolis and related flavonoids against the toxicity of chemotherapeutic agents. *India. Res. Signpost*, 2008:195-222.
- Orsolic, N., Benkovic, V., Lisicic, D., Dikic, D., Erhardt, J., & Horvat Knezevic, A. Protective effects of propolis and related polyphenolic/flavonoid compounds against toxicity induced by irinotecan. *Med. Oncol.*, 2010; 27:1346-1358.
- Osés, S.M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M.A., López-Díaz, T.M. & Sancho, M.T. Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem.*, 2016; 196: 1215-1223.
- Ostrowska, J., Skrzydlewska, E. The biological activity of flavonoids. *Post. Fitoter.*, 2005; 3 (4): 71-79.

**-P-**

- Parent, D., Jovenin, N., & Rey, J.B. L'obésité est-elle un facteur de risque de toxicité du docétaxel? Une étude pilote. *J. Pharm. Clin.*, 2013; 32(3): 6-161.
- Petrylak, D.P., Tangen, C.M., & Hussain, M.H. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2004; 351:1513-1520.
- Petrylak, D.P. The treatment of hormone-refractory prostate cancer: docetaxel and beyond. *Rev. Urol.*, 2006; 8: 48-55.
- Pfizer Canada. Monographie d'EPIRUBICIN (chlorhydrate d'épirubicine injectable). *Kirkland (Québec) H9J 2M5*, 2014: 1-44.
- Pfizer Canada. Monographie de DOXORUBICIN (chlorhydrate de doxorubicine). *Kirkland (Québec) H9J 2M5*, 2014: 2- 48.
- Poirier, E., Desbiens, C., Poirier, B., Hogue, J.C., Lemieux, J., Doyle, C., Leblond, A.F., Côté, I., Cantin, G., & Provencher, L. Comparison of serious adverse events between the original and generic docetaxel in breast cancer patients. *Ann. Pharmacother*, 2014; 48(4):447-455.
- Poirot, C. L'information sur les effets indésirables de la chimiothérapie anticancéreuse : les besoins du patient et la place du pharmacien [thèse]. Université de lorraine, 2014 .P.1-229.

-Preetha, S.P., Kanniappan, M., Selvakumar, E., Nagaraj, M., & Varalashmi, P. Lupeol ameliorates aflatoxin B1- induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.*, 2006; 143: 133-339.

-R-

-Radaideh, S.M., & Sledge, G.W. Taxane vs. taxane: is the duel at an end? A commentary on a phase-III trial of doxorubicin and docetaxel versus doxorubicin and paclitaxel in metastatic breast cancer: results of the ERASME 3 study. *Breast. Cancer Res. Treat.*, 2008 111:203-208.

-Rao, V.A. Iron chelators with topoisomerase-inhibitory activity and their anticancer applications. *Antioxid. Redox Sign.*, 2013; 18(8): 930-955.

-Ramé, A., Théron, S. Anatomie et physiologie. Paris (France): Masson/ Elsevier, 2<sup>e</sup> édition, 2011: 318.

-Ray, M.R., Lakshmi, C., Deb, C., Ray, C., & Lahiri, T. Modulatory effect of Dopamine on Doxorubicin-induced myelosuppression. *Comp. Haematol. Int.*, 2000; 10: 212-220.

-Regev, R., Yeheskely-Hayon, D., Katzir, H., & Eytan, G.D. Transport of anthracyclines and mitoxantrone across membranes by a flip-flop mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 2005; 70(1): 9 -161.

-Robert, J., Gianni, L. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surv.*, 1993; 17: 51-219.

-Rupeshkumar, M., Kavitha, K., Basu, S.K. Antioxidant and Hepatoprotective Effect of flavanone from *Cardiospermum halicacabum* N. against Acetaminophen induced Hepatotoxicity in Rats. *J. Pharm.Res.*, 2012; 5(1): 544-547.

-S-

-Sanchez-Venegas, J.R., Dinamarca, J., Moraga, A.G., & Gidekel, M. Molecular characterization of a cDNA encoding Cu/Zn superoxide dismutase from *Deschampsia Antarctica* and its expression regulated by cold and UV stresses. *BMC. Res. Notes*, 2009; 2:1-7.

-Sanofi-Aventis. Monographie de produit : TAXOTERE<sup>®</sup> (docetaxel pour injection). Laval (Québec) H7V 0A3, 2016:1-73.

-Sawyer, D.B., Peng, X., Chen, B., Pentassuglia, L., & Lim, C.C. Mechanisms of anthracycline cardiac injury: can we identify strategies for cardioprotection?. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 2010; 53(2): 105-113.

-Sheeja, K., & Kuttan, G., Ameliorating effects of *Andrographis paniculata* extract against cyclophosphamide - induced toxicity in mice. *Asian. Pac. Jcancer. Prev.*, 2006; 7(4): 609-614.

- Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel M., & Rhouati, S. Flavonoids from Algerian propolis. *Arabian J. Chem.*, 2016; 9: 425.
- Sherwood, L. *Physiologie humaine*. Paris (France): De Boeck, 2<sup>e</sup> édition, 2006:750.
- Shivakumar, P., Rani, M.U., Reddy, A.G., & Anjaneyulu, Y.A. study on the toxic effects of Doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol. Int.*, 2012; 19(3): 4-241.
- Silbernagl, S., & Despopoulos, A. *Atlas de poche de physiologies*. Paris (France): Flammarion Médecine-Science, 3<sup>e</sup> édition, 2001: 436.
- Singal, P.K., Iliskovic, N., Li, T., Kumar, D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *Faseb J*, 1997; 2(12): 931-936.
- Singleton, V.L., & Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticul.*, 1965; 37: 144-545.
- Sofa, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., & Vitti, A. Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(6): 13561-13578.
- Sparano, J.A., O'neill, A., Schaefer, P.L., Falkson, C.I., & Wood, W.C. Phase II trial of doxorubicin and docetaxel plus granulocyte colony-stimulating factor in metastatic breast cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1196. *J. Clin. Oncol.*, 2000; 18:2369-2377.
- Stěrba, M., Popelová, O., Vávrová, A., Jirkovský, E., Kovaříková, P., Geršl, V., & al. Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid Redox Signal*, 2013; 18(8): 899-929.
- Szulawska, A., & Czyz, M. Molecular mechanisms of anthracyclines action. *Postepy. Hig. Med. Dosw.*, 2006; 60: 78-100.

### -T-

- Tabaczar, S., Koceva-Chyla, A., Czepas, J., Pieniazek, A., Piasecka-Zelga, J., & Gwozdziński, K. Nitroxide pirolin reduces oxidative stress generated by doxorubicin and docetaxel in blood plasma of rats bearing mammary tumor. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2012; 63 (2): 153-163.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. pharm. Pharmacol.*, 2013, 65: 157-170.
- Takemura, G., & Fujiwara, H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Pro. Cardiovascul. Dis.*, 2007; 49(5): 330-352.

- Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi, J., & Hilali, A. Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa*. *J.M.E.S.C.N.*, 2015; 6 (4):1111-1117.
- Tannock, I., Hill, R.P. The basic science of oncology. *McGraw-Hill Health Prof. Div.*, 1998; 3: 539.
- Tosi, E.A., Ciappini, M.C., Cazzolli, A.F., & Tapiz, L.M. Physicochemical characteristics of propolis collected in Santa Fe (Argentina). *Apiacta*, 2006; 41: 110-120.
- Tartik, M., Darendelioglu, E., Aykutoglu, G., & Baydas, G. Turkish propolis supresses MCF-7 cell death induced by homocysteine. *Biomed. Pharmacother.*, 2016; 82: 704-712.
- Tortora, G.J., Derrickson, B. Manuel d'anatomie et de physiologie humaine. Canada: De Boeck superieur, 2<sup>e</sup> edition, 2016: 678.
- Turan, I., Demir, S., Misir, S., Kilinc, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., & Deger, O. Cytotoxic Effect of Turkish Propolis on Liver, Colon, Breast, Cervix and Prostate Cancer Cell Lines. *Trop. J. Pharm. Res.*, 2015; 14(5): 777-782.

-U-

- Ulusoy, H., Öztürk, İ., & Sönmez, M. Protective effect of propolis on methotrexate induced kidney injury in the rat. *Renal Failure J.*, 2016:1158070.

-V-

- Vallata, P. Intérêt pharmaceutique du genre *Taxus* et des Taxanes; culture in vitro et dosage [Thèse]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. P. 1-106.
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J.W., Levi, M., & Reitsma, P.H. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.*, 2013; 93: 327-358.
- Viret, F., Gonçalves, A., Tarpin, C., Chabannon, C., & Viens, P. G-CSF en oncologie. *Bull. Cancer*, 2006; 93 (5): 463-471.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., & Fernandez-Lopez, J. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.*, 2008; 73: 117-124.
- Volkova, M., & Russell, R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Cur. Cardiol. Rev.*, 2011; 7(4): 214-220.

-W-

- Wagh, V.D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv. Pharmacol. Sci.*, 2013: 1-11.

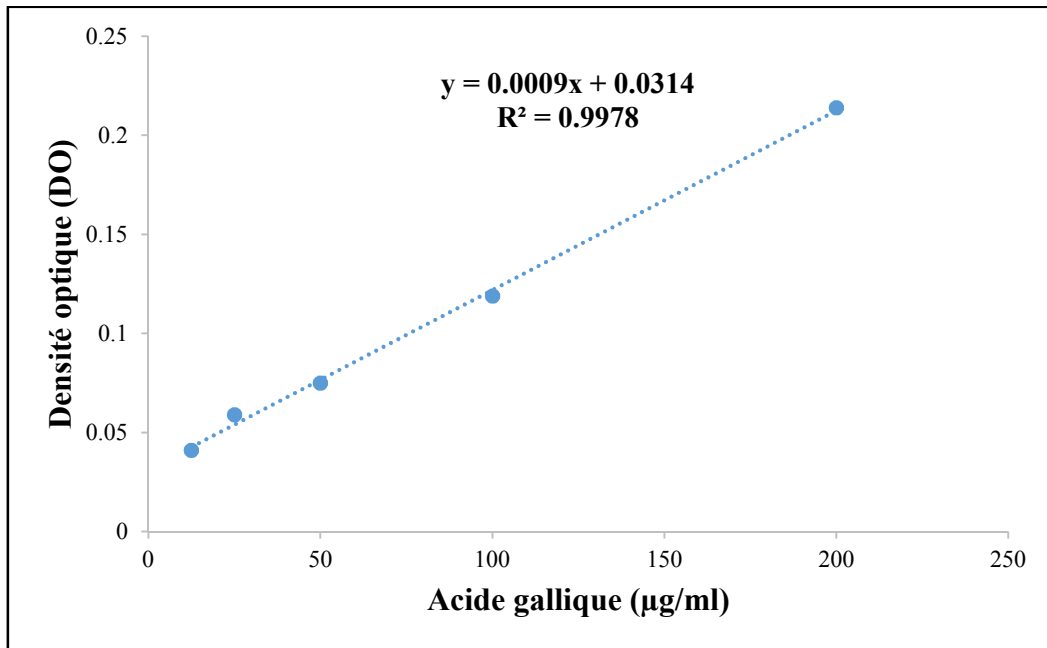
- Wallace, K.B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol. Toxicol.*, 2003; 93(3):105-115.
- Wang, X., Sankarapandian, K., Cheng, Y., Woo, S.O., Kwon, H.W., Perumalsamy, H., & Ahn, Y.J. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *Complement. Altern. Med.*, 2016; 16:1-12.

-Y-

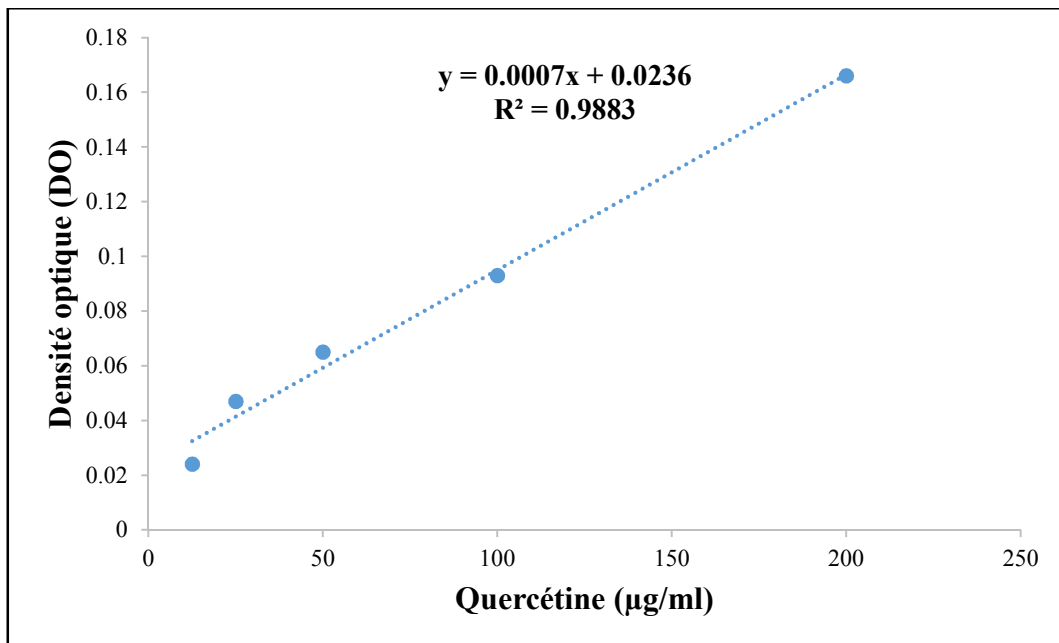
- Yang, Z., Fong, D.W., Yin, L., Wong, Y., & Huang, W. Liposomes modulate docetaxel-induced lipid oxidization and membrane damage in human hepatoma cells. *J. Liposome Res.*, 2009; 19: 122-130.
- Yang, F., Teves, S.S., Kemp, C.J., & Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Bioph. Acta.*, 2014; 1845(1): 84-89.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S.S. Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2004; 59: 113-122.

-Z-

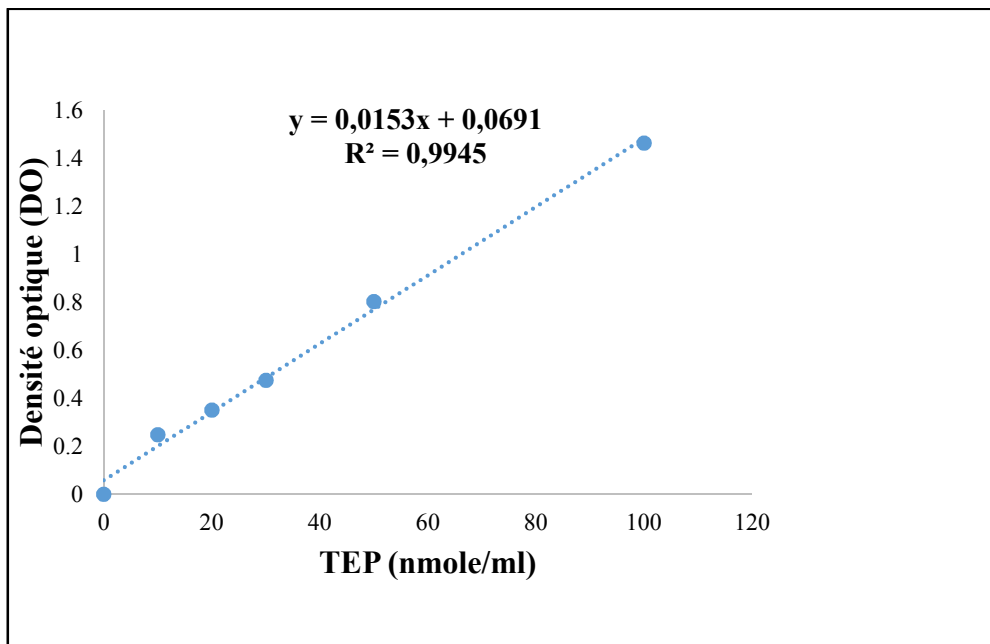
- Zhou, J., & Giannakakou, P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, 2005; 5(1): 65-71.
- Zizic, J.B., Vukovic, N.L., Jadranin, M.B., Anđelković, B.D., Tesević, V.V., Kacanić, M.M., Sukdolak, S.B., & Marković, S.D. Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *J. Sci. Food Agric.*, 2013; 93: 3001-3009.



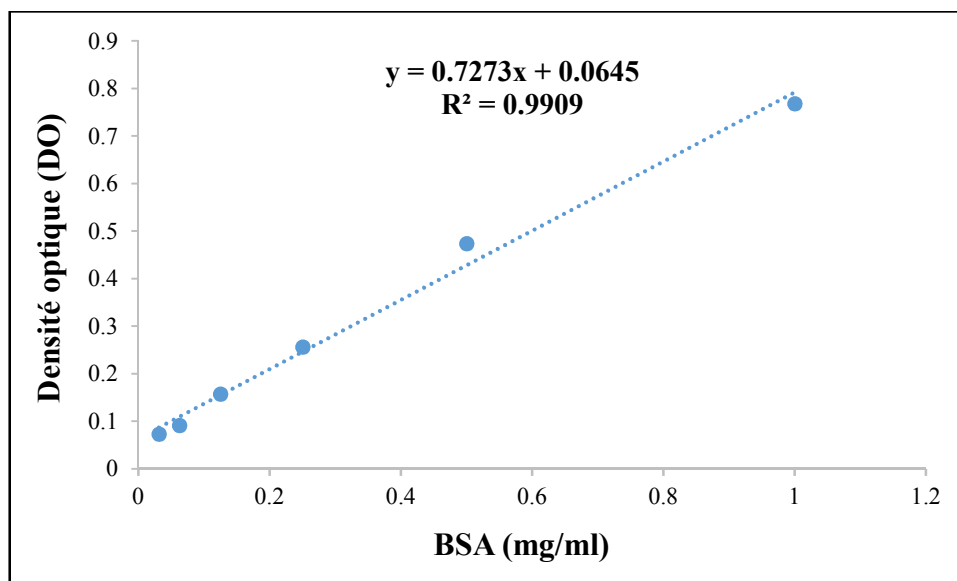
**Annexe 1** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique  $\lambda=760\text{nm}$  (la moyenne de trois essais).



**Annexe 2** : Courbe d'étalonnage de la quercétine  $\lambda=510\text{ nm}$  (la moyenne de trois essais).



**Annexe 3 :** Courbe d'étalonnage de MDA ( $\lambda=532\text{nm}$ ).

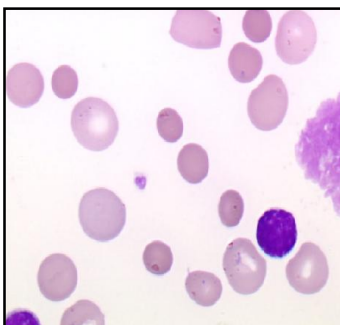


**Annexe 4 :** Courbe d'étalonnage de BSA  $\lambda= 595 \text{ nm}$  (la moyenne de deux essais).

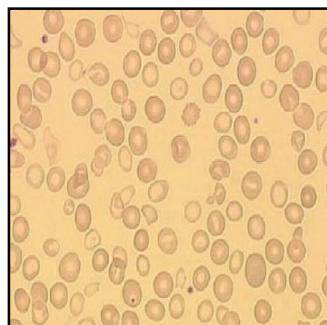




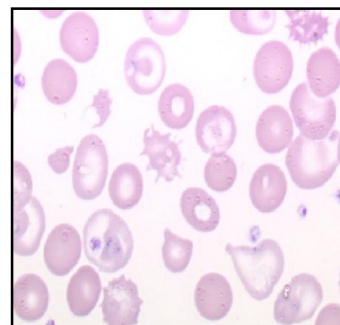
Annexe 5 : Sémiologie des rats.



Anisocytose



Anisochromie



Poïkilocytose

Annexe 6 : Analyse des frottis sanguins (21<sup>ème</sup> jour).



**Réalisée par :**  
Hariti Leyla  
Kider Nadjah  
Lakehel Wafa

**Encadré par :**  
Pr. Lahouel Masbah

## Effet hémato-protecteur de la propolis contre la toxicité induit par l'association Taxotère-Anthracyclines

### المخلص

يعتبر التاكسوثار والانثراسقلين (الإبيروبيسين) من أكثر العلاجات الكيماوية شيوعا. ولكن هذه الأدوية يمكنها التسبب في السمية الدموية، ويرجع ذلك أساسا إلى إنتاج الجذور الحرة (ROS). الهدف من هذه الدراسة هو تقييم الدور الوقائي للدنج ضد السمية الدموية الناتجة عن استعمال التاكسوثار و الإبيروبيسين لدى الفئران. لهذا قمنا بإعطاء الدنج (25مغ /كغ) لمجموعة من الفئران لمدة 5 أيام قبل حقن الدواءين. بعد ذلك قمنا بأخذ عينات الدم كل أسبوع لمدة 21 يوما لدراسة التركيبة الخلوية للدم من حيث التعداد (FNS) وكذلك علامات الإجهاد التأكسدي (MDA، الجلوتاثيون، الكاتالاز و SOD). عند الفئران المعالجة بالأدوية المضادة للسرطان فقط، كان هناك نقصا حادا في الكريات البيضاء والصفائح الدموية، مع ارتفاع كبير في كمية MDA مصحوب بانخفاض ملحوظ في مستويات GSH، ونشاط CAT و SOD. على العكس، عند الفئران المعالجة مسبقا بالدنج، كان هناك تحسنا في مستويات خلايا الدم وجزينات النظام المضاد للأكسدة مع انخفاض في مستويات ال MDA. وعليه، استنادا إلى هذه النتائج، يمكن القول أن للدنج تأثير وقائي ضد السمية الدموية الناتجة عن العلاج الكيميائي بالتاكسوثار و الإبيروبيسين.

**الكلمات المفتاحية:** التاكسوثار، الإبيروبيسين، الدنج، السمية الدموية.

### Résumé

L'association Taxotère-Anthracycline (Épirubicine) est largement utilisée dans le traitement du cancer. Ces médicaments anticancéreux sont capables de provoquer une toxicité hématologique, qui est principalement due à la production des radicaux libres (ROS). Notre étude vise à évaluer l'effet hématoprotecteur de la propolis, substance naturelle antioxydante, contre la toxicité hématologique due à l'association Taxotère- Epirubicine chez des rats mâles *Wistar albinos*. Pour cela nous avons traité un groupe des rats par l'extrait de propolis (25 mg/kg) pendant 5 jours avant l'injection des deux médicaments. Puis nous avons fait des prélèvements sanguins chaque semaine pendant 21 jours, afin d'effectuer la numération sanguine (FNS) et les dosages des marqueurs de stress oxydatif ; malondialdéhyde (MDA), glutathion (GSH), catalase et superoxyde dismutase (SOD). Chez les rats traités par la chimiothérapie seule, il y a apparition d'une leucopénie et une thrombopénie sévère, avec une augmentation significative du MDA et une diminution significative du taux du GSH, et de l'activité de la CAT et la SOD. Par contre, chez les rats prétraités par la propolis, il y a une amélioration au niveau de la formule sanguine et au niveau de système antioxydant avec une réduction du taux du MDA. En effet, la propolis exerce un effet préventif contre la toxicité hématologique induite par l'association Taxotère-Epirubicine.

**Mots clés :** Taxotère, Epirubicine, Propolis, Toxicité hématologique.

### Abstract

Taxotere-Anthracycline (Epirubicin) is widely used in the treatment of cancer. These anti-cancer drugs are capable to provoke haematological toxicity, which is mainly due to the production of free radicals (ROS). Our study aims to evaluate the haematoprotective effect of propolis, a natural antioxidant substance, against the haematological toxicity due to the association Taxotere-Epirubicin in male *Wistar albino* rats. For this, we treated a group of rats with propolis extract (25 mg / kg) for 5 days before the injection of both drugs. Then, we performed blood sampling every week for 21 days to perform blood count (SNF) and oxidative stress marker assays ; malondialdehyd (MDA), glutathion (GSH), catalase and superoxyd dismutase (SOD). In rats treated with chemotherapy alone, severe leukopenia and thrombocytopenia appeared, with a significant increase in MDA and a significant decrease in GSH levels, CAT and SOD activity. On the other hand, in rats pretreated with propolis, there was an improvement in the blood formula and antioxidant system with a reduction in the level of MDA. Indeed, propolis exerts a preventive effect against the haematological toxicity induced by the combination Taxotere-Epirubicin.

**Key words:** Taxoter,Épirubicin, propolis, haematological toxicity.