

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى -جيجل-

Université Mohamed Seddik Ben Yahia -Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du Diplôme : Master Académique en Biologie
Option : Pharmacologie Expérimentale

Thème:

**Effet des polyphénols de la propolis contre la
Néphrotoxicité induit par l'association (Docétaxel
– Epirubicine) chez les rat *wistar albinos***

Membres du Jury :

- Présidente : BOUHAFS L.
- Examineur : BENGUEDOUER L.
- Encadreur : KEBSA W.

Réalisé par :

- BENSACI Sihem
- CHEURFI Loubna
- CHIDEKH Amina

Années Universitaire : 2016- 2017



Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous exprimons d'abord les grands remerciements et notre profonde reconnaissance à **M^{me} KEBSA Wided**, qu'elle a encadré et dirigé ce travail depuis les premiers instants. Nous la remercions pour son sérieux et ses efforts afin de nous aider, de nous conseiller et de nous orienter. Son ouverture d'esprit et sa vision de la recherche scientifique, ont été importantes pour nous que ses connaissances scientifiques et ont largement contribué à l'évolution de cette étude. Nous lui exprimons notre profond respect et nos chaleureux remerciements.*

*Nous voudrions tout spécialement remercier **Pr. LAHOUEL Mesbah** pour son aide précieuse, ses remarques et ses conseils techniques et scientifiques. Merci pour votre soutien et votre disponibilité.*

*Nos remerciements s'adressent également aux membres de jury **M^{me} BOUHAFS Leila** et **Dr. BENGUEDOUER Lamia** qui ont accepté d'évaluer et de juger notre travail.*

*Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à **Mr. Yahya** ingénieur de laboratoire de toxicologie cellulaire et moléculaire pour son aide technique.*

*Des chaleureux remerciements pour les ingénieurs de laboratoire de pharmacologie en particulier : **Makhtar, Wided et Nassiha**.*

Nous souhaitons adresser nos remerciements également à tous les étudiants de « Master pharmacologie expérimentale » de la promotion 2017.

Sincères remerciements

Sommaire

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	3
Chapitre I : L'Epirubicine	4
1. Présentation de la molécule.....	4
2. Données pharmacocinétiques.....	5
3. Mécanisme d'action.....	5
4. Formation d'espèces activées de l'oxygène lors du métabolisme des anthracyclines.....	6
Chapitre II : Le Docétaxel	9
1. Présentation de la molécule.....	9
2. Données pharmacocinétiques.....	9
3. Mécanisme d'action.....	11
Chapitre III : Toxicité rénale de l'Epirubicine et du Docétaxel	13
1. Rappel anatomopathologique du rein.....	13
2. Mécanisme de la toxicité rénale de Docétaxel.....	14
3. Mécanisme de la toxicité rénale de l'Epirubicine.....	15
6. Les marqueurs de la toxicité rénale.....	15
Chapitre IV : La propolis comme source de polyphénols	18
1. La propolis	18
1.1. Historique et définition.....	18
1.2. Propriétés physicochimiques.....	18
1.3. Composition.....	19
1.4. La propolis en thérapeutique.....	19
1.5. Toxicité de la propolis.....	20
2. Les polyphénols	20
2.1. Définition.....	20
2.2. Biosynthèse.....	20
2.3. Classification.....	21
2.4. Pharmacocinétique.....	22
2.5. Activité antioxydante des polyphénols et relation Structure –Activités.....	23
2.5.1. Piégeage des radicaux libres.....	24
2.5.2. Chélation des métaux.....	25
2.5.3. Inhibition enzymatique.....	25
Partie II : Matériel et Méthodes	26
1. Etude phytochimique de la propolis	27
1.1. Dosage des polyphénols totaux.....	27
1.2. Dosage de flavonoïdes totaux.....	27
1.3. Evaluation des propriétés anti-radicalaires par le test au DPPH°.....	28
2. Etude <i>in vivo</i>	29
2.1. Entretien et traitement des animaux.....	29

2.2. Prélèvement des échantillons biologiques	29
2.2.1. Prélèvement de sang.....	29
2.2.2. Collecte d'urine.....	30
2.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du rein	30
2.3. Dosage des paramètres biochimiques.....	30
2.3.1. Chimie des urines.....	30
2.3.2. Dosage de la créatinine plasmatique et sa clairance.....	30
2.3.3. Détermination du taux plasmatique d'urée.....	31
2.3.4. Mesure de l'activité enzymatique de la γ -glutamyl transpeptidase.....	31
2.4. Dosages tissulaires.....	32
2.4.1. Préparation de la fraction cytosolique	32
2.4.2. Dosage des protéines.....	32
2.4.3. Dosage du MDA cytosolique	32
2.4.4. Dosage du glutathion (GSH) rénal	33
2.4.5. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes	33
2.4.5.1. Mesure de l'Activité enzymatique de GST.....	33
2.4.5.2. Mesure de l'Activité enzymatique SOD.....	34
2.4.5.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase.....	34
2.5. Étude histologique	35
2.6. Analyse statistique.....	35
Partie III : Résultats et Discussion.....	36
1. Etude phytochimique de la propolis.....	37
1.1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes	37
1.2. Effet anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis.....	37
2. Etude <i>in vivo</i>.....	38
2.1. Observation du comportement des rats après traitement	39
2.2. Evolution pondérale des animaux sous l'effet des différents traitements.....	40
2.3. Évaluation des paramètres biochimiques	41
2.3.1. Evaluation de la Chimie des urines.....	41
2.3.2. Évaluation de la créatinine plasmatique	42
2.3.3. Evaluation de la clairance de la créatinine plasmatique.....	44
2.3.4. Evaluation de l'urée plasmatique.....	45
2.3.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl transpeptidase urinaire.....	46
2.4. Evaluation des paramètres du stress oxydant rénale	48
2.4.1. Evaluation de la peroxydation lipidique.....	48
2.4.2. Evaluation du taux de glutathion rénal	50
2.4.3. Evaluation des activités enzymatiques rénales.....	51
2.4.3.1. Évaluation de l'activité enzymatique de la GST.....	51
2.4.3.2. Évaluation de l'activité enzymatique de la SOD.....	53
2.4.3.3. Évaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique	54
2.5. Etude histologique.....	55
2.6. Mécanismes pro-oxydant de (EPI-DTX) et anti-oxydant et protecteur de la propolis.....	58
Conclusion	59
Références bibliographiques.....	61
Annexe	

Liste des abréviations

ABCB1: ATP Binding- Cassette Subfamily B1.	EEP : Extrait Ethanolique de Propolis.
ABCC2: ATP Binding- Cassette Subfamily C1.	EPI : Epirubicine.
ADN : Acide Désoxyribonucléique.	ERO: Espèces Réactives de l'Oxygène
ANT: Anthracycline.	FDA : Food and Drug Administration.
Apaf-1: Apoptosis Activating Factor-1.	FG : Filtration Glomérulaire.
ATP: Adénosine Triphosphate.	γ GT : Gamma -Glutamyl Transférase.
BAX : Protéine Bcl-2–Associated X.	GDP: Guanosine Diphosphate.
Bcl2 : B-Cell Lymphoma 2.	GSH: Glutathion.
Bcl-XL: Lymphome Cellulaire – Extra Large.	GST: Glutathion -S-Transférase.
BFG: Barrière de Filtration Glomérulaire	GPX: Glutathion Pyroxydase .
BSA : Bovine Sérum Albumine.	GTP: Guanosine Triphosphate.
CAT: Catalase.	H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.
CAPE: Cafeic Acid Phenyl Ethyl.	IDA : Idarubicine.
CDNB: Chloro -2,4-Dinitrobenzène.	LDL : Lipoprotéine de Densité Légère.
CCNU: Chloroéthyl Cyclohexyl Nitroso-Urée	MDA : Malonyldialdéhydes.
Cr S : Créatinine Sérique.	MDR : Multi Drug Résistance.
Cyp3A4: Cytochrome P450 3A4.	NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
CYP 3A5: Cytochrome P450 3A5.	Phosphate.
Cyt C : Cytochrome C.	NBT : Nitroblu-Tetrazolium.
Cys .C : Cystatine-C.	O₂^{°-} : Anion Superoxyde.
DAUN : Daunorubicine.	OH[°] : Radical Hydroxyl.
DFG : Débit de Filtration Glomérulaire.	ROS: Reactive Oxygen Species.
DMSO : Diméthyl Sulfoxyde.	SOD: Superoxyde Dismutase.
DNPH : Dinitrophénylhydrazine.	TCA : Tri-Chloroacétique Acid.
DOX : Doxorubicine.	TBA: Thio-Barbituric Acid.
DPPH : 2,2. Diphenyl-Picrylhydrazyl.	TBARS: Thio-Barbituric Acid Reactives
DTNB: 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoic Acid.	Substances.
DTX : Docetaxel.	TEP : Tetra Ethoxy- Propane.
EAG : Equivalent Acide Gallique.	TFG : Taux de Filtration Glomérulaire.
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid.	

Liste des Figures

Figure 1. L'épirubicine est un 4'-épimère de doxorubicine.....	4
Figure 2. Principales voies métaboliques de l'épirubicine.....	5
Figure 3. Différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la DOX.....	7
Figure 4. Mécanismes de formation de ROS par les anthracyclines impliquant le fer.....	7
Figure 5. Structure chimique de Docétaxel (Taxotère®).....	8
Figure 6. Métabolisme du Docétaxel et interactions protéiques.....	9
Figure 7. Mécanisme d'action du docétaxel.....	10
Figure 8. Les taxanes peuvent inhiber l'expression des Bcl-2 anti-apoptotique, favorisant la mort cellulaire par apoptose.....	12
Figure 9. Coupe longitudinale d'un rein.....	12
Figure 10. Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.....	13
Figure 11. Classification des polyphénols.....	21
Figure 12. Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone des flavonoïdes.....	21
Figure 13. Métabolisme des flavonoïdes humains.....	22
Figure 14. Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques.....	23
Figure 15. i) Structure ortho-dihydroxy (catechol) dans le cycle B, ii) liaison 2,3-double en conjugaison avec la fonction 4-oxo, iii) groupes hydroxyle aux positions 3 et 5.....	24 25
Figure 16. Sites du flavonoïde proposés pour la chélation des ions métalliques.....	25
Figure 17. Réaction de test DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).....	28
Figure 18. Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de la propolis.....	37
Figure 19. Pourcentage de réduction de réduction du radical DPPH° de l'EPP et de la vitamine C.....	38
Figure 20. Inflammation au niveau de la queue des rats traités par l'association par (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²).....	39
Figure 21. Variation des taux de créatinine plasmatique après administration de (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg / kg.....	43

Figure 22. Variation des clairances de la créatinine plasmatique après 24 de l'administration par (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg / kg.....	44
Figure 23. Variations des taux d'urée plasmatique après administration (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg/kg.....	45
Figure 24. Variation de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl-transpeptidase urinaire après administration (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg/kg.....	47
Figure 25. Variation des taux du MDA cytosolique rénal après administration (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/m ²) seule ou en association avec l'extrait de propolis à 25 mg/kg.....	48
Figure 26. Variation des taux du GSH cytosolique rénal après administration de (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/m ²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg / kg.....	50
Figure27. Variations de l'activité enzymatique de la GST rénale après administration de (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg/kg.....	51
Figure28. Variations de l'activité enzymatique de la SOD rénale après administration (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg/kg.....	53
Figure 29. Variations de l'activité enzymatique de la catalase rénale après administration de (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²) seules ou en prétraitement par l'extrait de propolis (25 mg/kg/j) pendant 5jours.....	54
Figure 30. Coupe histologique des reins issus de groupe Témoin (X40).....	55
Figure 31. Coupe histologique des reins issus de groupe traité par (EPI-DTX) (X 40).....	56
Figure 32. Coupe histologique des reins issus de groupe traité par EPP + (EPI-DTX) (X40).....	57

Listes des tableaux

Tableau 1. Composition chimique de la propolis brute.....	19
Tableau 2. Évaluation pondérale des poids corporels, des poids des reins chez les rats traités par (DTX 200 mg/m ² , EPI 75mg/m ²) seul, en association avec la propolis 25mg/kg.....	40
Tableau 3. Chimie des urines sous l'effet du traitement par l'association (DTX 75mg/m ² - EPI 200mg/ m ²) seule ou en association avec l'EEP (25mg/kg).....	41

Introduction

La chimiothérapie est actuellement indiquée pour la majorité des patients atteints de cancer. Les principaux problèmes limitants son utilisation est la toxicité sur les tissus sains et la mortalité chez les cancéreux (De Rossi *et al.*, 2009). L'atteinte rénale secondaire à un traitement anticancéreux est un effet secondaire grave de ces thérapeutiques. En effet, le rein étant un organe impliqué dans l'élimination des médicaments, toute défaillance de celui-ci peut contre-indiquer l'utilisation temporaire ou définitive d'une chimiothérapie chez un patient donné ou nécessite la mise en place de mesures spécifiques.

Le Docétaxel (DTX) est un taxane qui a suscité un intérêt considérable en raison de son mécanisme d'action par le blocage du cycle cellulaire à la phase G2-M, et de son activité anticancéreuse contre les cancers du poumon, des ovaires, de la leucémie et du mélanome malin (Parent *et al.*, 2013). L'épirubicine (EPI), un antibiotique anthracycline, est utilisé avec succès pour le traitement de divers néoplasmes malins, y compris le cancer du sein, le cancer de poumon et d'autres tumeurs solides en agissant sur l'ADN par l'inhibition de la topo-isomérase II (Viens *et al.*, 2001 ; Wu *et al.*, 2017).

Le stress oxydatif induit par le docétaxel favorise une large gamme de pathologies rénales, allant de l'insuffisance rénale aiguë, néphropathie obstructive, hyperlipidémie et lésions glomérulaires jusqu'à l'insuffisance rénale chronique (Fukasawa *et al.*, 2014). L'épirubicine induit des lésions tubulaires rénales aiguë et des lésions glomérulaires graves (Edit *et al.*, 2007). Compte tenu de son efficacité, l'association (EPI-DTX) semblait irremplaçable pour le traitement du cancer de seins et des poumons. Néanmoins, cette combinaison provoque de nombreux effets secondaires et potentialise leur toxicité rénale, d'où l'intérêt de chercher de nouvelles substances qui peuvent réduire cette toxicité.

La propolis est une substance résineuse, visqueuse et gommeuse recueillie par les abeilles ouvrières à partir des bourgeons et des exsudats des plantes. Ses activités thérapeutiques sont liées directement à sa richesse en polyphénols (José et Sforcin., 2016).

Cette étude vise à évaluer la toxicité rénale de l'association (Docétaxel - Epirubicine) et à établir les mécanismes de l'effet cytoprotecteur de la propolis contre cette toxicité ; et ce à travers l'évaluation des paramètres de stress, des paramètres sériques et la visualisation des changements tissulaires des coupes histologiques.

Partie I. Synthèse Bibliographique

Chapitre I. L'épirubicine

Les anthracyclines (ANT) constituent une classe de médicaments anticancéreux antibiotiques qui ont été isolés à partir de *Streptomyces* au début des années 1960. Les ANT classiques, la daunorubicine (DAUN) et la doxorubicine (DOX) ont été les premiers employés dans le traitement du cancer et sont encore fréquemment utilisées à la fois en monothérapies ou dans les régimes de chimiothérapie (Karch et al., 2016; Kamil et al., 2017).

La recherche d'une "meilleure anthracycline" a donné lieu à environ 2000 analogues. Peu d'analogues ont atteint le stade du développement clinique et approbation, parmi eux, l'épirubicine (EPI) et Idarubicin (IDA) (Minotti et al., 2004).

1. Présentation de la molécule

L'épirubicine (EPI), un antibiotique anthracycline, est utilisé avec succès pour le traitement de divers néoplasmes malins, y compris le cancer du sein, le cancer de poumon et d'autres tumeurs solides (Wu et al., 2017). L'épirubicine (EPI) est un dérivé semi-synthétique de la DOX obtenu par une épimérisation axiale-équatoriale du groupe hydroxyle en C-4 de la daunosamine (Fig. 1). Ce changement de position a peu d'effet sur le mode d'action et le spectre d'activité du EPI par rapport au DOX (Minotti et al., 2004).

Les anthracyclines possèdent la structure poly-aromatique des tétracyclines, avec un aminosucre, la daunosamine, qui est attachée par une liaison glycosidique. Les agents cytotoxiques de cette classe ont tous une structure quinone et hydroquinone, qui leur permet de fonctionner comme accepteur et donneur d'électrons (Khasraw et al., 2012).

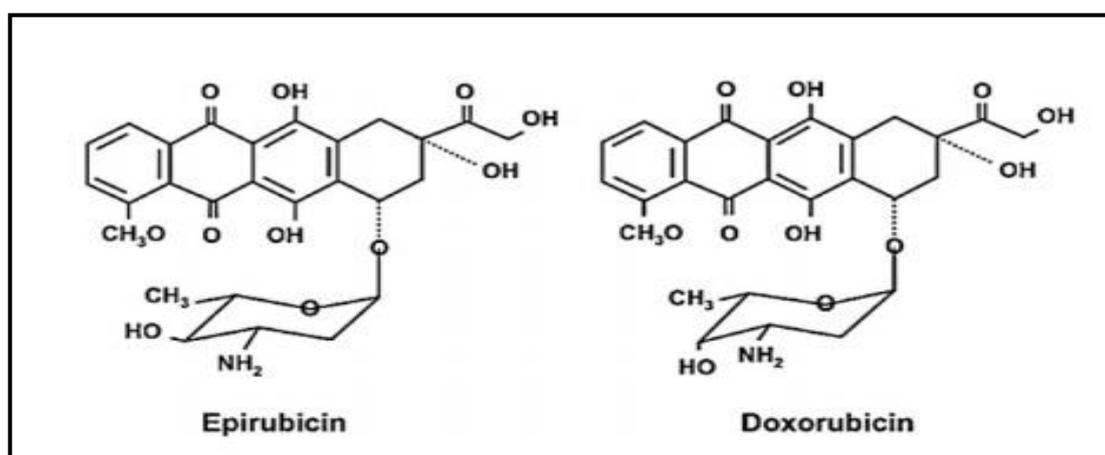


Figure 1. L'épirubicine est un 4'-épimère de la doxorubicine (Khasraw et al., 2012).

2. Données pharmacocinétiques

L'épirubicine est utilisée par voie veineuse, il est caractérisé par un volume de distribution élevé (1000 L/m^2), des demi-vies pour les phases d'élimination initiale (alpha), intermédiaire (bêta) et terminale (gamma) d'environ 3 minutes, 1 heure et 30 heures, respectivement, plus courtes que celles de la doxorubicine. Sa clairance plasmatique totale est d'environ 50 L/h/m^2 (Robert, 1993). Comme les autres anthracyclines, l'épirubicine est principalement métabolisée par le foie donnant naissance à deux métabolites : le 13-dihydro-épirubicinol un très faible degré de cytotoxicité et aglicones d'épirubicine (Innocenti et al., 2001) (Fig.2). L'enzyme responsable du métabolisme de l'épirubicine en 13-dihydroépirubicine (épirubicinol) est l'aldoketoreductase (Robert, 1993).

La principale voie de détoxification de l'épirubicine est la formation du glucuronide d'épirubicine (4-O- β -D-glucuronyl-4-épi-doxorubicine), Parmi les métabolites d'épirubicine, l'épirubicineglucuronide qui est le principal métabolite du médicament présent dans le plasma et les urines (Weenen et al., 1984 ; Innocenti et al., 2001). La glucuronidation est représenté un mécanisme de protection pour l'élimination des xénobiotiques lipophiles du l'organisme. L'épirubicineglucuronide est inactif, soluble dans l'eau et éliminé dans la bile et l'urine (Camaggi et al., 1986).

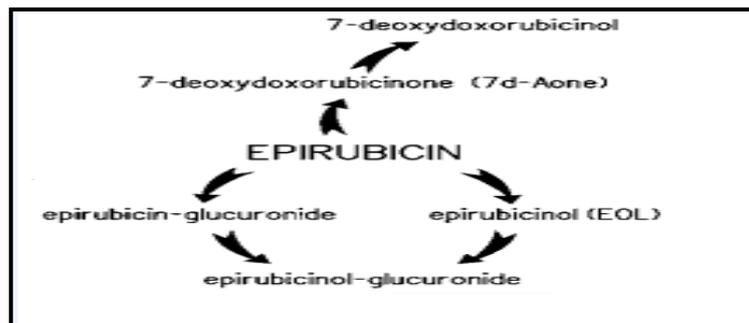


Figure 2. Principales voies métaboliques de l'épirubicine (Esposito et al., 1999).

3. Mécanisme d'action

La compréhension de l'action anticancéreuse des anthracyclines a considérablement progressé avec les développements de la biologie et de la pharmacologie cellulaire. Plusieurs mécanismes sont impliqués (Minotti et al., 2004):

- **Le transport nucléaire** : l'anthracyclines pénètre la cellule par le récepteur pore MDR (multi drugresistance), puis est transportée au noyau sur un protéasome.
- **L'intercalation** : en s'intercalant dans l'acide désoxyribonucléique (ADN), les anthracyclines inhibent la transcription et donc la synthèse protéique. Leur structure multi cyclique planaire, nécessaire à cette action, Leur permet de s'interposer entre deux paires de bases adjacentes.

-Stabilisation de la topo-isomérase II : la formation de complexes entre anthracycline-ADN-topo-isomérase II empêche l'enzyme de réassembler les brins d'ADN dissociés.

- **Radicaux libres** : la production de radicaux libres après fixation sur l'ADN entraîne de nouvelles lésions de l'ADN, localement, mais aussi à distance (membranes, mitochondries).
- **L'apoptose** : 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 active la transcription du gène Bax (médiateur pro-apoptotique), et inhibe celle du gène Bcl-XL (médiateur anti-apoptotique). Bax induit la libération du cytochrome c par la mitochondrie, par ouverture du pore mitochondrial, tandis que Bcl-XL a l'effet inverse. Cette libération du cytochrome c entraîne la formation de l'apoptosome, complexe effecteur comprenant l'apoptosisactivating factor-1 (Apaf-1), le cytochrome c et la pro-caspase-9. La p53 interagit aussi avec la topo-isomérase II, dont elle inhibe la fonction ligase (Minotti et al., 2004).

5. Formation d'espèces activées de l'oxygène lors du métabolisme des anthracyclines

La capacité des ANT à induire la formation de ROS pourrait être prédite à partir de leur structure chimique (Šimunek et al., 2009), ces ROS créés par deux voies différentes ; une voie non enzymatique qui utilise du fer et un mécanisme enzymatique utilisant la chaîne respiratoire mitochondriale. (Richard et al., 2007).

5.1. Voie enzymatique

Dans la voie enzymatique, l'anthracycline interagit avec la chaîne respiratoire mitochondriale et d'autres enzymes contenant le cytochrome (Geisberg et al., 2010). Les anthracyclines peuvent subir d'autres étapes de biotransformation qui consistent en des réactions de réduction impliquant le transfert d'un ou de deux électrons et conduisant à la formation de radical semi-quinone ou d'hydroquinone respectivement. Ces réductions sont catalysées par différentes réductases telles que la NADPH cytochrome P450 réductase, la cytochrome b5 réductase, la xanthine oxydase ou la xanthine déhydrogénase. En présence d'oxygène ou de peroxyde d'hydrogène, le radical semi-quinone est oxydé et perd cet électron pour produire des ERO telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle, et l'oxygène singulet (Fig. 3) (Vibet, 2008).

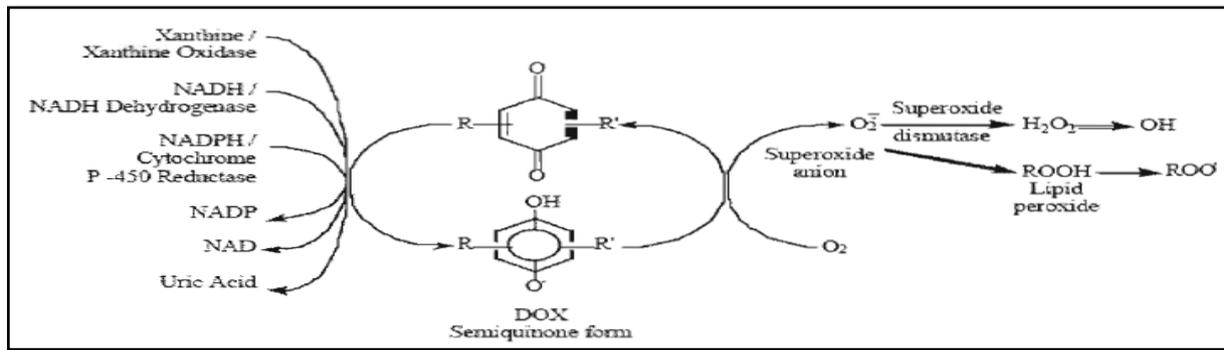


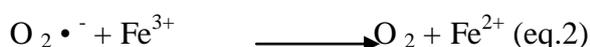
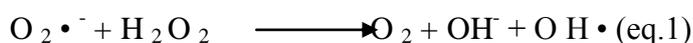
Figure 3. Différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la doxorubicine (Iarussi et al., 2001).

5.2. Voie non enzymatique

Le fer (Fe) est un élément crucial indispensable pour toutes les cellules vivantes, où il est essentiel pour catalyser la réduction de l'oxydation et la bioénergétique. Toutefois, à moins qu'il ne soit séquestré de manière appropriée, ce métal joue un rôle crucial dans la formation de ROS (Halliwell et al., 2007). Il y a deux principales voies par lesquelles le Fe peut favoriser la formation de ROS dans les cellules exposées à l'ANT: le premier mécanisme implique les réactions de Fenton et Haber-Weiss, tandis que le second implique la formation de complexes ANT-Fe. Comme montré dans la figure 4. (Šimunek et al., 2009)

La capacité de l'ANT aglycone à subir un cycle redox entraîne la formation de radicaux libres superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). La dismutation de ($O_2^{\bullet -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est catalysée par la superoxydedismutase (SOD), ou elle peut se produire spontanément. H_2O_2 est une molécule relativement stable de faible toxicité et, dans des conditions physiologiques, des quantités excessives sont éliminées par la catalase et la glutathion peroxydase. Cependant, H_2O_2 et ($O_2^{\bullet -}$) peuvent générer des radicaux hydroxyles hautement toxiques (OH^{\bullet}). Cela se produit pendant la réaction de Haber-Weiss (éq1).

Qui est très lente à moins catalysée par les métaux de transition, en particulier le Fe (Šimunek et al., 2009). La réaction de Haber-Weiss catalysée par le Fe peut être divisée en deux parties: dans la première étape, l'ion ferrique (Fe^{3+}) est réduit en ions ferreux (Fe^{2+}) par ($O_2^{\bullet -}$) (équation 2); Dans la deuxième étape, la réaction de Fenton (équation 3) se produit entre Fe^{2+} et H_2O_2 .



Le radical hydroxyle (OH) ainsi formé présente une demi-vie très courte et une réactivité extrêmement élevée. Cela rend le composé dangereux pour les cellules. Contrairement à ($O_2^{\bullet -}$) ou H_2O_2 , qui peuvent être facilement détoxifiés par des systèmes enzymatiques, $OH \bullet$ ne peut pas être éliminé par les enzymes. Au lieu de cela, $OH \bullet$ réagit avec tout composé oxydable dans son voisinage et donc il peut induire des dommages dans tous les types de macromolécules, y compris les lipides (peroxydation), les acides nucléiques (mutations) et les protéines (Halliwell et al., 2007; Šimunek et al., 2009).

A l'absence de cellule, l'ion ferrique Fe^{3+} se détache de ses sites de stockage et vient s'associer à trois molécules d'anthracycline. Pour former un complexe très stable : Fe^{3+} - (anthracycline). Ce complexe peut subir un cycle interne d'oxydoréduction, donnant naissance à un complexe radicalaire Fe^{2+} - (anthracycline). Ce dernier peut céder son électron supplémentaire à l'oxygène moléculaire et aboutir ainsi à la formation des radicaux d'anion superoxyde (Fig.4). (Minotti et al., 1999)

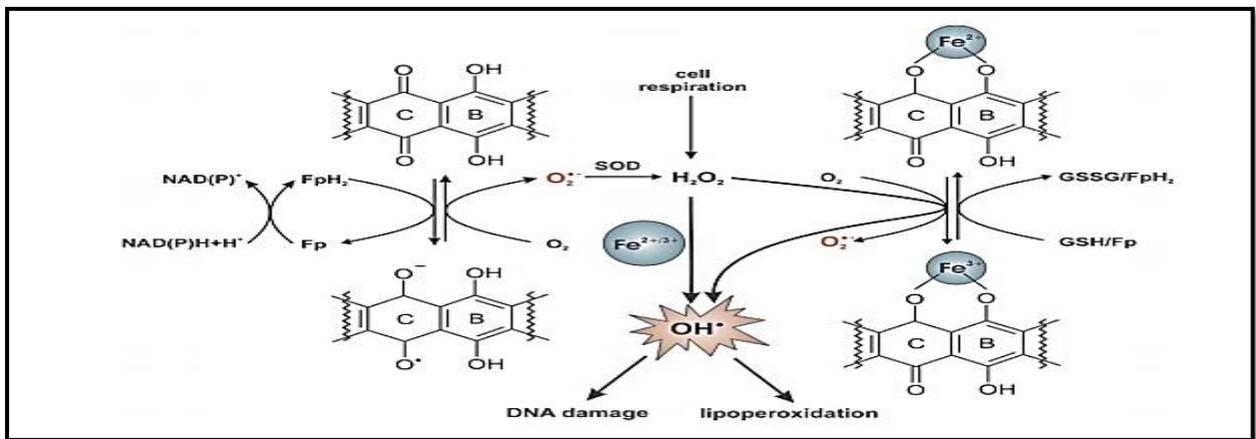


Figure 4. Mécanismes de formation de ROS par les anthracycline impliquant le fer (Šimunek et al., 2009)

Chapitre II. Le Docétaxel

Les taxanes est une famille d'agents antinéoplasiques découverte dans les années 1960 (Rowinsky et al., 1997 ; Roser et al., 2015). Ainsi, cette classe de diterpènes comprend environ 300 composants parmi lesquels figurent le paclitaxel (Taxol®) et le docétaxel (Taxotere®) qui sont largement prescrits comme agents antinéoplasiques pour de nombreux types de cancer (sein, poumon, foie, colon, prostate, estomac et cancer ovarien). Le principal mécanisme d'action de la classe des taxanes est l'inhibition de la fonction des microtubules essentiels pour la division cellulaire. Les taxanes jouent donc le rôle de poison du fuseau (Fauzee et al., 2011).

1. Présentation de la molécule

Le Docétaxel (DTX) (Fig.5) est un dérivé semi-synthétique de paclitaxel, il est commercialisé sous la dénomination commerciale : Taxotère® (Sanofi-Aventis, Paris, France) (Altintas et al., 2014 ; Roser et al., 2015). Le Docétaxel diffère du paclitaxel en deux positions de sa structure chimique. Il a un groupe fonctionnel hydroxyle sur le carbone 10, tandis que le paclitaxel a un ester d'acétate, et un ester tert-butylique de carbamate existant sur la chaîne latérale de phenylpropionate au lieu du benzamide dans le paclitaxel. Le changement fonctionnel des groupements au niveau du carbone 10 rend le Docetaxel plus hydrosoluble que le paclitaxel. Ce médicament dérivé de l'extrait des feuilles de l'if européen (*Taxusbaccata*), a été découvert dans les années 1980, breveté en 1986. Le Docétaxel a été approuvé pour la première fois en 1996 pour le cancer du sein localement avancé ou métastatique après échec de la chimiothérapie antérieure (Ringel et al., 1991 ; Kenmotsu et Tanigawara, 2015).

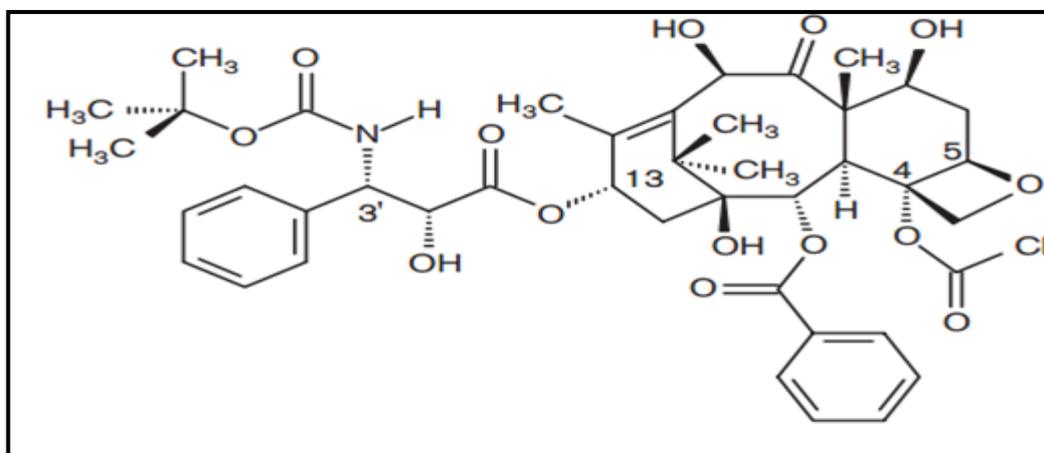


Figure5. Structure chimique de Docétaxel (Taxotère®) (Frederike et al., 2007).

2. Données pharmacocinétiques

2.1. Absorption : L'absorption gastro-intestinale du docétaxel est limitée. C'est parce que ABCB1 excrète directement le docétaxel dans la lumière intestinale ou la bile (Baker et *al.*, 2006 ; Nieuweboeret *al.*, 2015). De plus, la biodisponibilité du docétaxel est grandement réduite par l'effet du premier passage hépatique (Bardelmeijer et *al.*, 2002 ; Nieuweboeret *al.*, 2015)). Le Docetaxel est actuellement administré uniquement par voie intraveineuse (Rajni et *al.*, 2013). Le profil pharmacocinétique du Docétaxel est biphasique. A la dose de 100mg/m^2 , le profil est conforme au modèle pharmacocinétique à 3 compartiments, caractérisé par des demi-vies α , β et γ de 4 minutes, de 36 minutes et de 11,1 heures respectivement. La clairance corporelle totale s'établit à 21 l/h/m^2 (Gligrove, 2013).

2.2. Distribution : l'évolution des concentrations plasmatique montre une décroissance initialement rapide de la concentration du Docétaxel qu'elle est en rapport avec la distribution du médicament vers les compartiments périphériques et une décroissance terminale lente liée à un efflux plus lent du Docétaxel du compartiment périphérique. Le volume moyen de distribution à l'état d'équilibre s'établit à 113 L. Quatre-vingt-quinze pourcent du médicament se lie indépendamment de sa concentration aux protéines plasmatiques (α -1- glycoprotéineacide, albumine et lipoprotéines) (Bruno et *al.*, 1993 ; Gligrove, 2013).

2.3. Métabolisme: Le Docétaxel est métabolisé par les cytochromes hépatiques CYP3A4 et CYP3A5 et est transformé en quatre métabolites (Shou et *al.*, 1998 ; Nieuweboeret *al.*, 2015) (Fig.6). Le groupe méthyle de docétaxel est oxydé donnant un métabolite M2 à base d'alcool primaire. Une oxydation supplémentaire de M2 conduit à la formation de métabolites instables de l'alcool qui conduira à 2 Di-astéro-isomères (M1 et M3) et un métabolite cétone (M4) (Monegier et *al.* 1994 ; Nieuweboeret *al.*, 2015).

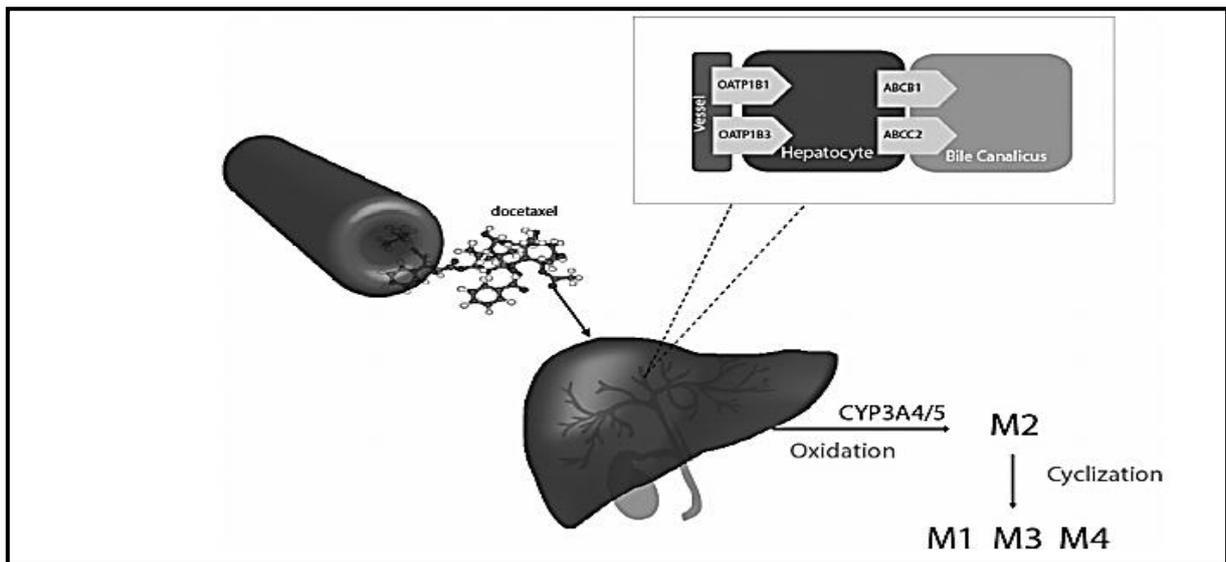


Figure 6. Métabolisme du Docétaxel et interactions protéiques (Nieuweboer et al., 2015).

2.4. Elimination : Le Docetaxel et ses métabolites sont principalement excrétés dans les intestins (Kenmotsu et Tanigawara, 2015), dans la bile via les transporteurs ABCB1 et ABCC2 (Huisman et al., 2005 ; Nieuweboer et al., 2015). Les cellules tumorales peuvent également exprimer l'ABCB1 qui provoquera l'efflux et la résistance au Docétaxel. Par conséquent, les études cliniques ont été conçues pour combiner les inhibiteurs de l'ABCB1 avec la thérapie au Docétaxel. Le docétaxel est excrété principalement dans les selles en tant que métabolites. Une étude sur ^{14}C -docetaxel a suggéré que 6% et 75% de la radioactivité administrée est excrétée dans l'urine et les selles respectivement (Kenmotsu et Tanigawara, 2015).

3. Mécanisme d'action

3.1. Interaction avec les microtubules

Le docétaxel agit sur les microtubules présents dans l'ensemble des cellules eucaryotes (Parent et al., 2013). Les microtubules sont constitués grâce à la polymérisation de tubuline; protéine structurelle des microtubules. Elle a une masse moléculaire d'environ 100 kDa et est composée de 2 sous-unités α et β de 50 kDa chacune qui ne diffèrent que par quelques acides aminés (5-10% de la chaîne). La tubuline est à l'origine de la dynamique des microtubules. Suivant sa concentration dans la cellule, elle va en diriger la polymérisation ou la dépolymérisation (Gligrove, 2013).

Le docétaxel est une molécule qui se fixe sur l'extrémité amino-terminale de la tubuline β . Ceci bloque la dépolymérisation du microtubule et entraîne la stabilisation de celui-ci (formation de microtubules stables mais non fonctionnels) (Fig.7). Le docétaxel favorise également la polymérisation des tubulines en microtubules qui se dispersent alors de manière anarchique dans

la cellule. Les chromosomes ne peuvent donc plus migrer à chaque pôle de la cellule, cela bloque la division cellulaire juste avant l'anaphase. La cellule étant bloquée, elle reçoit un message d'apoptose. Le docétaxel est donc un antimétabolite très puissant. Les cellules cancéreuses sont connues pour être sans cesse en division, le docétaxel va donc agir sur ces cellules en bloquant leur division et en entraînant leur mort (Parent et *al.*, 2013)

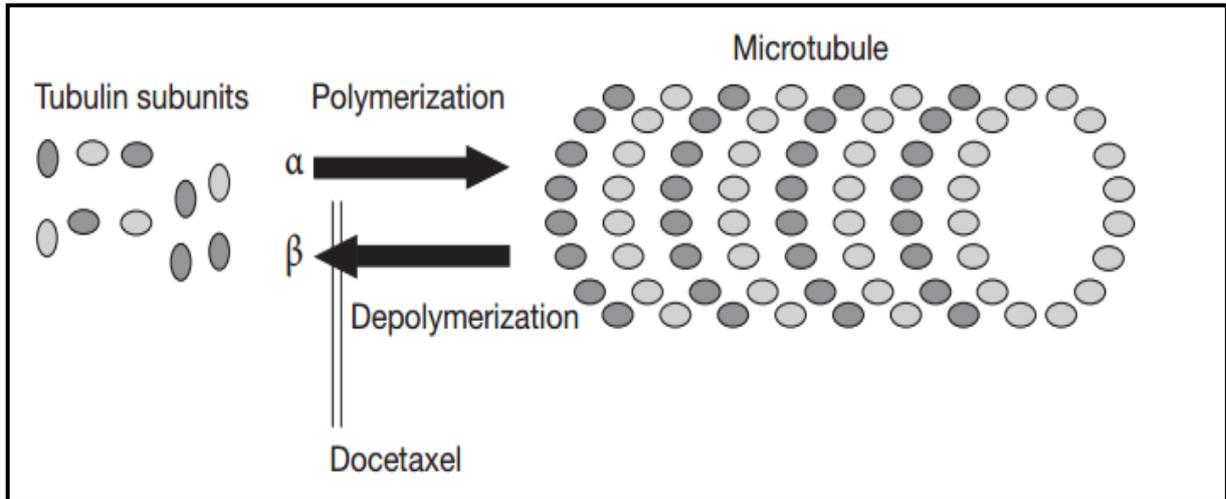


Figure 7. Mécanisme d'action du docétaxel (Mackler et Pienta, 2005)

3.2. Inhibition des Bcl-2

La stabilisation de la structure des microtubules par les taxanes entraîne une inactivation de la fonction des Bcl-2 par phosphorylation, ce qui l'empêche de se lier à Bax. L'augmentation du taux de Bax libre conduit à l'activation de la cascade de caspases conduisant à l'apoptose (Haldar et *al.*, 1996) (Fig. 8). On prétend que la Bcl-2 peut agir comme « gardien de l'intégrité des microtubules ». Il semble que le docétaxel induit la phosphorylation des Bcl-2 à des concentrations 100 fois inférieures à celles requises pour le paclitaxel (Haldar et *al.*, 1997 ; Kroon et *al.*, 2016).

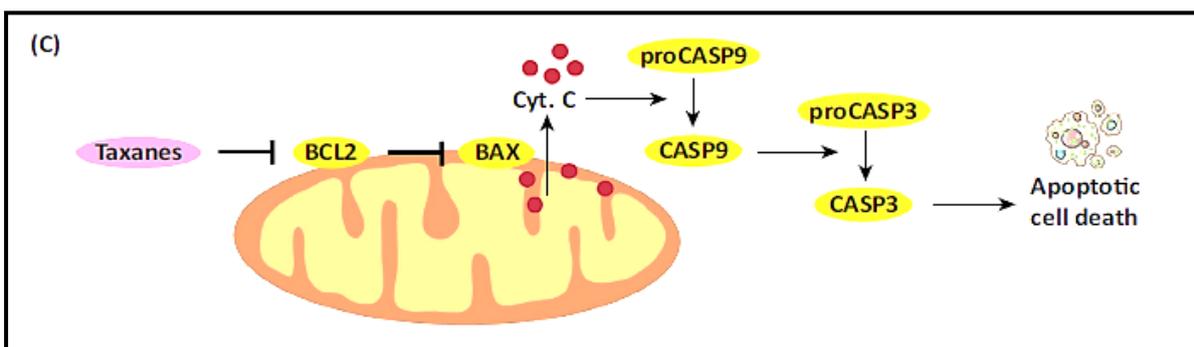


Figure 8. Les taxanes peuvent inhiber l'expression des Bcl-2 anti-apoptotique, Favorisant la mort cellulaire par apoptose (Kroon et *al.*, 2016)

Chapitre III. Toxicité rénale de l'Epirubicine et du Docétaxel

La toxicité rénale des anticancéreux peut être le résultat de modifications hémodynamiques, d'atteintes parenchymateuses et d'obstruction des voies excrétrices. Les anomalies rénales mineures de type altérations fonctionnelles tubulaires (anomalies acido-basiques et électrolytiques), anomalies du sédiment urinaire (hématurie), sont habituellement associées aux traitements anticancéreux (Vacher et *al.*, 2008).

1. Rappel physiologique du rein

La coupe frontale d'un rein permet de distinguer, sous une capsule fibreuse lisse, le parenchyme rénal, composé d'une partie corticale externe et d'une partie médullaire interne ; la partie médullaire est formée par les pyramides de Malpighi, dont la base s'appuie sur le cortex et le sommet pénètre dans la médullaire profonde (Fig.9). Le sommet des pyramides forme les papilles rénales qui sont percées de 15 à 20 orifices correspondant à l'ouverture des tubes collecteurs de Bellini dans les calices sous-jacents. La partie corticale s'étend de la capsule rénale aux bases des pyramides et entre les pyramides où elle forme alors les colonnes de Bertin. En périphérie, on trouve les corpuscules de Malpighi au niveau desquels prennent naissance les tubes urinaires.

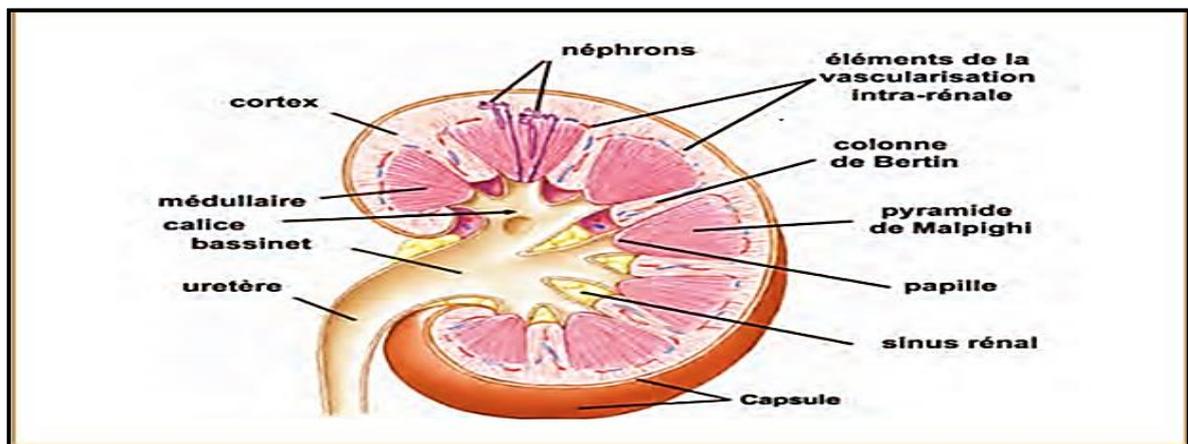


Figure 9. Coupe longitudinale d'un rein (Lacour, 2013)

L'élaboration de l'urine résulte du travail des néphrons ou unités fonctionnelles qui sont au nombre de 1 à 1,5 millions dans chaque rein et ne sont pas strictement identiques (hétérogénéité néphronique). Chacun de ces néphrons est composé de 2 parties, le corpuscule de Malpighi et le tubule urinaire, qui vont assurer les opérations de filtration, de réabsorption et de sécrétion qui conduisent à la formation de l'urine définitive (Silvarthon, 2007 ; Floege et *al.*, 2010 ; Lacour, 2013).

Les rôles essentiels du rein incluent l'excrétion des déchets métaboliques, le maintien de la composition du milieu intérieur et de l'équilibre des liquides et des électrolytes (Kristen *et al.*, 2012). Le rein assure également une fonction endocrine par la synthèse de la rénine et de l'érythropoïétine (Lacour, 2013).

2. Mécanismes de la toxicité rénale de Docétaxel

Le docétaxel est considéré comme moins néphrotoxique que les anticancéreux éliminés par voie rénale. Il présente une néphrotoxicité tubulaire dont le mécanisme n'a pas encore été clairement élucidé (Takimoto *et al.*, 2012 ; Fukasawa *et al.*, 2014).

Le stress oxydatif induit par le docétaxel favorise une large gamme de pathologies rénales, allant de l'insuffisance rénale aiguë, néphropathie obstructive, hyperlipidémie et lésions glomérulaires à une insuffisance rénale chronique avec hémodialyse et inflammation associée. Ainsi, des niveaux accrus de malondialdéhyde, produit final de peroxydation lipidique, ont été toujours associés aux dommages rénaux (Rodrigo et Bosco, 2006).

Certaines études ont montré que le docétaxel provoque un stress oxydant plasmatique chez l'rat (Tabaczar, 2013). Les travaux de Altıntaş *et al.* (2014) montrent aussi que le DTX entraîne une augmentation significative des niveaux des TBARS (substances réactives avec l'acide thiobarbiturique), même résultat obtenu par Starenkii *et al.* (2003) et Pieniazek *et al.* (2013).

Les niveaux d'antioxydants (SOD, CAT, GPx et GSH) ont été significativement diminués chez les rats traités par DTX (Tabaczar, 2013).

Hung *et al.* (2015) ont montré que le DTX augmente la production mitochondriale de ROS. Ces derniers conduisent à un dysfonctionnement mitochondrial en perturbant la chaîne de transport d'électrons et en altérant le potentiel membranaire mitochondrial, ceci conduit à la libération du cytochrome c, activation de la caspase 9 et d'autres événements pro-apoptotiques induisant l'apoptose (Hung *et al.*, 2015).

Les ROS libérés par le DTX peuvent jouer un rôle important dans l'inflammation tubulo-interstitielle associée à une néphropathie obstructive. Le glomérule est plus sensible au stress oxydatif que les autres segments du néphron (Rodrigo et Bosco, 2006). En clinique le docétaxel peut induire une néphrotoxicité tubulaire, même chez les patients ayant une fonction rénale normale (Fukasawa *et al.*, 2014).

Les taxanes sont connus essentiellement par leurs toxicités hématologique et neurologique (De Iuliis et *al.*, 2015; Kus et *al.*, 2016). La toxicité hématologique est due à une atteinte de la moëlle osseuse et peut conduire à une anémie, une neutropénie (Nieuweboer et *al.*, 2015 ;Ho et Makey ,2014) et une thrombopénie. Les réactions indésirables sévères les plus fréquentes liées au docétaxel sont l'asthénie, les réactions cutanées, rétention des liquides, réactions gastro-intestinales, réactions d'hypersensibilité, réactions neurosensorielles, stomatite et infections (Elm'hadi et *al.*, 2016)

3. Mécanismes de la toxicité rénale de l'épirubicine

Le stress oxydant, l'apoptose et l'inflammation sont considérées comme les mécanismes cruciaux impliqués dans la néphrotoxicité de l'EPI (Abdelraouf et *al.*, 2012 ; Lin et *al.*, 2010). L'épirubicine induit la production de ROS, réduit les niveaux d'antioxydants et perturbe les mécanismes de défense antioxydante dans les reins (Wu et *al.*,2017). Ces ROS ont été considérées comme ayant un rôle primordial dans la pathogenèse glomérulaire, tel que les néphropathies membranaires, insuffisance rénale aigue post-ischémique ou toxique et pyélonéphrite (Ichikhawa, 1994).

La toxicité cardiaque est beaucoup plus rare avec l'épirubicine qu'avec la doxorubicine, mais elle peut survenir également, mais à des doses plus importantes ; modifications électrocardiographiques avec ou sans insuffisance cardiaque congestive (Khasraw et *al.*, 2012). Il peut avoir des effets toxiques sur la moelle osseuse et l'intestin (Yeunget *al.*, 1989).L'épirubicine induit des lésions tubulaires rénales aiguë (Edit et *al.*, 2007).L'utilisation clinique de l'épirubicine est limitée par sa dose (Wu et *al.*, 2017).

4. Marqueurs de la toxicité rénale

Les marqueurs biologiques de la néphrotoxicité peuvent être en relation avec l'étiologie de l'insuffisance rénale et avec les mécanismes impliqués dans la pathogénèse du processus morbide. Les lésions induites par des produits toxiques peuvent se produire au niveau des cellules du glomérule, de l'interstitium ou des tubules, avec une libération de marqueurs correspondants au niveau lésé (Stellman, 2000).

4.1. Les marqueurs biologiques sanguins

4.1.1. Le débit de filtration glomérulaire (DFG)

Le DFG correspond au volume d'ultrafiltrat glomérulaire formé par unité de temps(Hougardy et *al.*,2014). Une mesure précise de la filtration glomérulaire n'est possible qu'en recourant à des

substances exogènes, non métabolisables, éliminées exclusivement par filtration glomérulaire. Le calcul de la clairance de ces substances à élimination exclusivement rénale permet une mesure précise du DFG.(Frey et *al.*,2001).

4.1.2. La créatinine

La créatinine sérique (CrS)est un produit de dégradation de la créatine, elle est librement filtrée par les glomérules mais elle est peu sécrétée ou réabsorbée par les tubules rénaux. La concentration de créatinine plasmatique est relativement stable au cours du temps chez un individu donné, et reflète un équilibre (production/élimination), caractéristique de l'homéostasie du milieu intérieur. La créatinine n'est pas toxique, mais son élévation reflète une accumulation de toxines urémiques potentiellement dangereuse(Waikar et *al.*,2009).

4.1.3. L'urée

L'urée est un très mauvais marqueur de la fonction rénale (Dussol,2011). C'est le composé azoté le plus abondant de l'urine, elle est complètement filtrée par le glomérule et réabsorbé partiellement au niveau du tubule rénal de façon inversement proportionnelle au débit urinaire (Frey et *al.*,2001).

4.1.4. L'acide urique

L'acide urique provient de la dégradation des purines, mais il peut aussi être synthétisé directement à partir du 5-phosphoribosyl pyrophosphate et de la glutamine. Chez l'humain, l'acide urique est excrété dans l'urine. L'acide urique est filtré, réabsorbé et sécrété dans le rein (Ganong, 2003).

4.1.5. La cystatine C

Cystatine C La cystatine C (Cys C) est une protéine basique non glycosylée de faible masse moléculaire (13,3 k Da). Elle fait partie de la superfamille des inhibiteurs de cystéine protéases et est produite de façon constante par toutes les cellules nucléées. Sa faible masse moléculaire et sa charge nette positive lui permettent d'être librement filtrée au niveau glomérulaire. Chez l'individu dont le DFG est normal, la demi-vie plasmatique de la Cys est d'environ 2 heures. Sa concentration plasmatique est donc très faible ; comme pour la créatinine, elle augmente dans le plasma en cas d'insuffisance rénale glomérulaire(Shlipak et *al.*, 2006 ;Vaidya *etal.*,2008). Elle augmente dans le plasma en cas d'insuffisance rénale glomérulaire.

4.2. Les marqueurs biologiques urinaires

4.2.1. Protéinurie

La protéinurie est définie comme pathologique lorsque l'excrétion urinaire de protéines est supérieure à 300 mg/j. La présence d'une protéinurie supérieure à 300 mg/j peut être révélateur précoce d'une pathologie rénale. la protéinurie constitue le principal facteur déterminant la progression de la maladie rénale avec une relation linéaire entre la vitesse de décroissance de la filtration glomérulaire et le degré de protéinurie. Elle constitue donc à la fois un symptôme d'alerte de maladie rénale, le principal marqueur de gravité et un déterminant causal de la progression (Isaza et *al.*, 2012).

4.2.2. Enzymurie (γ -Glutamyltranspeptidase)

La gamma-glutamyl transférase est une glycoprotéine membranaire qui catalyse le transfert de résidus de gamma glutamyl du glutathion. Elle se trouve dans le rein, dans, la rate, l'intestin et en quantité moindre dans le cœur, le foie et le cerveau. L'augmentation précoce de leur excrétion urinaire et leur dosage simple en font de bons marqueurs prédictifs d'atteinte rénale aiguë (Haschek et *al.*, 2010).

4.3. Autres marqueurs

Selon le type d'atteinte rénale on observe également d'autres perturbations biochimiques : hyperphosphatémie reflétant la baisse du débit de filtration glomérulaire, hyperkaliémie, troubles de la calcémie, de la phosphatémie, hyponatrémie et hypochlorémie dues aux lésions tubulaires, hypoprotéinémie et hypoalbuminémie lors des lésions glomérulaires (Haschek et *al.*, 2010).

Chapitre IV : La propolis comme source de polyphénols

1. La Propolis

1.1. Historique et définition

La propolis est une substance résineuse, visqueuse et gommeuse recueillie par les abeilles ouvrières à partir des bourgeons et des exsudats des plantes, les enzymes d'abeille, le pollen et la cire (Sahinler et Kaftanoglu, 2012; José et Sforcin., 2016). Les meilleures sources de propolis sont les espèces de peuplier, de saule, de bouleau, de l'orme, de l'aulne et de la conifère (Kuropatnicki et al., 2013).

La propolis n'est pas une nouvelle découverte. Elle existe depuis l'abeille est apparue sur la terre. L'usage de propolis remonte à l'antiquité, au moins à 300 av. J.-C., où il était utilisé dans la médecine populaire et d'autres activités à travers le monde. Ce produit naturel est utilisé par les Égyptiens pour effectuer la modification des cadavres et prévenir la propagation des infections. Les grecs et les médecins romains ont également reconnu le potentiel de la propolis en l'employant dans le traitement des plaies, antiseptique et cicatrisant, et comme désinfectant pour la bouche. Les Perses ont décrit la propolis comme une drogue capable d'agir contre les eczémas, les myalgies et les rhumatismes. De nos jours la propolis est largement utilisée comme composant dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques. Elle est également utilisée dans certains aliments et boissons (Silva-Carvalho et al., 2015).

1.2. Propriétés physicochimiques

La propolis est une substance de consistance solide qui devient friable en dessous de 15°C. Elle deviendra gluante à température élevée, elle a un goût typique pimenté et brûlant, sa palette de couleur est voisine de celle du miel et du pollen, du jaune au noir en passant par l'orange, le brun, le vert et parfois par une teinte violacée ; ces multiples teintes s'expliquent par les nombreux pigments qui entrent dans sa composition (Laurent, 2014).

La propolis est insoluble dans l'eau froide et soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme etc. Sa densité est de 1.2 et son point de fusion se situe autour de 70°C, chauffée au bain-marie, elle se divise en une partie visqueuse et un autre liquide c'est la cire de propolis (El housseini, 2013).

1.3. Composition

L'origine botanique de la propolis constitue le principal facteur responsable de sa composition spécifique.

Les autres facteurs sont les modifications générées à travers les sécrétions hypo-pharyngiennes de l'abeille qui vont apporter d'autres éléments spécifiques en plus de certaines transformations (hydrolyse des hétérosides de flavonoïdes en aglycone)(Cardinault et *al.*, 2012). On connaît actuellement plus de 300 composé de la propolis dont les constituants bioactifs essentiels sont : les composés phénoliques, les flavonoïdes et les terpènes (Tableau 1) (Lahouel et *al.*, 2010; El housseini, 2013; Veloz et *al.*, 2015).

Tableau 1. Composition chimique de la propolis brute (El housseini, 2013).

Composition en ordre	Composition par groupes	Quantité
Résines et baumes	Flavonoïdes, acides phénoliques+ esters	45—55%
Cire et acides gras	La cire d'abeille et des plantes	25-35%
Huiles essentielles	Anéthol et eugénol +++	10%
Pollen	Protéines (6acides aminées libres>1%) Arginine et proline jusqu'à 45%du total	5%
Autre composés organique et substances minérales diverses	Cétones, lactones, quinones, stéroïdes, acide benzoïque, vitamines/Sucres : 14 traces de minéraux, silice et zinc sont les plus connus	5%

1.4. Propriétés thérapeutiques

Depuis une cinquantaine d'années, la littérature scientifique a rapporté et confirmé un bon nombre d'activités thérapeutique de la propolis qui sont en rapport avec la composition chimique(Cardinault et *al.*,2012). Il a été démontré que la propolis et ses constituent ont un effet antibactériennes, antiviraux, anti-inflammatoires, et antifongiques(Debab et *al.*, 2016).La propolis est aussi une substance aux propriétés : immunomodulateurs(Villanueva, 2015), antihypertenseurs(Teles et *al.*,2015), cicatrisantes(Bolouri *etal.*,2015), antidiabétiques et antiprotozoaires(Wagh,2013).

De plus, la propolis montre un effet préventif contre les neutropénies, anémies et thrombopénies consécutives aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie (Cardinault et *al.*,2012).Des résultats similaires ont montré l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité des médicaments anticancéreux (Lahouel et *al.*, 2004). Ces effets passent en partie par les propriétés antioxydantes de la propolis qui protègent les cellules, contribuent au mécanisme de réparation de l'ADN et au renforcement des mécanismes de défense endogène (El-Sayed et *al.*, 2009).

1.5. Toxicité

La toxicité de la propolis est très faible. Chez le rat, la DL_{50} d'un extrait concentré de propolis a été évaluée à 15 g/kg. Une saisine de l'Afssa rapporte que la dose la plus élevée sans effets indésirables 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). Il peut exister cependant des cas d'allergies de contact avec un allergène bien identifié : le 3,3-diméthylallyl caffeate (Gardana et *al.*, 2011).

2. Les polyphénols

2.1. Définition

Les polyphénols, constituent un grand groupe de métabolites secondaires hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3 000 Dalton (Chira et *al.*, 2008) dont l'élément structurel de base est un noyau benzéique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (ether méthylique, ester, sucre ...) (Bruneton, 2009). Ils sont exprimés de façon ubiquitaire dans les plantes (Fantini et *al.*, 2015), et sont très répandus dans les fruits, les légumes, les graines, les céréales, les huiles, etc (Pérez-Jiménez et *al.*, 2010 ; Lakey-Bietia et *al.*, 2015).

Les polyphénols jouent divers rôles dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes (Fantini et *al.*, 2015 ; Goszcr et *al.*, 2017) et l'attraction des insectes (Ignat et *al.*, 2011 ; Lakey-Beitia et *al.*, 2015) Ils présentent de nombreuses activités: antioxydantes, anti-inflammatoires (Goszret *al.*, 2017), anticancéreuses (Fantini et *al.*, 2015), anti-microbiennes, anti-virales et immuno-modulatrices (Tsao, 2015).

2.2. Biosynthèse des polyphénols

Les composés phénoliques sont principalement synthétisés à partir des hydrates de carbone *via* la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate (Chira et *al.*, 2008), celles de l'acide shikimique conduisant des oses aux amino-acides aromatique (phénylalanines, la tyrosine) puis, par désamination de se derniers, aux acides cinnamiques et ces dérivés acides benzéiques, acétophénones, coumarines, etc.

L'autre voie part de l'acétate et conduit à des poly- β -cétostère de longueur variable les poly-acétates qui engendrent, par cyclisation, des composés souvent polycycliques :chromones ,isocoumarines, orcinolés, depsides, depsidones, xanthonés, quinones, etc , avec possibilité d'une

participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration des composés d'origines mixte (flavonoïdes, stilbéne, pyrones, xanthones, etc) (Fig.10) (Bruneton,2009).

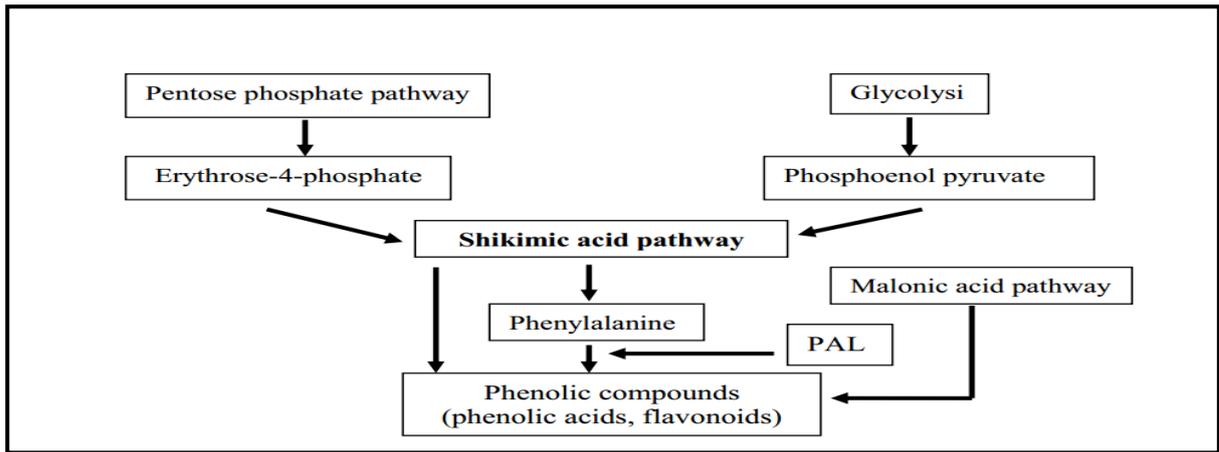


Figure10. Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols(Ghasemzadeh etGhasemzadeh, 2011).

2.3. Classification

Les polyphénols sont classés en fonction du nombre d'anneaux phénoliques qu'ils contiennent et des éléments structuraux qui les lient entre eux. Ils sont regroupés en deux catégories principales : les flavonoïdes et les composés non flavonoïdes. Les composés flavonoïdes sont classés en deux groupes : les anthoxanthines (flavonol, flavanol, isoflavonoïdes, flavone et flavanone) et les anthocyanines, tandis que les composés non flavonoïdes comprennent les acides phénoliques, stilbènes, curcuminoïdes, lignanes et tanins (Fig. 11) (Lakey-Beitiaet *al.*,2015).

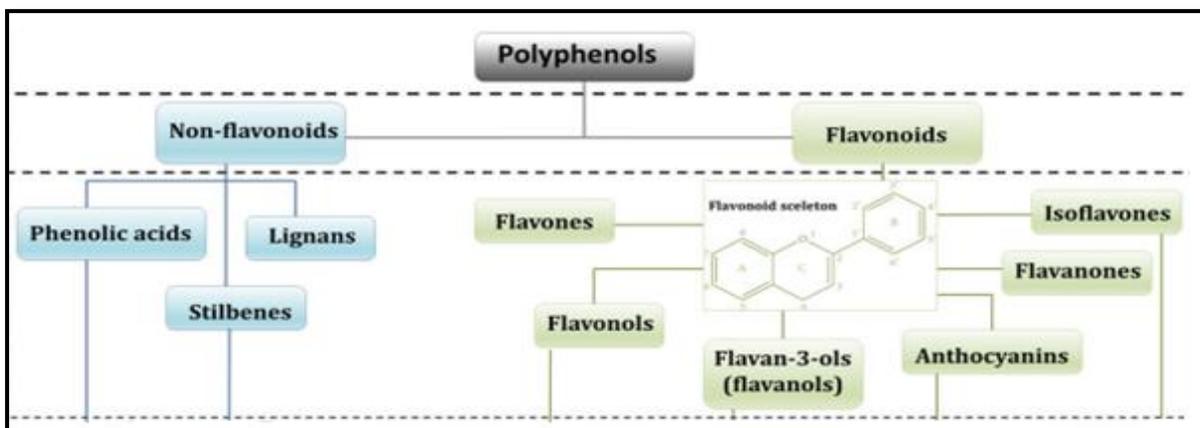


Figure 11. Classification des polyphénols (Goszcret *al.* , 2017)

Les flavonoïdes sont le plus grand groupe de polyphénols, avec plus de 5 000 composés largement distribués dans les planteset dans la propolis(Lakey-Beitia et *al.*,2014). Leur structure de base

se compose de deux anneaux aromatiques reliés par un anneau intermédiaire de pyrane (Fig.12). Ils peuvent être classés selon la nature des différents substituants présents sur les cycles de la molécule et du degré de saturation du squelette benzo- γ -pyrone en : flavones, flavonols, flavanols, isoflavonoïdes, flavanones et anthocyanines (Ghedira,2005; Vauzour,2012;Lakey-Beitia et *al.*,2015).

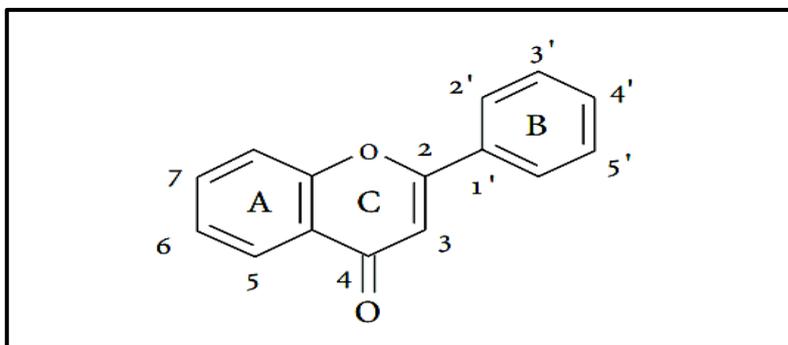


Figure 12. Structures de l'enchaînement benzo- γ -pyrone des flavonoïdes (Ghedira, 2005).

2.4. Pharmacocinétique

Les concentrations en composés phénoliques dans la circulation sanguine dépendent de leur métabolisme et de leur absorption depuis le tractus gastro-intestinal. Il semble que la voie métabolique subie par ces composés soit identique à la voie métabolisant d'autres xénobiotiques. Les polyphénols sont présents dans notre alimentation sous plusieurs formes. Cette particularité va leur conférer des métabolismes différents. Les formes libres (aglycones) peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle (Hollman et *al.*, 1997; Hollman and Katan, 1998 ;kebieche, 2009) tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées, sous l'influence des glycosidases, par la flore intestinale au niveau du côlon avant d'être absorbées (Manach et *al.*, 1995; Manach et *al.*, 2004). Cependant les formes libres issues de cette hydrolyse peuvent également être dégradées par la microflore en acide phénolique, lui-même absorbé ou éliminé via les fèces (Williams et *al.*, 2004).

Les principaux sites de métabolisme sont la flore intestinale et le foie (Haslam, 1998). Les métabolites, glucuro- et sulfoconjugués des flavonoïdes absorbés sont éliminés principalement par la bile, l'excrétion urinaire ne représentant que 3 à 6 % de l'élimination. En effet, les flavonoïdes sont transformés, dans l'entérocyte, en flavonoïdes conjugués par méthylation, sulfatation, glucuronidation. Une partie de ces flavonoïdes est déversée dans le sang tandis qu'une autre est destinée vers la lumière intestinale ce qui constitue l'un des mécanismes de contrôle de l'absorption intestinale de ces substances phénoliques (Gee et *al.*, 2000; Crespy et *al.*, 2004).

Dans le sang, les *flavonoïdes* ne sont pas présents sous leur forme native car ils ont été transformés, à cause de leur transformation au niveau du foie et de la cellule intestinale. La fraction des *flavonoïdes* conjugués destinée finalement vers les tissus pourrait avoir un effet biologique potentiel ou serait éliminée dans les urines. Cependant, d'autres flavonoïdes conjugués pourraient être déversés dans l'intestin via la bile et y être hydrolysés par les enzymes de la flore intestinale libérant ainsi de nouveaux aglycones en constituant probablement un recyclage entéro-hépatique des flavonoïdes qui permet le maintien d'une concentration non négligeable dans le sang (Manach *et al.*, 1995; Rechner *et al.*, 2000 ;kebieche, 2009).

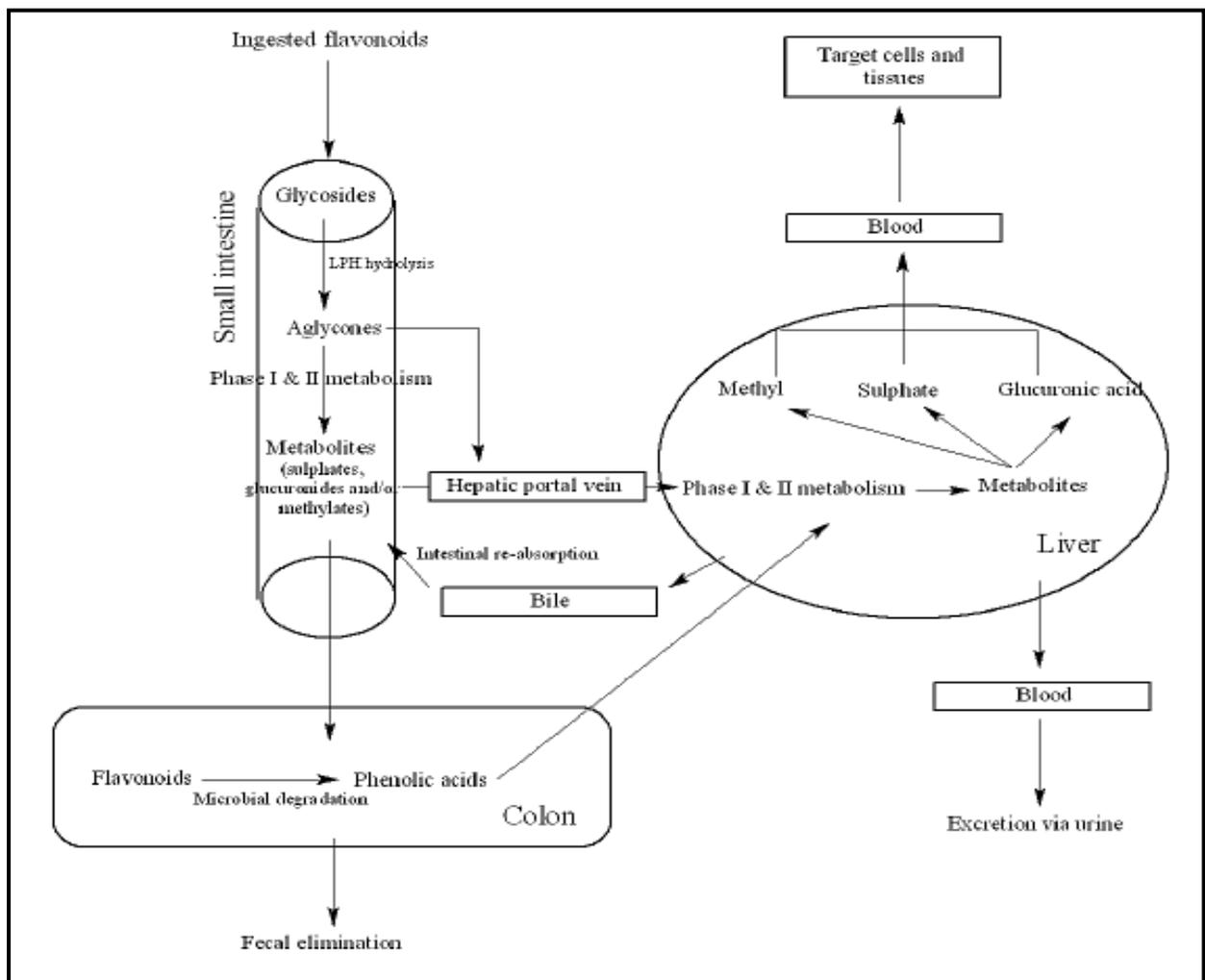


Figure 13. Métabolisme des flavonoïdes humains (Surangi *et al.*, 2013)

2.5. Activité anti-oxydante des polyphénols et relation Structure-Activité

La structure chimique des polyphénols comprend deux anneaux phénoliques ou plus avec des groupements hydroxyles en positions ortho ou para, qui sont nécessaires pour les réactions redox. Il existe une corrélation positive directe entre la capacité antioxydante et le nombre de

groupes hydroxyles présents dans la structure des polyphénols ;c-a-d une augmentation du nombre de groupes hydroxyles dans la structure chimique est associée à une augmentation du potentiel redox et de l'activité antioxydante(Lakey-Beitiaet *al.*,2014).

Les flavonoïdes expriment les propriétés anti-oxydantes par : le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), la suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques impliqués dans leur production, et enfin la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme(Pietta,2000).

2.5.1. Piégeage des radicaux libres

La propriété des flavonoïdes là mieux décrite est leur capacité à piéger les radicaux libres: radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), anions superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) et radicaux peroxy lipidiques(Ghedira,2005). L'antioxydant cède un radical hydrogène, qui peut être un transfert d'électrons suivi, plus ou moins rapidement, par un transfert de proton, pour donner un radical intermédiaire (Fig. 15). Il est stabilisé par ses structures mésomères conjuguées (Porters,2008).

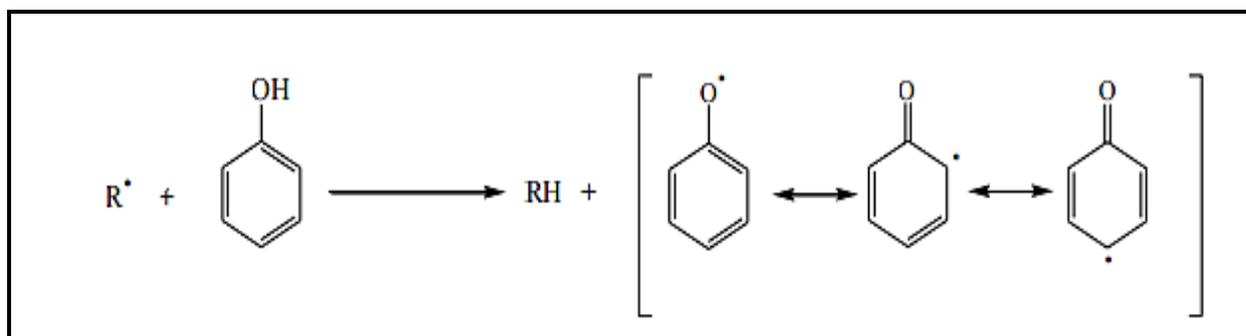


Figure14. Mécanisme d'action des antioxydants phénoliques(Porters, 2008).

Les caractéristiques structurales des flavonoïdes nécessaires pour un piégeage efficace des radicaux sont:

- i) Une structure ortho-dihydroxy (catechol) dans le cycle B. ils possèdent la propriété de donner d'électrons.
- ii) La double liaison 2,3 dans la conjugaison avec une fonction 4-oxopour la délocalisation des électrons
- iii) Groupement hydroxyle aux positions 3 et 5 (Fig. 16)

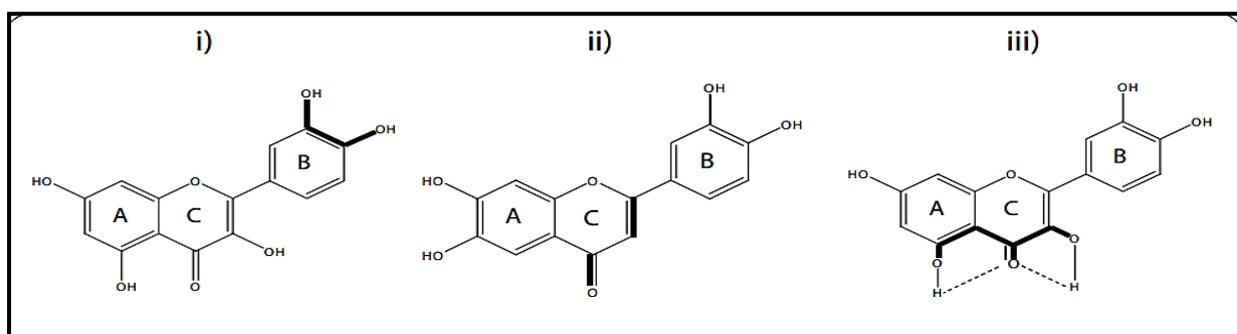


Figure 15. i) Structure ortho-dihydroxy (catechol) dans le cycle B, ii) liaison 2,3-double en conjugaison avec la fonction 4-oxo, iii) groupes hydroxyle aux positions 3 et 5 (Horakova., 2011).

Le nombre de groupements hydroxyles du cycle B augmente l'activité de piégeage des ROS. La présence d'un sucre lié à l'aglycone diminue l'activité anti-oxydante des groupements hydroxyles voisines (Kebsa, 2006).

2.5.2. Chélation des métaux

Les flavonoïdes sont de bons chélateurs des ions métalliques, comme les ions du fer et du cuivre, dont l'excès est responsable de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène. Les sites de liaison des métaux traces dans la molécule de flavonoïde sont : le noyau catéchol du cycle B, les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du noyau hétérocyclique C, et les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle des cycles C et A (figure 17) (Pietta, 2000).

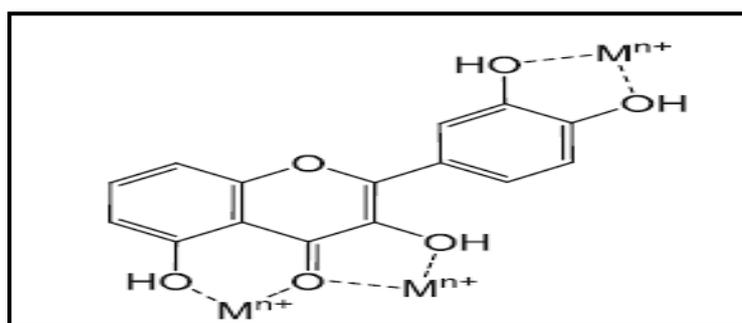


Figure 16. Sites du flavonoïde proposés pour la chélation des ions métalliques (Pietta, 2000).

2.5.3. Inhibition enzymatique

Les flavonoïdes inhibent les enzymes responsables de la production de l'anion superoxyde, comme la xanthine oxydase et la protéine kinase C. Ils inhibent la cyclooxygénase, lipoxygénase, succinate-oxydase microsomale, l'oxyde nitrique synthase (NOS) et la NADH oxydase (Procházková et al., 2011).

Partie II. Matériel et Méthodes

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de toxicologie cellulaire et moléculaire, à l'université de Jijel, il est consacré à l'évaluation *in vivo* de la toxicité rénale de l'association (Docétaxel -Epirubicine) et l'effet cytoprotecteur de la propolis sur cette association toxique.

Epirubicine est un médicament anticancéreux appartenant à la famille des anthracyclines. Chaque flacon de 25 ml de solution contient 50 mg de chlorhydrate d'épirubicine, il est administré se forme de solution injectable avec une dose de 200mg/m², l'EPI est fabriqué par le laboratoire de Thymoorgan Pharmazie GmbH .

Docétaxel est un médicament anticancéreux. Il est commercialisé sous la dénomination commerciale : Taxotère® sous forme de poudre blanche à une pureté plus de 97%. Le produit chimique est préparé dans l'eau physiologique (véhicule), il est administré se forme de solution injectable avec une dose de 75mg/m² et il est fabriqué par le laboratoire de Fluka.

La propolis utilisée dans cette étude provient de Jijel (Kaous), elle nous a été fournie sous forme lyophilisée, il a été administré à une dose de 25 mg/kg .

1. Etude phytochimique de la propolis

1.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode 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 phénoliques conduit à la formation d'un complexe coloré en bleu dont l'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des polyphénols dans l'extrait. Pour le dosage 500µl de l'extrait dilué en 1/100^{ème}, sont ajoutés à 2.25ml d'eau distillée et 250 µl du réactif de folin-ciocalteu (5%). Après 5 mn de repos, 2ml de Na₂CO₃ (bicarbonate de sodium) (7.5%) ont été additionnés, le mélange est ensuite incubé pendant 60mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin la densité optique (DO) est lue à 760nm (Spectrophotomètre UV-Visible UV-mini 1240, SHIMADZU, China).

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

1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Selon Dewanto et *al.* (2002), le dosage des flavonoïdes se fait par la méthode colorimétrique basée sur la formation d'un complexe jaune entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium. 250 µl de

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

Avec:

I : pourcentage de réduction du DPPH°.

A_B : Absorbance du control négatif.

A_A : absorbance de l'échantillon.

2. Etude *in vivo*

2.1. Entretien et traitement des animaux

Les rats utilisés dans ce travail sont des rats males sains de souche *Wistar albinos*, pesant chacun entre 140 et 220 g, fournis par l'Institut Pasteur d'Alger. Les rats sont maintenus dans l'animalerie de l'Université de Jijel dans des conditions standards ; une température ambiante de 22 ° C, une humidité relative de 60% .

Les animaux sont placés dans des cages en plastique. Ils ont un accès libre à la nourriture et à l'eau. Pour l'étude *in vivo*, les animaux ont été répartis en 3 lots de 6 rats chacun :

Lots 1 (Témoin) : Les rats reçoivent 1 ml de l'eau physiologique par voie orale pendant 5 jours. Le 6^{ème} jour, ils reçoivent 0.5 ml de l'eau physiologique par voie IV.

Lots 2 (EPI-DTX) : les rats reçoivent 1ml de l'eau physiologique par voie orale pendant 5 jours. Le 6^{ème} jour, ils reçoivent 0.5ml de l'association des médicaments anticancéreux (EPI à 200mg/m²) et (DTX à 75mg/ m²) par voie IV.

Lots 3 (EEP+ (EPI-DTX)) : les rats reçoivent 1ml de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) par voie orale à la dose de 25mg/kg pendant 5 jours. Le 6^{ème} jour, ils reçoivent 0.5ml de l'association des médicaments anticancéreux (EPI à 200mg/m²) et (DTX à 75mg/ m²).

2.2. Prélèvement des échantillons biologiques

2.2.1. Prélèvement de sang

Après le traitement, nous avons réalisés des prélèvements sanguins à des intervalles de temps régulier 24h, 14j et 21jours. Les prélèvements sanguins des rats de chaque groupe sont effectués au niveau de l'œil à partir de sinus rétro-orbitale dans des tubes héparinés à l'aide d'un tube capillaire, ensuite le sang est centrifugé à 4000 tours/mn pendant 15min (centrifugeuse SIGMA 3-16PK), puis le sérum récupéré est recueilli dans des tubes eppendorff, et congelé à -20°C pour les analyses biochimiques.

2.2.2. Collecte d'urine

Pour la collecte d'urine, nous avons placé les rats dans des cages métaboliques (cage à diurèse) pendant 24 h après l'injection des médicaments et la veille des prélèvements sanguins aux intervalles : 24h, 14j et 21 jours pour récupérer chaque fois les urines des 24heures pour la mesure la créatininurie, l'activité de la γ -glutamyl transpeptidase et pour faire la chimie des urines.

2.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du rein

A la fin des délais du traitement les animaux sont sacrifiés suite à une anesthésie à l'éther, ensuite les reins sont soigneusement prélevés, rincés dans une solution de chlorure de sodium, puis pesés. L'un est congelé à (-20 °C) pour les dosages tissulaires des paramètres de stress oxydatif (MDA, GSH, SOD, CAT, GST) et l'autre est fixé dans la solution de formol tamponné pour l'étude histologique.

2.3. Dosage des paramètres biochimiques

2.3.1. Chimie des urines

Pour le contrôle urinaire, nous avons utilisé des bandelettes urinaires qui permettent de rechercher dans l'urine la présence qualitative et/ou semi-quantitative de différents paramètres tels que les leucocytes, les nitrites, le pH, les protéines, le glucose, les corps cétoniques, l'urobilinogène, la bilirubine, les érythrocytes (ou le sang) et la densité.

2.3.2. Dosage de la créatinine (plasmatique et urinaire) et sa clairance

La créatinine sérique est dosée par une méthode colorimétrique de Jaffe (Bonsnes and Tausky, 1945) basée sur la réaction de l'acide picrique avec la créatinine en milieu basique formant un complexe coloré rougeâtre.



L'intensité de la coloration, directement proportionnelle à la concentration de créatinine dans l'échantillon, est mesurée à l'aide du spectrophotomètre à 492 nm, la créatininémie est exprimée en mg/l.

La clairance C d'une substance est le volume de plasma épuré de cette substance par unité de temps, ainsi lorsqu'une substance est librement filtrée et éliminé exclusivement par le rein la clairance est égale au débit de filtration glomérulaire (Bagshow et Bellemo., 2007).

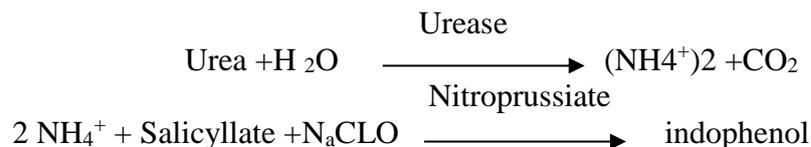
Le dosage de la quantité de créatinine excrétée, demande une collecte d'urine de 24 heures. La quantité totale de créatinine dosée peut être mise en relation avec la concentration plasmatique et le temps de collecte, ce qui donne le volume de sang épuré de créatinine par unité de temps :

Clairance de la créatinine ml/min = Créatinurie (mg/l X Volume urinaire (ml)/Créatininémie (mg/l) X la durée de collecte (min).

2.3.3. Détermination du taux plasmatique d'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique selon la fiche technique du un kit Spinreact (Espagne).

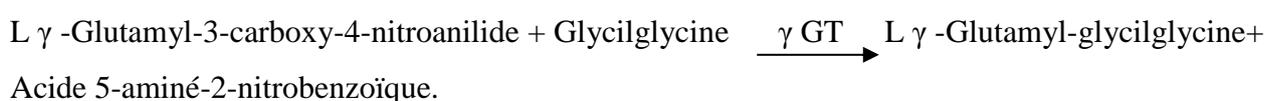
L'urée dans l'échantillon est hydrolysée par l'uréase en ammonium (NH₄⁺) et en Dioxyde de carbone (CO₂). Dans un milieu alcalin, les ions ammonium réagissent avec le salicylate et l'hypochlorite en présence de nitroprussiate pour former un indophénol coloré en vert selon les réactions ci -dessous :



L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration de l'urée dans l'échantillon.

2.3.4. Mesure de l'activité enzymatique de la γ -glutamyl transpeptidase urinaire

La gamma-glutamyl transférase (γ GT) est une enzyme qui est présente dans quasiment tous les tissus de l'organisme, elle apparaît notamment dans le foie, le pancréas, les reins et la prostate. La détermination des niveaux de gamma-glutamyl transférase (γ GT) est la méthode la plus utile pour diagnostiquer et traiter les maladies hépatobiliaires telles que l'obstruction hépatique, la cirrhose ou les tumeurs hépatiques. La gamma-glutamyl transférase (γ GT) catalyse le transfert d'un groupe γ -glutamyl de la γ -glutamyl-p-nitroanilide au dipeptide accepteur glycylglycine, d'après la réaction suivante :



Le dosage de la γ -glutamyl transpeptidase a été réalisé par la méthode cinétique selon la fiche technique du Kit Spinréact (Espagne).

2.4. Dosages tissulaires

2.4.1. Préparation de la fraction cytosolique

Nous avons préparé la fraction cytosolique selon la méthode décrit par (Iqbal *et al.*, 2003). Pour cela, 0.5 g du rein sont coupés et homogénéisés avec trois volumes de tampon phosphate (0,1 M à pH 7,4) contenant du KCl 1,17 % à l'aide du broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à 2000 tours pendant 15 min à 4°C pour éliminer les débris nucléaires ; le surnageant est ensuite centrifugé à 9 600 tour/min) pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant final est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques.

2.4.2. Dosage des protéines

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

Pour cela, 1ml de Bleu de Coomassie a été ajouté à 25µl de l'échantillon dilués à 1/10^{ème}. Ensuite le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min et la DO a été lue à 590nm. La concentration en protéines a été déterminée à partir d'une gamme étalon réalisé dans les mêmes conditions avec de l'albumine sérique bovine (BSA) aux concentrations (0-1mg/ml).

2.4.3. Dosage du MDA cytosolique

Le dosage de malondialdéhyde (MDA) a été réalisé selon la méthode décrit par Okhawa *et al.*, (1979). Le principe de ce dosage est le suivant : le MDA réagit avec deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) dans un milieu acide (pH 2 à 3) et à chaud 100°C pour donner un pigment coloré en rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n- butanol.

A 0.5ml de la fraction cytosolique nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA 0.67%). Ensuite le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-Butanol. Après le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 rpm, enfin la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm.

Le taux du MDA est exprimé en n moles/g de protéines et elles sont déduits à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions par utilisation d'une solution du tétra-etoxypropane (TEP) qui donne après leur hydrolyse du MDA.

2.4.4. Dosage du glutathion (GSH)

Pour le dosage du GSH, nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) utilisant le réactif DTNB. Le principe de la réaction consiste en l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412nm selon la réaction suivant :



Pour cela 50 µL du la fraction cytosolique sont diluées dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH=8). 20µl du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution, Après 15 min d'incubation nous avons effectués la lecture de la densité optique à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage. Les résultats sont exprimés en m moles/mg de protéines.

2.4.5. Evaluation de l'activité des enzymes anti-oxydantes

2.4.5.1. Mesure de l'Activité enzymatique de GST

L'activité enzymatique de GST est déterminée selon la méthode de Habig et *al* (1974). Le substrat utilisé est le Chloro-2-4-dinitrobenzène (CDNB) préparé dans l'éthanol 95°. L'enzyme a besoin d'un second substrat pour être active, additionné sous forme de glutathion. L'enzyme permet le transfert du glutathion riche en électron ($\text{GSH} = \text{GS}^- + \text{H}^+$) sur le CDNB chargé positivement par gain d'un proton : attaque électrophiles.

Pour le dosage de la GST, un mélange réactionnel contenant 1.7 ml du tampon phosphate (0,1M ; pH 6.5) et 100µl de CDNB (20mM) est incubé à 37 C° pendant 10 minute. La réaction est déclenchée par l'addition de 100µl de la fraction cytosolique, et de 100µl du glutathion (20mM). La densité optique est lue à 340 nm pendant 5 min contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate. Les résultats sont exprimés en UI/mg de protéines selon la formule :

$$\text{Enzyme (UI/ml)} = [(\Delta A_{340} / \text{min test} - \Delta A_{340} / \text{min blanc}) / (\text{Vt} (\text{Fd}))] / [(9,6) (\text{ve})].$$

Vt : volume total (en millilitre) de l'essai.

Fd : facteur de dilution.

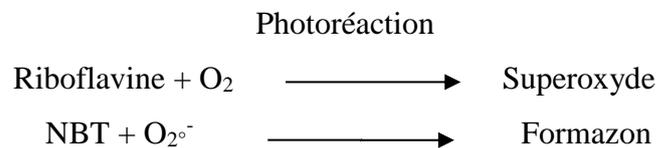
9,6 : coefficient d'extinction millimolaire du glutathion-1-chloro-2,4- dinitrobenzène conjugué à 340nm.

Ve : volume (en millilitre) de l'enzyme utilisée.

Enzyme (Units/ mg de protéines) = Enzyme (units / ml) / Concentration des proteines (mg/ml).

2.4.5. 2.Mesure de l'Activité enzymatique SOD

L'activité enzymatique de la SOD est déterminée selon la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971). Cette activité enzymatique dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitroflu-tetrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur l'électron comme la méthionine selon la réaction suivante :



À 2 ml du milieu réactionnel contenant (cyanide de sodium 10^{-2} M, solution du NBT $1,76 \times 10^{-4}$ M, EDTA 66×10^{-3} M et la riboflavine 2×10^{-6} M), 5µl de la fraction cytosolique et 100µl de la méthionine sont ajoutés. Après l'irradiation du mélange avec une lampe de 15 Watt pendant 10 mn, la DO est lue à 560nm.

% d'inhibition= (absorbance du control-absorbance de l'essai) /absorbance du control x100

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

Les valeurs sont exprimées en UI/mg de protéine.

2.4.5.3. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la catalase a été déterminée selon la méthode décrite par Clairbone (1985). Le principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de la source enzymatique à 25° C. Un mélange constitué de 1ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 0,1M, pH=7,2), 0,950 ml du peroxyde d'hydrogène (0,019M) et 0,025 ml de la source enzymatique est préparé.

L'absorbance est mesurée à 240 nm chaque minute pendant 2mn. L'activité enzymatique est exprimée en UI /mg de protéine selon la relation suivante :

$$\text{UI /mg de protéine} = (2,3033/T. \log A_1/A_2) / \text{concentration des protéines.}$$

Sachant que :

A_1 : absorbance au temps 0mn.

A_2 : absorbance au temps 1mn.

T : intervalle de temps en mn.

2.5. Étude histologique

Au moment du sacrifice des animaux, un petit morceau de rein rincé de chaque lot est immédiatement fixé dans le formol pour permettre la conservation morphologique des structures tissulaires et cellulaires.

Pour la préparation des coupes histologiques, les Biopsies rénales sont préalablement déshydratées par passage de chaque prélèvement dans une série de bains d'alcool de concentration croissante. L'imprégnation des tissus dans la paraffine a été effectuée grâce à un distributeur automatique de paraffine (Shander Citadel, 2000, thermo scientific, Germany). Les coupe des blocs de paraffine effectués au microtome nous a permis de réaliser des coupes fines de 2 microns d'épaisseur. Les coupes ainsi obtenues sont déposées et collées sur des lames en verre.

Les coupes histologiques sont déparaffinées au xylène et réhydratées dans des bains d'alcools de concentration décroissantes. Pour permettre la mise en évidence des différents Structure tissulaire et cellulaire, les coupes obtenues sont colorées par l'hymatoxyline/éosine ; technique de coloration usuelle associant un colorant nucléaire hymatoxyline et un colorant cytoplasmique éosine. Enfin l'examen au microscope optique permettant l'évaluation des changements pathologiques tissulaires du rein.

2.6. Analyse statistique

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous forme de moyenne \pm écartype. Nos résultats sont vérifiés par le test de *student* avec un seuil de signification supérieur à 95% ($p < 0.05$).

($p > 0.05$), effet non significatif ns.

($p < 0.05$), désigne effet significatif *.

($p < 0.01$), désigne effet très significatif ** (comparaison avec le témoin) ou ### (comparaison avec le traité).

Partie III. Résultats et Discussion

Cette étude a pour but d'évaluer l'effet protecteur des polyphénols de la propolis contre la toxicité rénale de l'association EPI-DTX et ce *via* l'évaluation des paramètres sériques, de l'état du stress oxydatif et des altérations tissulaires rénales.

1. Etude phyto-chimique de la propolis

1.1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes

La quantité des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans l'EPP, exprimée en mg EAG/g de propolis et mg EQ/g de propolis respectivement, est illustrée dans le tableau 2 et la figure 18.

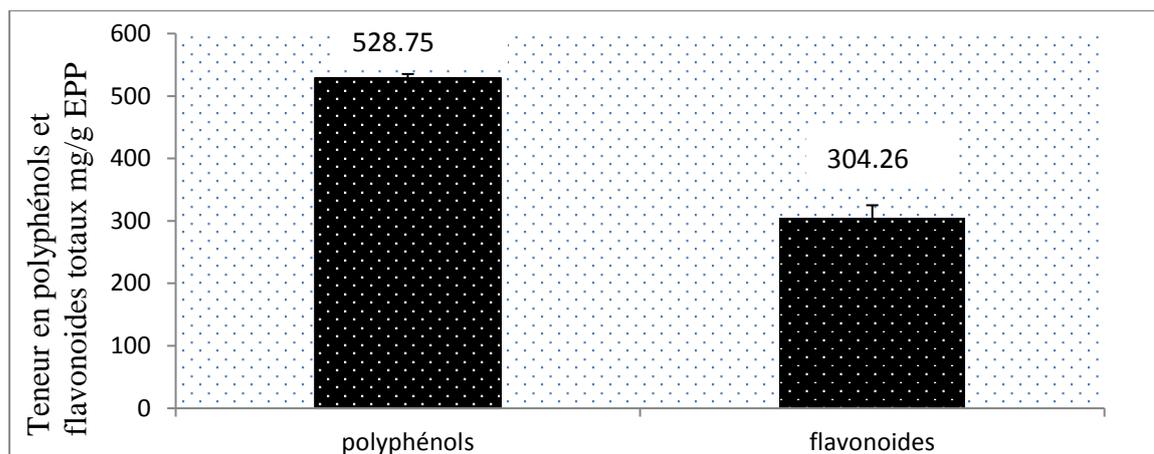


Figure 18. Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de la propolis.

Nous avons constaté que la teneur en polyphénols de l'EPP est importante (528.75 ± 6.46 mg EAG /g de propolis), le taux de flavonoïdes totaux représente plus de 50% des polyphénols totaux avec une concentration de 304.26 ± 20.86 mg EQ/g de propolis.

Notre extrait semble être riche en polyphénols et en flavonoïdes ce qui pourraient expliquer leur forte activité anti-radicalaire obtenue *in vitro* ; car les composés phénoliques constituent une classe d'agents antioxydants anti-radicalaires, chélateurs des métaux et piègeur de la production des radicaux libres (Shahidi *et al.*, 1992; Karamian et Ghasemlou., 2013).

Comparant nos résultats avec ceux obtenus par d'autres auteurs (Karamian et Ghasemlou., 2013; kebsa *et al.*, 2014), on constate que ces teneurs diffèrent d'un échantillon de propolis à l'autre. Cette différence dépend essentiellement de l'origine de la propolis, la saison de la récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique et les conditions de sa conservation.

1.2. Effet anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis

L'évaluation du pouvoir anti-radicalaire de l'EPP aux concentrations 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} mg/ml repose sur le calcul du pourcentage de réduction du radical libre DPPH°.

La figure 19 montre les variations de l'effet scavenger de l'EPP et de la vitamine C à différentes concentrations contre le radical libre DPPH°.

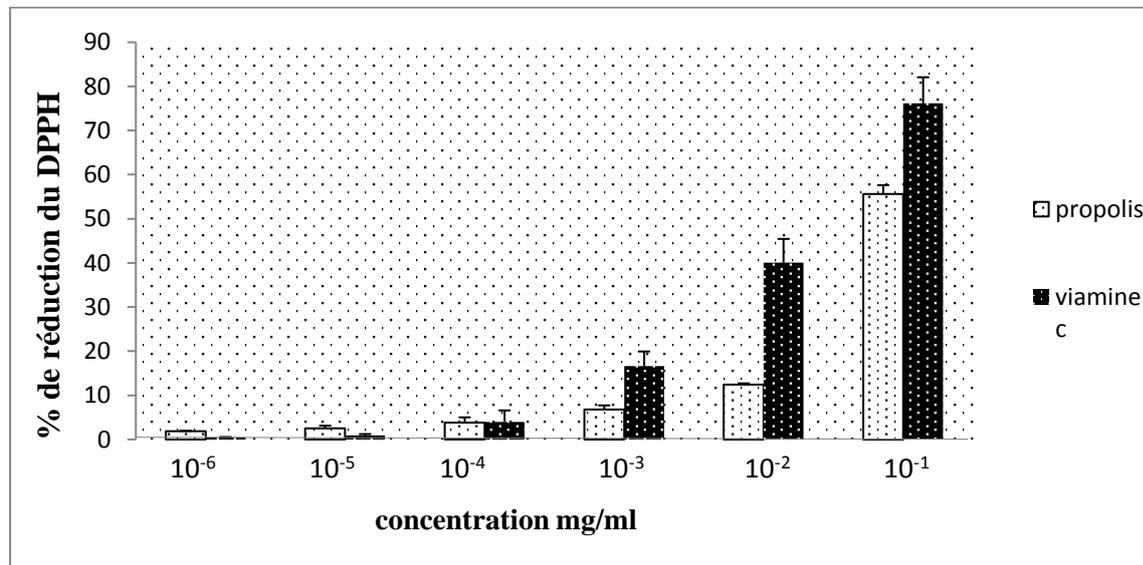


Figure 19. Pourcentage de réduction de réduction du radical DPPH° de l'EPP et de la vitamine C.

Nous avons constaté que l'effet anti-radicalaire de l'EPP est concentration dépendant ; les pourcentages de réduction sont ($55.54\% \pm 1.91$, $12.47\% \pm 0.25$, $6.77\% \pm 0.95$, $3.80\% \pm 1.21$, $2.51\% \pm 0.61$, $1.89\% \pm 0.08$) aux concentrations 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} mg/ml respectivement. Les mêmes résultats sont enregistrés pour la vitamine C avec des pourcentages de réductions ($76.16\% \pm 5.90$, $40.06\% \pm 5.38$, $16.62\% \pm 3.31$, $4.05\% \pm 2.58$, $0.91\% \pm 0.31$ et $0.48\% \pm 0.07$) aux concentrations 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} mg/ml respectivement.

Aux concentrations 10^{-5} et 10^{-6} mg/ml, l'EPP présente un effet anti-radicalaire supérieure à celui de la vitamine C, et un effet comparable à la concentration 10^{-4} mg/ml. Aux concentrations 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} mg/ml, l'effet anti-radicalaire de l'acide ascorbique est mieux ($p \leq 0.01$) que celui de l'EPP. L'IC₅₀ d' EEP et de la Vit C sont de 45.62 ± 0.47 mg/ml et 47.79 ± 0.06 mg/ml respectivement, ce qui donne un effet anti-radicalaire comparable.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par plusieurs auteurs travaillant sur la propolis de Jijel (Alyane et al., 2008 ; Lahouel et al ., 2010 ., Kebsa et al ., 2014). Cette forte activité anti-radicalaire est expliqué par la richesse de la propolis en composés phénoliques (528.75 ± 6.46 mg EAG /g) et particulièrement en flavonoïdes (304.26 ± 20.86 mg EQ/g). Il a également été signalé qu'ils sont des donneurs d'hydrogène efficaces et la position et le degré d'hydroxylation des

composés phénoliques sont des propriétés excellentes de la capacité à piéger les ROS (Wange et *al.*, 2016). Selon (Ahn *et al.*, 2009) ; la présence des polyphénols tels que le kaempférol. La quercétine et le CAPE dans la propolis est associée à une très forte capacité antioxydante.

2. Etude *in vivo*

L'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait de propolis contre la toxicité rénale de l'association (EPI-DTX) a été effectuée on se basant sur l'évaluation des paramètres de stress, des paramètres sériques et la visualisation des changements tissulaires des coupes histologiques.

2.1. Observation du comportement des rats après traitement

Dès les premiers jours de traitement par l'association de (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) chez les rats plusieurs symptômes ont été observés ils ont été perdus leurs poids avec apparition d'une inflammation au niveau de la queue (Fig.20), leur activité a été réduite, leur démarche est devenue lente. La mort d'un rat du lot traité par EPI-DTX vient de l'effet toxique de cette association médicamenteuse. Aucun changement comportemental n'a été observé chez les rats témoins et les rats prétraités par l'EEP.



Figure 20. Inflammation au niveau de la queue des rats traités par l'association par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²).

2.2. Evolution pondérale des animaux sous l'effet des différents traitements

Les variations des poids (corporel et rénal) chez les rats à la fin des traitements par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec la propolis à 25mg/kg sont illustrées dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Évolution pondérale corporels et rénale chez les rats traités par ((DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²)) seule ou en association avec la propolis à 25mg/kg après 21j.

	Témoin	EPI+DTX	EPP+(EPI-DTX)
Poids corporel (g)	188±19.17	149.2±17.54**	184.2 ± 23.11##
Poids des reins (g)	1.15±0.07	1.01±0.1*	1.33±0.21##

Au 21 jour du traitement Nous avons constaté une diminution très significative ($p \leq 0.001$) du poids corporel des rats traités par l'association DTX - EPI par rapport au témoin (188±19.17g). Par contre, une augmentation significative ($p \leq 0.001$) chez le groupe prétraité par l'extrait éthanolique de la propolis (184.2±23.11g) par rapport au groupe traité a été enregistré.

Une diminution significative ($P \leq 0.05$) du poids des reins des rats traités par l'association DTX-EPI au dernier jour (1.01±0.1g) par rapport aux rats témoins (1.15±0.07g) a été constaté. Par contre nous avons enregistré une augmentation très significative ($p \leq 0.01$) chez le groupe prétraité par l'extrait éthanolique de la propolis (1.16±0.26g) par rapport au groupe traité (1.01±0.1g).

A la lumière de nos résultats ; la diminution du poids corporel et du poids des reins chez les rats traités par l'association de l'EPI et le DTX vient de l'effet toxique de cette association médicamenteuse sur le fonctionnement des reins par rapport au groupe témoin. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenues par (Swamy et al., 2012 ; Periyasamy et al., 2014 ; Mansouri et al., 2017) qui ont montré une diminution significative du poids corporel et du poids des reins après l'injection intraveineuse d'une dose unique 100 mg/kg de la doxorubicine chez les rats mal wistar albinos alors que une diminution légère observée chez les animaux prétraités par l'extrait de la propolis est due à l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Nassar et al., (2016) qui montrés que l'extrait éthanolique de la propolis (250 mg/kg) augmente le poids corporel des rats traités par la doxorubicine à (25 mg/kg).

2.3. Évaluation des paramètres biochimiques

2.3.1. Evaluation de la Chimie des urines

Les résultats de la chimie des urines sont représentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3. Chimie des urines sous l'effet du traitement par l'association (DTX 75mg/m²- EPI 200 mg/m²) seule ou en association avec l'EEP (25mg/kg).

	Bilirubine (µmol/l)	Urobilino-gène (µmol/l)	Cétones	Glucose (mmol/l)	Protéines (g/l)	Sang (RBC/µl)	Nitrite	pH	Densité	Leucocytes WBC/µl
24heures										
Témoin	-	-	-	-	+30	-	Traces	7	1.02	-
DTX+EPI	-	-	-	-	+++300	++50	Traces	8	1.02	-
EPP+ (DTX-EPI)	-	-	-	-	Traces	-	Traces	6.5	1.00	-
14jours										
Témoin	-	-	-	-	+30	-	Traces	7	1.02	-
DTX+EPI	-	-	-	-	+++300	++	-	8	1.02	-
EPP+ DTX-EPI	-	-	-	-	Traces	-	-	6.5	1.02	-
21jours										
Témoin	-	-	-	-	+30	-	Traces	7	1.02	-
DTX+EPI	-	-	-	-	++++1000	++50	Traces	6.5	1.02	-
EPP+ DTX-EPI	-	-	-	-	+30	-	-	7	1.02	-

Une apparition de protéinurie (+++300g/l), sang (++50 RBC/µl), avec une augmentation du pH (=8) au premier jour et au 14^{ème} jour du traitement chez les rats traités par l'EPI-DTX comparés au groupe témoin (protéinurie (+30g/l) ; sang (-) ; pH=7 respectivement). Le prétraitement par l'extrait éthanolique de la propolis a normalisé le taux de protéines à (traces) avec une disparition du sang, et diminution du pH (6.5).

Au 21 jour de traitement, on a constaté une haute augmentation de protéinurie (++++10000g/l), avec une apparition de sang (++50 RBC/µl) et diminution du pH (6.5) chez les rats Traités par (l'EPI-DTX) comparé au groupe témoin (protéinurie +30g/l ; sang (-) ; avec un pH =7) respectivement. Le groupe prétraité par l'EEP a montré des valeurs négatives de sang avec une normalisation de pH à 7.

La protéinurie a émergé ces dernières années comme un des principaux facteurs de risque pour la progression de la maladie rénale.

La protéinurie est la cause la plus fréquente de l'atteinte glomérulaire. L'augmentation des taux de la protéinurie après traitement par l'EPI-DTX résulte d'une fuite de protéines plasmatiques à travers un Barrière de Filtration Glomérulaire lésée. Les mécanismes de réabsorption tubulaires sont

saturés et l'albumine et d'autres protéines apparaissent alors dans les urines. L'atteinte tubulaire résulte d'un défaut de

Réabsorption tubulaire de protéines plasmatiques de bas PM qui sont normalement filtrées, puis réabsorbées et métabolisées par les cellules épithéliales tubulaires (Issaza et *al.*, 2012).

Dans la présente étude, la chimie des urines révèle la présence de sang après traitement par l'association de (EPI - DTX), ce dernier permettant parfois de trouver l'origine de l'hématurie. Des globules rouges dysmorphiques et des cylindres hématiques sont associés à une atteinte glomérulaire. En effet, lorsqu'il y a des dommages, les glomérules laissent filtrer des globules rouges et des protéines. Les globules rouges sont alors déformés lors de leur passage à travers la paroi glomérulaire et prennent une apparence anormale (dysmorphiques). Des cylindres contenant des globules rouges (hématiques) se forment ensuite dans les tubules des reins et sont éliminés dans l'urine (Pelletier, 2014).

Cependant après prétraitement par la propolis, nous avons constaté une disparition des protéines et de sang dans les urines. Ceci reflète l'effet préventif de la propolis contre les dommages tissulaires induits par l'association (EPI-DTX).

2.3.2. Évaluation de la créatinine plasmatique

La créatinine sérique est un marqueur le plus sensible de la néphrotoxicité impliquée dans le diagnostic d'une insuffisance rénale (soltana et *al.*, 2012).

La figure 21 a illustré les variations des taux de la créatinémie chez les rats traités par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'EEP à 25 mg/kg.

Nous avons remarqué une augmentation non significative ($P > 0.05$) des taux de la créatinine plasmatique chez le groupe traité par EPI-DTX (4.89 ± 0.41 mg/l) au bout de 24 heures par rapport au groupe témoin (4.48 ± 0.35 mg/l). Une augmentation très significative ($P \leq 0.01$) a été enregistré jusqu'au 14^{ème} et au 21^{ème} jour (5.64 ± 0.22 mg/l et 5.73 ± 0.09 mg/l) respectivement. Par contre nous avons enregistré une diminution très significative ($P \leq 0.01$) de la concentration de la créatinine plasmatique chez les animaux prétraités par la propolis au temps 24heures, 14jours et 21jours (3.99 ± 0.37 , 4.34 ± 0.15 et 5.28 ± 0.16 mg/l) respectivement par rapport au groupe traité.

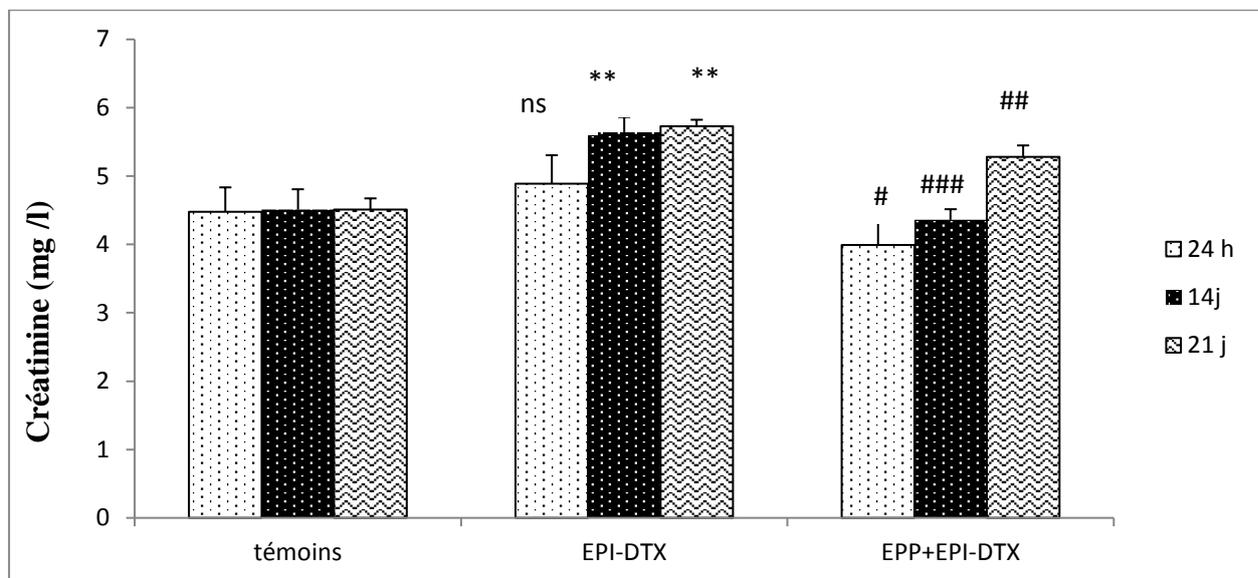


Figure 21. Variation des taux de créatinine plasmatique après administration de (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg / kg.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe traité par EPI-DTX et le témoin : $p > 0.05$ désigne un effet non significatif. $*P < 0.05$ désigne un effet significatif ; $**P \leq 0.01$ désigne un effet très significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par EPI-DTX : $\#P \leq 0.05$ désigne un effet significatif. $###P \leq 0.001$ désigne un effet hautement significatif.

Les dommages aux reins induits par l'association (EPI –DTX) se manifestent par une élévation de niveaux de créatinine plasmatique par rapport au groupe témoins. Nos résultats sont en accord avec ceux précédemment rapportés (Wu et al., 2017) qui ont montré que, l'injection de l'épirubicine à une dose de 15 mg/kg provoquait une augmentation du taux de la créatinine plasmatique. (Ray et al., 2012) ont constaté que, chez des rats mâles de souche *Wistar albinos*, l'injection de la doxorubicine à une dose de 12 mg/kg provoquait une augmentation du taux de la créatinine qui sont dues à des lésions au niveau du parenchyme rénale. De même mohan et al., (2010) ont eux aussi enregistré des résultats similaires qui signifient une altération de la filtration glomérulaire.

Dans notre étude, nous avons constaté que l'administration orale de l'extrait éthanolique de la propolis d'une dose journalière de 25mg/kg a permis de protéger les rats contre la néphrotoxicité induite par EPI-DTX, encore mieux, elle a même permis de diminuer le taux plasmatique de la créatinine par rapport aux traités. Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Lahoul et al., (2010), qui ont constaté que l'administration orale de l'extrait éthanolique de la propolis a une dose de 100 mg / kg a provoqué une diminution significative de la concentration de la créatinine plasmatique. Nous avons rapporté que les flavonoïdes de la propolis protège les tissus du foie et du cœur chez les rats traités avec les médicaments anticancéreux (Alyane et al., 2008) et nous

avons émis l'hypothèse que l'effet protecteur des flavonoïdes pourrait être dû à leur capacité à capturer et à désactiver les radicaux libres.

2.3.3. Evaluation de la clairance de la créatinine plasmatique

L'augmentation de la créatininémie témoigne d'une diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG), et donc par définition d'une insuffisance rénale (Hertig et d'Ythurbid, 2012).

La figure 22 montre les variations des clairances de la créatinine chez les rats traités par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait de la propolis à 25 mg/kg.

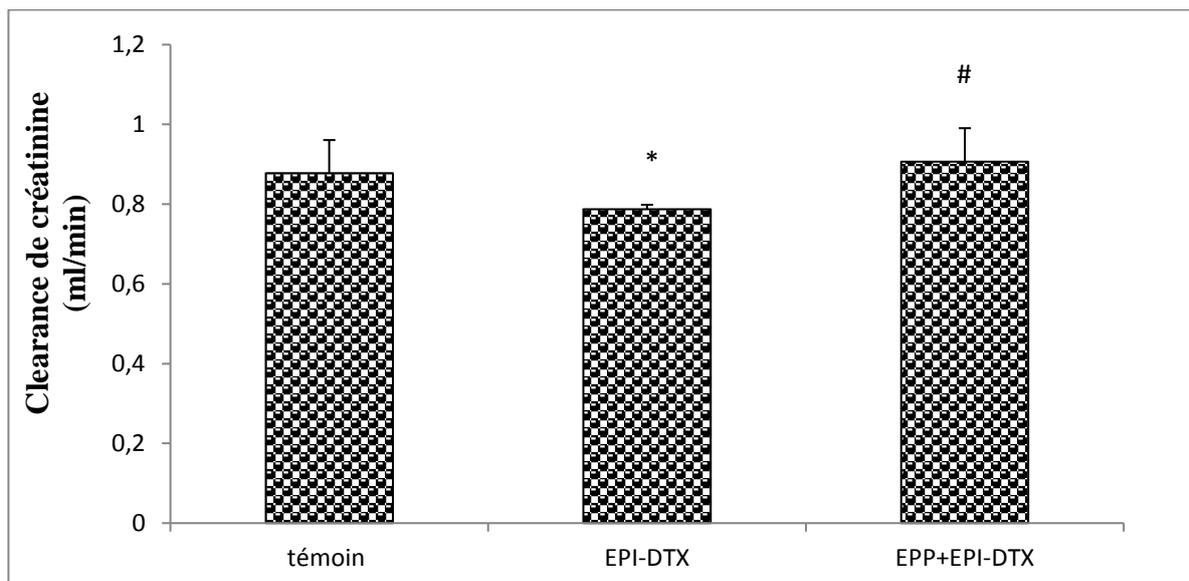


Figure 22. Variation des clairances de la créatinine plasmatique après 24 de l'administration par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg / kg.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student comparaison faites entre le groupe traité par EPI-DTX et le témoin : (p>0.05). *P <0.05 désigne un effet significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par EPI-DTX : #P<0.05 désigne un effet significatif.

Nous avons constaté une diminution significative (P<0.05) de la clairance chez les animaux recevant l'EPI-DXT par rapport au témoin (0.87 ± 0.08ml/mn). Elle est observée dès 24heures du traitement traduisant la réduction de la filtration glomérulaire. Par contre les animaux prétraités par l'extrait de propolis montrent une augmentation significative (P<0.05) de la clairance (0.90± 0.08 ml/mn) par rapport au groupe traité (0.78 ± 0.01ml/mn).

L'augmentation de la créatinine plasmatique chez les rats traité par (EPI-DTX) est confirmée par la diminution de la clairance plasmatique ce qui suggère que le débit de la filtration glomérulaire a été clairement réduit, et permet d'expliquer une réduction du volume de plasma épuré par minute nous résultats sont similaire à ceux rapporté par Raguenez et al., (1988) qui montre une diminution de la clairance de la créatinine chez les rat après traitement par (ADR-CCNU) . Ceci

reflète une toxicité rénale accrue et l'incapacité du rein à éliminer les produits de dégradation du métabolisme azoté et menace l'équilibre acido-basique, hydro-électrolytique et hormonal (Hertig et d'Ythurbid, 2012).

Par contre le prétraitement par la propolis nous avons constaté une augmentation de la clairance de la créatinine par rapport au traité qui signifie l'effet protecteur de la propolis contre les dégâts tissulaire induit par EPI -DTX aux niveaux des reins.

2.3.4. Evaluation de l'urée plasmatique

Des niveaux accrus d'urée plasmatique ont été signalés à la fois en cas une toxicité rénale induite par l'EPI-DTX. Comme une paire de biomarqueurs sensibles dans les lésions rénales et des dommages glomérulaire (Ihab Tala tet al ., 2009) .

Les variations des taux d'urée plasmatique chez les rats traités par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/m²) seule ou en association avec la propolis (25 mg/kg) sont représentés dans la figure 23 ci-dessous.

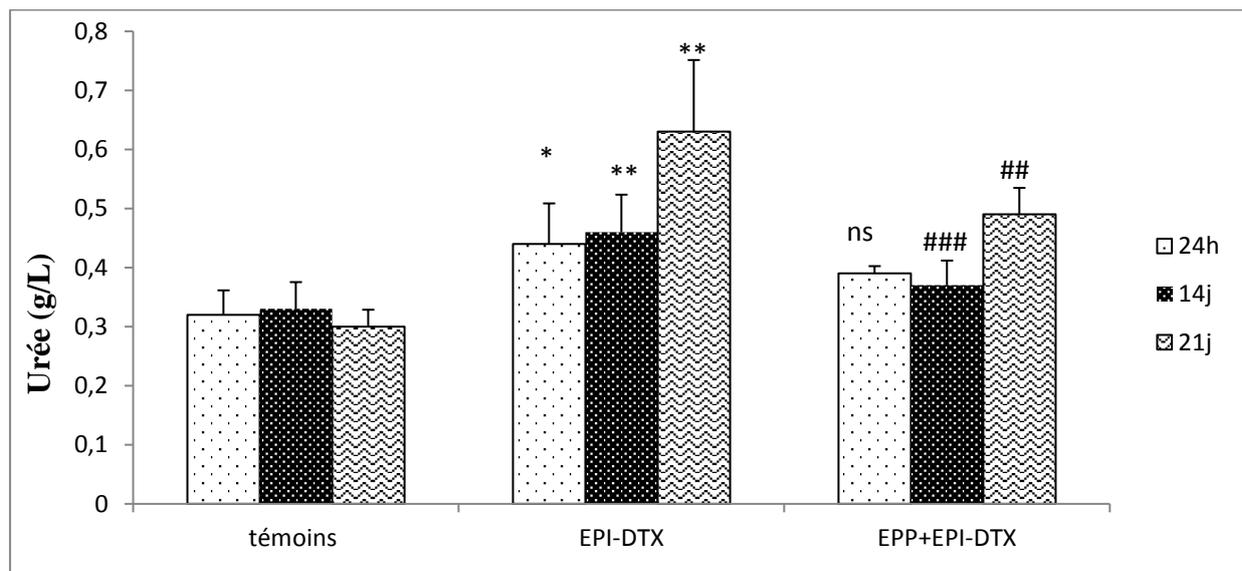


Figure 23. Variations des taux d'urée plasmatique après administration (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/m²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg/kg.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Teste de student : comparaison faites entre le groupe traité par EPI-DTX et le témoin : ($p > 0.05$). * $P < 0.05$ désigne un effet significatif ; ** $P \leq 0.01$ désigne un effet très significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par EPI-DTX : (ns) désigne un effet non significatif # $P \leq 0.05$ désigne un effet significatif.

Nous avons constaté une augmentation significative ($P \leq 0.05$) des taux d'urée plasmatique chez le groupe traité par (EPI-DTX) par rapporte au groupe témoins. Vingt-quatre heures après l'injection. La concentration de l'urée atteignait 0.44 ± 0.06 g/l chez les rats traités contre (0.32 ± 0.04 g/l) chez les témoins et augmentait progressivement jusqu'au 21^{ème} jour de façon très significative ($P < 0,01$).

Le prétraitement par la propolis a montré une diminution significative ($P \leq 0.05$) des taux d'urée plasmatique au temps 14 et 21 jours (0.37 ± 0.04 , 0.49 ± 0.04 g/l) respectivement contre (0.46 ± 0.06 , 0.63 ± 0.12 g/l) chez les rats traités par l'association (DTX-EPI).

Dans notre étude, nous avons montré une augmentation significative dans la concentration de l'urée plasmatique, chez le groupe des rats traités avec l'EPI-DTX comparativement au groupe témoin. Ces résultats est similaire avec Rashid et *al.*, 2013 qui reflète une augmentation de l'urée plasmatique après l'injection d'une dose unique de doxorubicine (40mg/kg) En outre, Les niveaux accrus de ces marqueurs de néphrotoxicité dans le plasma et la chute subséquente du tissu peuvent être dus à la fuite de ces enzymes cytosoliques dans le système circulatoire résultant d'un dommage de la membrane rénale lors de l'administration de EPI-DTX. Ceci est révélateur de l'apparition d'un endommagement cellulaire rénal, d'une dysfonction rénale et d'une perturbation de la biosynthèse de ces enzymes, avec une altération de la perméabilité de la membrane (Sultana et *al.* , 2012)

Par contre, les rats administrés avec de la propolis ont montré une diminution des taux d'urée dans le plasma par rapport aux rats traités par (EPI -DTX). Ceci reflète l'effet protecteur de la propolis contre les dommages tissulaires induits par les deux anticancéreux (EPI-DTX). La propolis ont la capacité de corriger les atteintes causées par l'association EPI-DTX *via* leur activité antioxydante permettant de neutraliser les métabolites toxiques provoqué par (EPI -DTX)

2.3.5. Evaluation de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl transpeptidase urinaire

Les enzymes urinaires peuvent également fournir des informations sur la progression et la récupération des dommages rénaux car l'activité des enzymes varient en fonction de la maladie rénale (Clem ,1998)

Les variations de l'activité de la gamma-GT urinaire (γ GT) chez les rats traités par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en prétraitement avec la propolis (25 mg/kg) sont représentées dans la figure 24 ci-dessous.

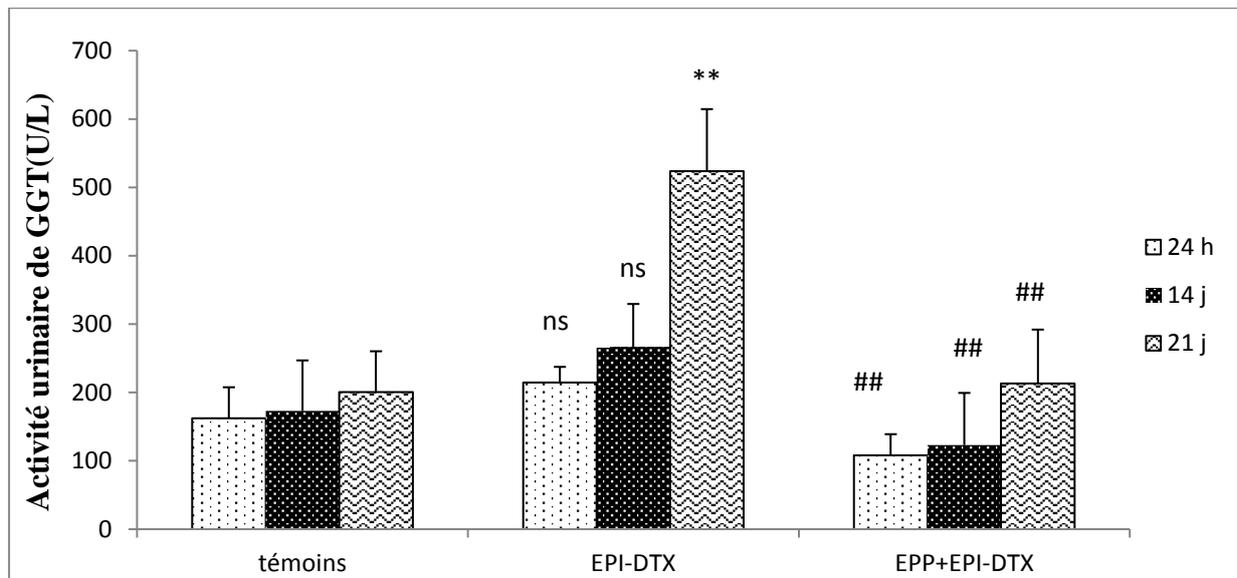


Figure 24. Variation de l'activité enzymatique de la gamma-glutamyl-transpeptidase urinaire après administration (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg/kg.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Teste de student : comparaison faites entre le groupe traité par EPI-DTX et le témoin : (ns) désigne un effet non significatif *P < 0.05 désigne un effet significatif ; **P \leq 0.01 désigne un effet très significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par EPI-DTX : #P \leq 0.05 désigne un effet significatif.

L'augmentation de la gamma-glutamyl transpeptidase (γ GT) urinaire a été utilisée comme indicateur sensible des dommages aux tubules rénaux proximaux (Pedraza-Chaverrí et al., 1995 ; lahoul et al., 2010).

Au temps 24 heures et 14 jours après le traitement par EPI-DTX, nous avons constaté une augmentation non significative (P > 0.05) de l'activité enzymatique de la γ GT urinaire, alors qu'une augmentation très significative (P \leq 0.01) a été enregistrée au 21^{ème} jour par rapport au témoin (200.43 \pm 59,85 U/l et 523.75 \pm 118.78 U/l) respectivement. Cette activité a été diminuée significativement (P \leq 0.05) chez les rats prétraités par l'extrait éthanolique de la propolis à 25 mg/Kg par rapport aux groupe traité par les anticancéreux seuls (523.75 \pm 118.78U/l, 213 \pm 79U/l) respectivement.

Le traitement des rats par EPI-DTX augmente de façon significative l'activité de la γ -GT urinaire par rapport au groupe témoin. Nos résultats sont en accord avec ceux apportés par (lahoul et al., 2010) qui montre une augmentation de l'activité de la γ -GT urinaire chez les rats recevant la doxorubicine à une dose unique (10 mg/kg) serait due à une altération de la bordure de la brosse rénale et ceci découle de la toxicité rénale des médicaments.

Le traitement par la propolis diminue significativement l'activité de γ GT urinaire et permis aussi de minimiser les dégâts tissulaires entraîné par l'EPI -DTX au niveau du rein. Nos résultats sont similaires à ceux de (Lahouel et al., 2010) qui reflète que l'extrait éthanolique de la propolis à une

dose de (100mg/kg) provoquait une diminution de l'activité de la γ GT urinaire chez les rats recevant la doxorubicine (10mg/kg).

2.4. Evaluation des paramètres du stress oxydant rénale

2.4.1. Evaluation de la peroxydation lipidique

La peroxydation des lipides est le processus de dégradation par oxydation des acides gras polyinsaturés. Son apparition dans les membranes biologiques provoque une diminution de la fonction de la membrane, une intégrité structurelle réduite, une diminution de la fluidité et une inactivation d'un certain nombre d'enzymes liées à la membrane et de récepteurs de protéines (Alyane et al., 2008) il y a beaucoup de travaux qui ont montré que la peroxydation lipidique joue un rôle critique dans la toxicité rénale induite par les radicaux libres, donc elle a été utilisée comme un indicateur sensible de cytotoxicité induite par les oxydants (Hickey et al., 2000). Le MDA tissulaire, comme produit final de la cascade lipopéroxydative, est reporté pour être un marqueur fiable de la peroxydation lipidique (Camkur et al., 2017) .

La figure 25 montre les variations des taux de MDA cytosolique des rats traités par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait éthanolique de la propolis à 25 mg/ kg.

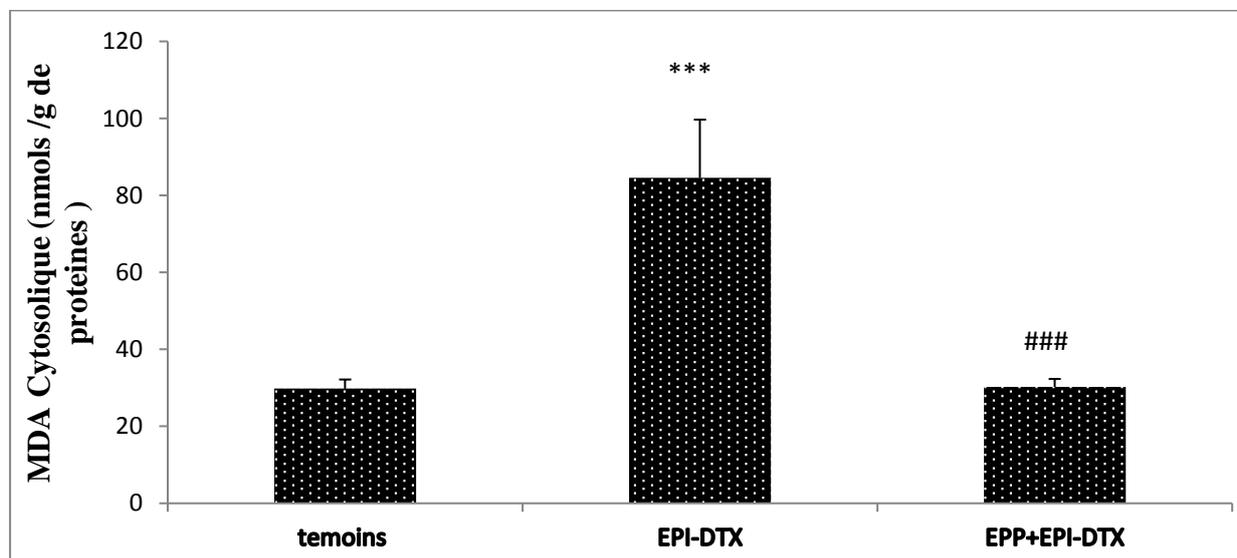


Figure 25. Variation des taux du MDA cytosolique rénal après administration (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait de propolis à 25 mg/kg.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-types. Test de Student: comparaisons faites entre le groupe traité par EPR- DTX et le témoin : *** $p < 0.001$ désigne un effet hautement significatif. Group prétraité comparés au groupe traité par EPR- DTX : ### $p < 0.001$ désigne un effet hautement significatif.

Nous avons constaté une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) du taux de MDA cytosolique des rats traités par l'EPI-DTX comparé au groupe témoin (85.02 ± 15.13 nmol /g de

protéines contre 29.79 ± 2.36 nmole/g de protéines). Le prétraitement par l'extrait de la propolis a provoqué une diminution hautement significative ($p < 0.001$) du taux de MDA (30.22 ± 2.08 nmole/g de protéines) par rapport au groupe traité par l'EPI -DTX (85.02 ± 15.13 nmol /g protéines).

L'augmentation des taux du MDA est un indicateur de la toxicité rénale de l'association EPI -DTX qui est probablement due à la surproduction de ROS et ou à la déplétion des systèmes antioxydants ; le déséquilibre entre la production de ROS et le système antioxydants peut provoquer la peroxydation lipidique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Tabaczar et ses collaborateurs (2013) qui ont montré que le traitement par la DOX (10 mg/kg) en association avec la DTX (7.5 mg/kg) augmente de façon significative le taux de MDA. (Pieniżek et *al.*, 2013), ont enregistré des résultats similaires ; la combinaison DOX-DTX (10mg/kg) provoque l'augmentation de TBARS au niveau rénal. Ces résultats sont en accord avec ceux (Altinas et *al.*, 2014) et Wu et *al.*, (2017).

Le prétraitement par la propolis diminue le taux de MDA, cette diminution est dû à l'effet scavenger des polyphénols de la propolis ou a la capacité de réduire le taux de ROS et d'augmenter les capacités anti-oxydantes tissulaires. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par (Boutabet et *al.*, 2011) ; le prétraitement par la propolis à 100 mg / kg par voie orale avant administration intraveineuse de la doxorubicine à 10 mg/kg IV réduit significativement la peroxydation lipidique. Tabaczar et *al.*, (2013) montrent que le prétraitement par la quercétine avant l'administration DOX-DTX diminue considérablement les produits de la peroxydation lipidique et améliore le système de défense antioxydant endogène.

2. 4. 2. Evaluation du taux de glutathion rénal

Les cellules disposent pour leurs protections contre les dommages induits par les réactions des espèces réactives de l'oxygène du glutathion (GSH) ; qui est un régulateur redox cellulaire majeur et un antioxydant (Lavoie et *al.*, 2017), il joue son rôle antioxydant en synergie avec les enzymes antioxydants (Robaczewska et *al.*, 2016). La réduction du niveau de GSH dans les tissus peut entraîner des blessures peroxydatives et des dégâts de la défense cellulaire contre les ROS (Rachide et *al.*, 2013).

La figure 26 illustre les variations des taux de GSH cytosolique des rats traités par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en prétraitement avec l'extrait de la propolis 25 mg /kg.

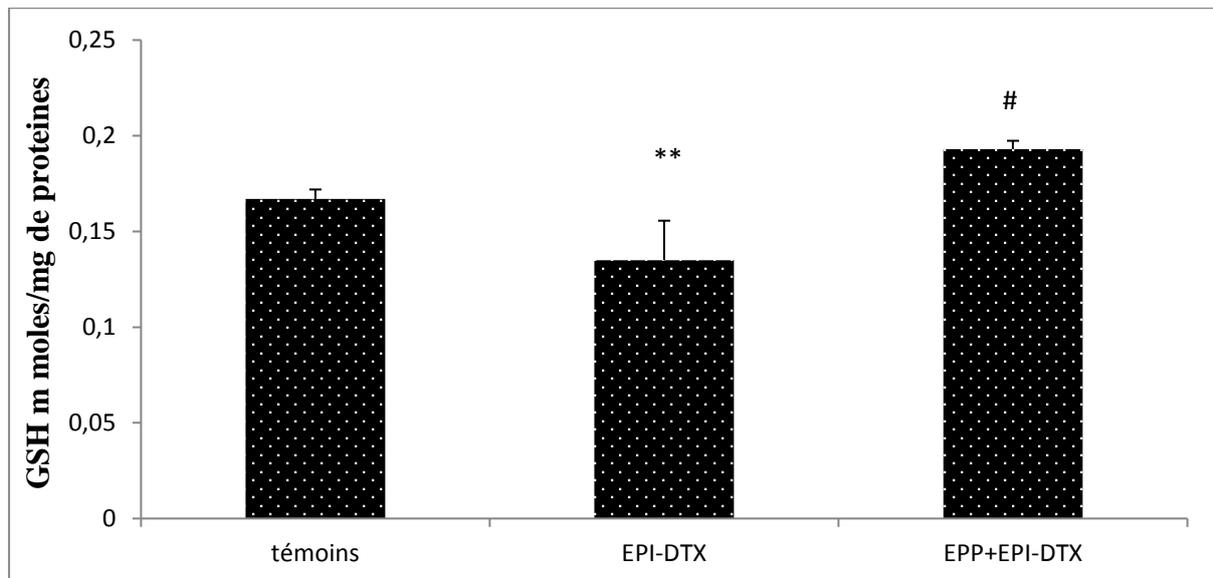


Figure 26. Variation des taux du GSH cytosolique rénal après administration de (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg / kg.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart types. Test de student : comparaisons faites entre le groupe traité par EPR- DTX et le témoin : ** $p < 0.01$ désigne un effet très significatif. Group prétraité comparés au groupe traité par EPR- DTX : ## $p \leq 0.05$ désigne un effet significatif.

Les concentrations de glutathion ont été diminués significativement ($p < 0.01$) chez les rats recevant l'EPI-DTX (0.135 ± 0.020 mmoles/mg de proteines comparée à celles du témoin (0.167 ± 0.004 mmoles/mg de proteines). le taux de GSH augmente significativement ($p < 0.05$) chez les animaux prétraités par l'extrait éthanolique de la propolis (0.193 ± 0.036 mmoles/mg de protéines) comparée à celle de groupe traité par les anticancéreux seules.

Dans cette étude, les résultats ont révélé une déplétion significative du GSH rénal chez les rats traités par l'EPI-DTX par rapporte à ceux des témoins. Cette diminution est essentiellement due à l'effet toxique des métabolites réactifs des médicaments qui sont fixés et neutralisés par ce système de détoxification, ce qui entraîne une diminution des concentrations de GSH, ou à une dégradation du GSH par la gamma-glutamyl transpeptidase. Nos résultats sont similaires à ceux de (Tabaczar et al., 2013 ; Pieniżek et al., 2013). Qui ont montré une déplétion des taux de GSH des rats traités par l'association anticancéreuse (DOX-DTX). Hung et al., (2015).

Le prétraitement par la propolis augmente significativement la réserve en GSH ce qui montre l'effet protecteur de la propolis contre la déplétion de GSH induite par l'EPI et le DTX. Cette augmentation des taux de GSH est due à l'induction de sa synthèse et/ou à sa régénération. L'effet piègeurs et neutralisant des flavonoïdes de la propolis pour les métabolites toxiques des

Anticancéreux peut expliquer le maintien des taux de GSH. Ces données peuvent expliquer l'effet préventif des flavonoïdes de propolis . Ce résultat est en accord avec ceux (Injac et al., 2008).

Autres études montre que la quercétine améliore les taux de GSH (Tabaczar et *al.*, 2013 ; Kebsa et *al.*, 2015).

2. 4. 3. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

2.4.3.1. Évaluation de l'activité enzymatique de la GST

Glutathione S – transferase (GST) est une enzyme qui joue un rôle important dans la réduction des radicaux libres oxygénés (Wu et *al.*, 2017), elles inactivent les composés électrophiles toxiques et les produits de la peroxydation lipidique en les conjuguant au glutathion (Desmots et Guillouzo., 2000). La GST protège les cellules contre les effets néfastes des xénobiotiques en catalysant la conjugaison de composés endogènes et exogènes avec le glutathion (koul *et al.*, 2013).

La figure 27 représente les valeurs de l'activité enzymatique de la GST dans le tissu rénal après traitement par l'association d'épirubicine et docétaxel seule ou en prétraitement par la propolis.

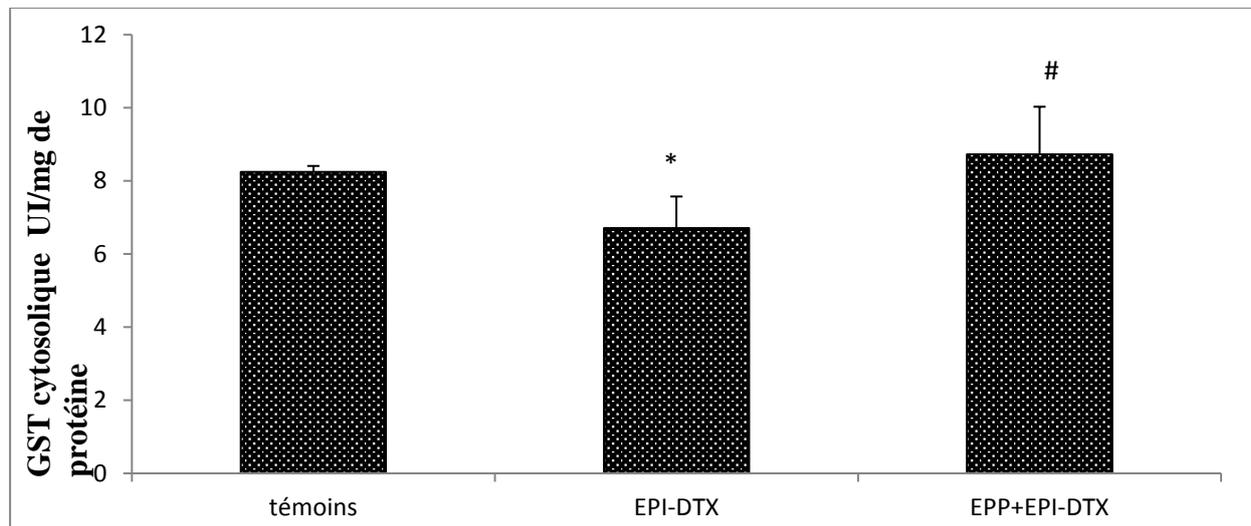


Figure 27. Variations de l'activité enzymatique de la GST rénale après administration de (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg/kg.

*Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart types. Test de student : comparaisons faites entre le groupe traité par EPR- DTX et le témoin : * p ≤ 0.05 désigne un effet significatif. Group prétraité comparés au groupe traité par EPR- DTX : ## p ≤ 0.01 désigne un effet très significatif.*

L'association de (EPI– DTX) a inhibé significativement (p<0.05) l'activité de la GST, cet activité enzymatique atteint (6.71± 0.86 UI/mg de protéines contre 8.25±0.15 UI/mg) de protéines chez les rats Témoins. Par ailleurs le prétraitement des animaux par l'extrait de propolis (25 mg/kg/jour) pendant 5 jours a amélioré de façon très significative (p<0.01) l'activité enzymatique antioxydante de la GST qui atteint 8.72±1.30 UI/mg de protéines par rapport au group recevant EPI –DTX.

La déplétion en GST est due à une repense adaptative au stress oxydant provoqué par la présence des anticancéreux (EPI et DTX), qui induisent eux-mêmes une surproduction de ROS, le

mécanisme de détoxification assuré par la GST facilitant la conjugaison du GSH avec les oxydants toxiques, est augmenté par l'élévation du GSH (Chen et *al.*, 2008). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Wu et *al.*, (2017) qui révèlent une diminution de l'activité de la GST chez les rats recevant l'EPI à une dose unique 15 mg/kg.

Le prétraitement par la propolis a amélioré l'activité enzymatique de la GST cela est dû essentiellement à l'effet piègeur de la propolis contre les radicaux libres et à la régénération et au maintien des taux de GSH (Benghadouer et *al.*, 2008; Keba et *al.*, 2014).

2.4 .3.2. Évaluation de l'activité enzymatique de la SOD

La superoxyde dismutase (SOD), la première ligne de défense contre les radicaux libres, converti l'anion superoxyde en H₂O₂, en formant des produits neutres O₂ et H₂O (Surapaneni et Jainu, 2014). La SOD est largement distribué dans toutes les cellules et possède un rôle de protection important contre les lésions oxydatives induites par les ROS ou les métabolites toxiques des xénobiotiques et des médicaments (Rashid et *al.*, 2013).

La figure 28 représente l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu rénal après traitement par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seule ou en prétraitement par l'EEP à 25 mg/kg pendant 5jours.

Chez les rats traités par l'association EPI-DTX, on constate une diminution non significatif ($p > 0.05$) de l'activité enzymatique de la SOD atteint 101.95 ± 48.02 UI/mg de protéines contre 202.05 ± 49.83 UI/mg chez les rats témoins. Par ailleurs le prétraitement des animaux par l'extrait de propolis (25 mg/kg/jour) associés avec l'EPI - DTX, entraîne une augmentation significative ($p < 0.05$) de l'activité enzymatique de la SOD atteint 271.71 ± 73.97 UI/mg par rapport au group recevant EPI-DTX.

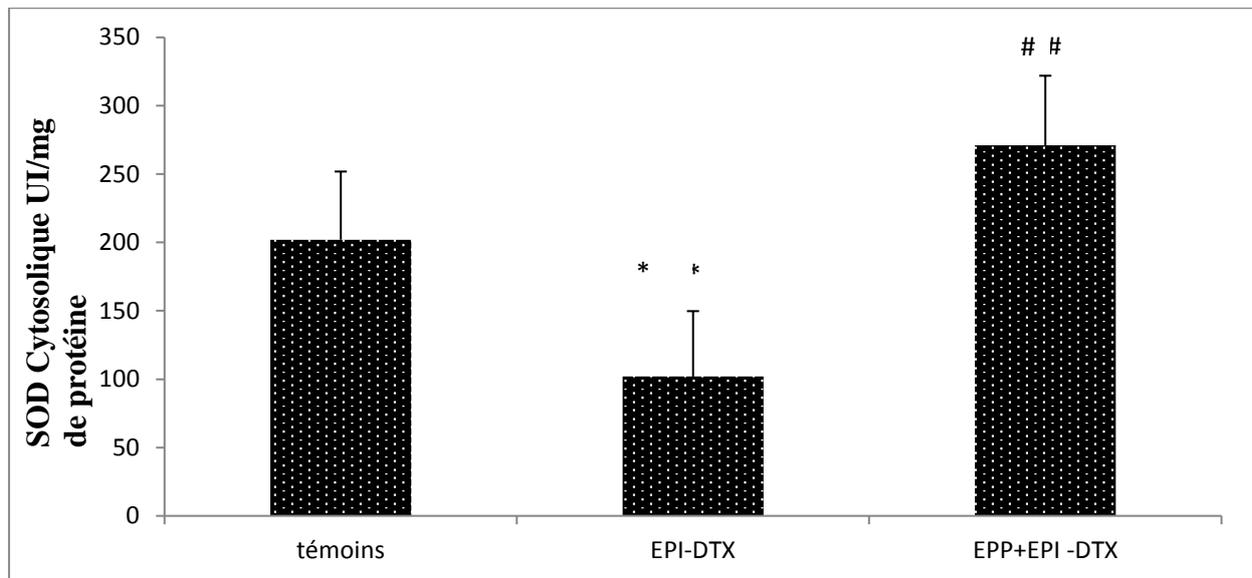


Figure 28. Variations de l'activité enzymatique de la SOD rénale après administration (DTX 75mg/m²-EPI 200mg/ m²) seule ou en association avec l'extrait de propolis 25 mg/kg.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart types. Test de student : comparaisons faites entre le groupe traité par EPI- DTX et le témoin : ns $p > 0.05$ désigne un effet non significatif. Group prétraité comparés au groupe traité par EPI-DTX : # $p < 0.02$ désigne un effet significatif.

La diminution de l'activité enzymatique de la SOD sous l'effet du traitement par l'EPI-DTX, peut être expliqué par la production excessive de l'anion superoxyde suite au traitement combiné des deux anticancéreux. Des études *in vivo*, dans lesquelles le système antioxydant enzymatique a été étudié ont montré la diminution de l'activité de la SOD, Tabaczar et ses collaborateurs, (2013) ont montré que l'association (DOX-DTX) conduit à une déplétion importante de l'activité de cet enzyme. Altinase et *al.*, (2014) ont montré également que l'utilisation de DTX en monothérapie entraîne une diminution de la SOD, les mêmes résultats obtenus par Wu et *al.*, (2017) montrant qu' une injection de l'EPI à une dose unique de 15 mg/kg diminue significativement l'activité de la SOD.

Le prétraitement des animaux par l'extrait de la propolis à la dose de 25mg/kg pendant 5jours avant l'injection des deux anticancéreux, permet de conserver l'activité de la SOD aux valeurs normales. Ces résultats expliquent les propriétés anti-oxydantes des polyphénols de la propolis. Sur la base de plusieurs rapports scientifiques, Tabaczar et ses collaborateurs, (2013) ont constaté que la quercétine améliore l'activité de la SOD. Ce qui suggèrent que la quercétine pourrait protéger les constituants du plasma sanguin contre les dommages d'oxydation provoqués par l'association de DOX et DTX. Keba et *al.*, (2014) ont montré aussi que le prétraitement par la propolis à (100mg/kg) augmente l'activité de la SOD et d'autres enzymes anti-oxydantes et réduit la toxicité hépatique de la doxorubicine.

2.4.3.3. Évaluation de l'activité enzymatique de la catalase

La catalase est une enzyme anti-oxydante connue par la capacité de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène et la protection des cellules contre les effets toxiques de ROS (Pieniżek et *al.*, 2013; Vatsyayan., 2016).

La figure 29 illustre l'effet de la propolis sur l'activité enzymatique de la catalase chez des rats traités par (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seules ou en association avec l'extrait de propolis (25 mg / kg).

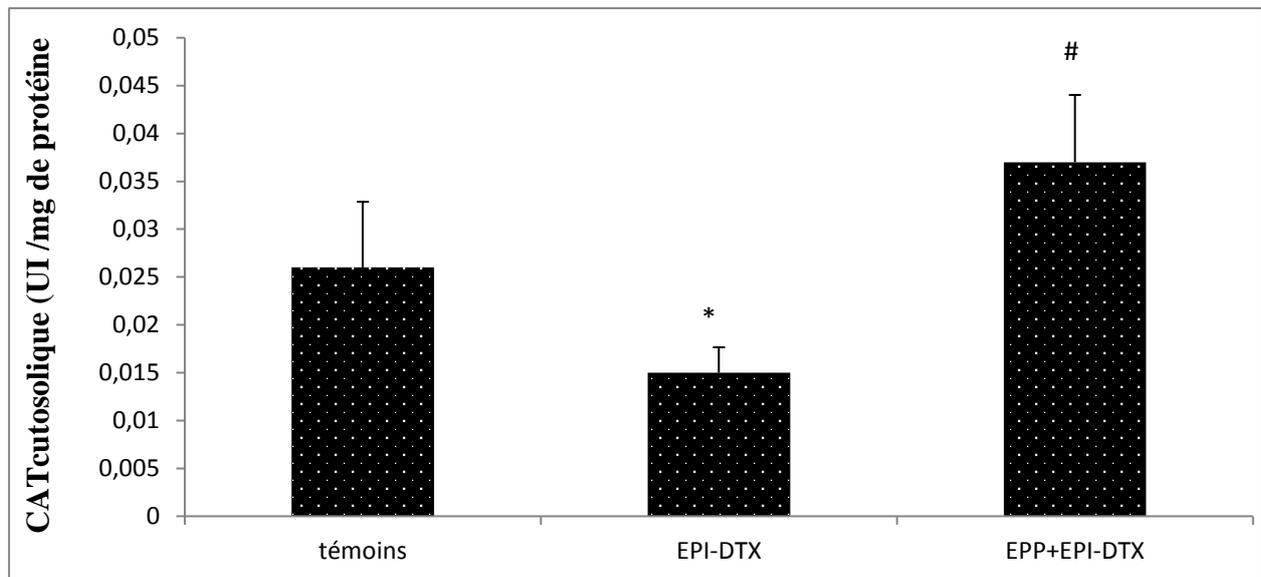


Figure 29. Variations de l'activité enzymatique de la catalase rénale après administration de (DTX 75mg/m²- EPI 200mg/ m²) seules ou en prétraitement par l'extrait de propolis (25 mg/kg/j) pendant 5jours.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart types. Test de student : comparaisons faites entre le groupe traité par EPI- DTX et le témoin : * $p \leq 0.05$ désigne un effet non significatif. Group prétraité comparés au groupe traité par EPR- DTX : ## $p < 0.01$ désigne un effet significatif.

Une diminution significative ($p < 0.05$) des activités de la catalase dans le tissu rénal des rats recevant (l'épirubicine- Taxotère) atteint (0.014 ± 0.010 UI/mg de protéines) par rapport à celle mesurée chez le groupe témoin (0.126 ± 0.007 UI/mg de protéines). Le prétraitement des rats par l'extrait de propolis a montré une élévation très significative ($p < 0.01$) de l'activité de cette enzyme qui atteint (0.032 ± 0.007 UI/mg de protéines) par rapport au groupe traité par les anticancéreux seules.

Dans notre étude, la diminution de l'activité de la catalase est peut-être due à la destruction de cette enzyme suite à une production intense des radicaux libres par le traitement associé des deux anticancéreux. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Pieniżek et *al.*, (2013) qui ont

montré une diminution de l'activité de la CAT après un traitement par l'association (DOX-DTX) à (10 mg/kg). Altinas et ses collaborateurs, (2014) ont montré une diminution de l'activité de cette enzyme chez le groupe recevant le DTX à la dose de 5 mg. kg⁻¹. Les mêmes résultats ont été obtenus par wu et *al.*, (2017) après traitement par l'EPI à (15mg/kg). Par contre le prétraitement par l'extrait de la propolis a amélioré l'activité enzymatique de la CAT. Plusieurs études suggèrent que la propolis améliore le système antioxydant par la diminution de la production de ROS et l'augmentation de l'activité enzymatique des enzymes anti-oxydantes y compris la catalase. Les flavonoïdes de la propolis préviennent les dommages oxydatifs induis par les radicaux libres sur les protéines et les acides nucléiques et de ce fait assurent le maintien de l'activité de la catalase rénale (Ulusoy et *al.*, 2016). Kebsa et ses collaborateurs, (2014), ont montré également une augmentation de l'activité de la catalase après un prétraitement par la propolis à 100mg/kg.

2.5. Etude histologique

Les coupes histologiques des reins des animaux témoins (*Figure 30*) ont montré que le tissu est sain et présente une morphologie normale du parenchyme rénale avec conservation nette des glomérules et des tubules rénaux, structure vasculaire normale avec absence de congestion et d'inflammation interstitielle.

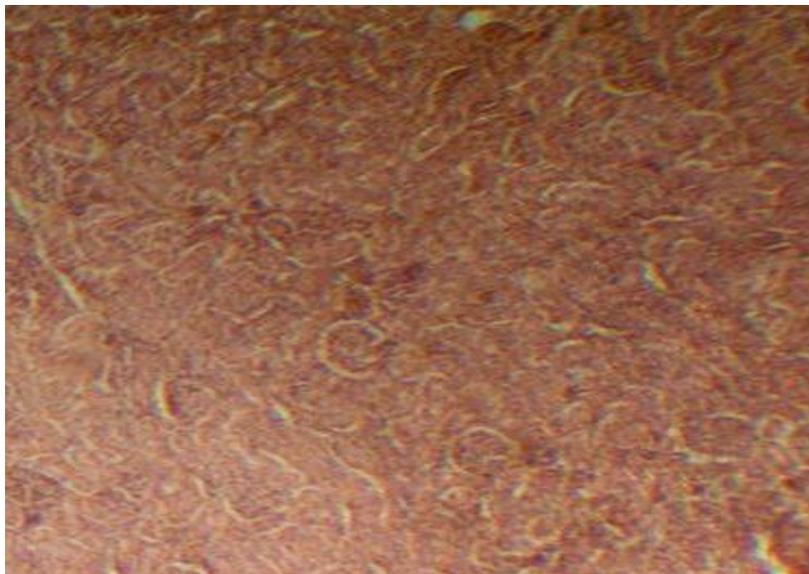


Figure 30. Coupe histologique des reins issus de groupe Témoin (X40).

Par comparaison à la figure 30 , le traitement par EPI-DTX (figure 31) a révélé des altérations morphologiques importantes,

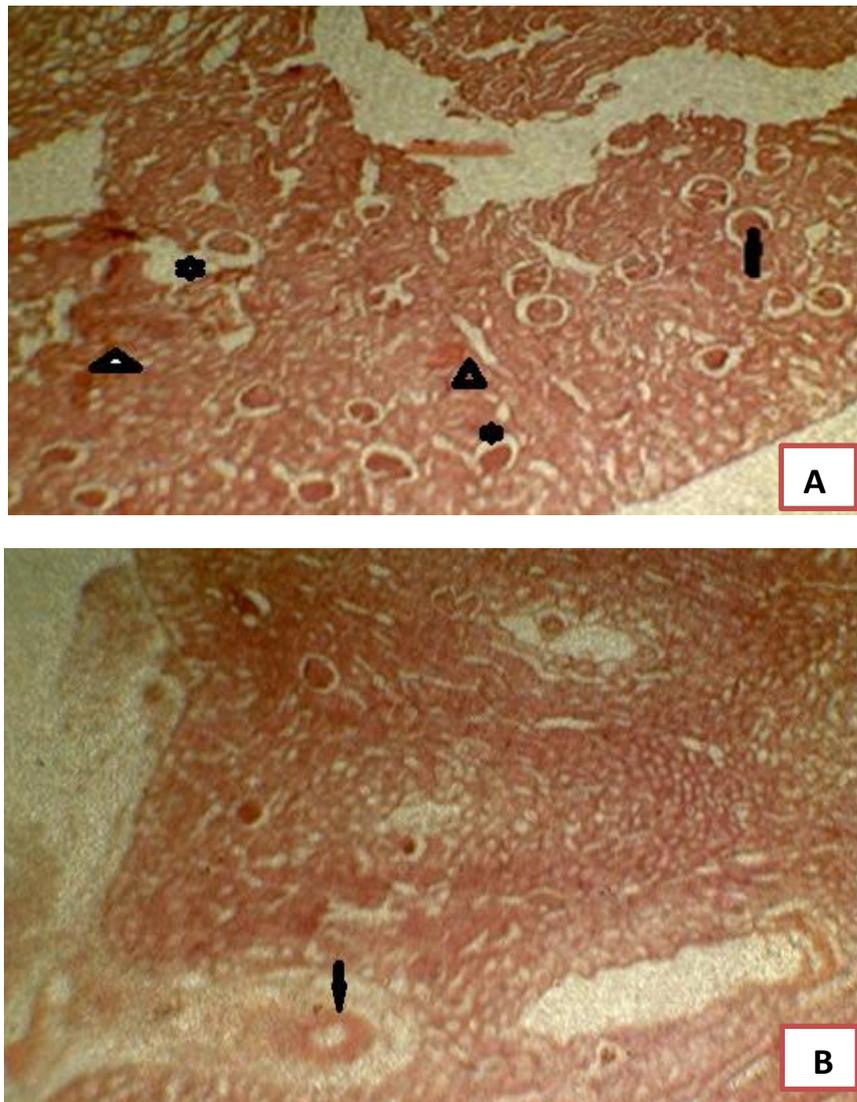


Figure 31. Coupe histologique des reins issus de groupe traité par (EPI-DTX) (X 40).

A : hémorragies interstitielles (triangle) ; dilatation tubulaire (étoile), congestion glomérulaire (flèche).
B : nécrose au niveau tubulaire.

Le prétraitement par la propolis a permis de réduire significativement les changements histopathologiques observés sous le traitement (EPI-DTX) (Figure 32).

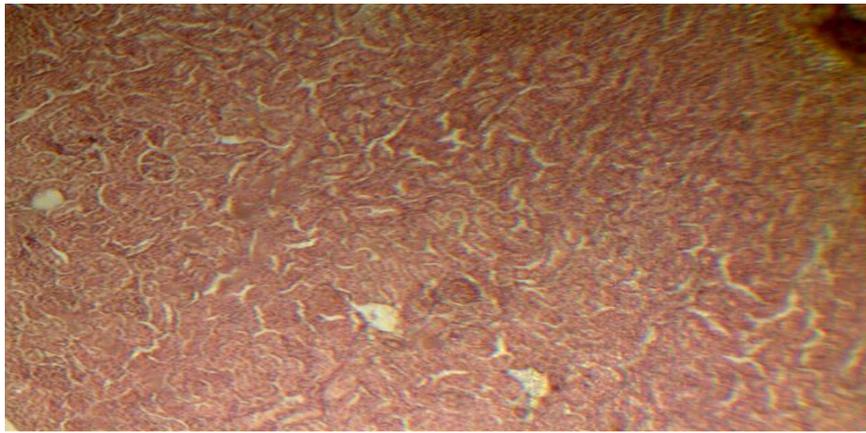


Figure 32. Coupe histologique des reins issus de groupe traité par EPP + (EPI-DTX) (X40).

La perte de la fonction rénale chez les rats souffrant d'un syndrome néphrotique induit par les médicaments anticancéreux a été associée à des anomalies structurelles, tubulaires et glomérulaires.

Dans la présente étude, l'étude histologique a révélé des changements variables au niveau de parenchyme rénal chez les rats traités par l'EPI-DTX se traduit par des altérations histopathologiques à savoir la dilatation des tubules rénaux, congestion tubulaire et nécrose tubulaire par rapport aux rats témoins. Cette variation est liée au phénomène de stress oxydatif induit par les deux médicaments anticancéreux (EPI-DTX) sur l'unité fonctionnelle du rein.

Nos résultats sont similaires à ceux déjà obtenus par (Rachid et *al.*, 2013) qui ont montré que le traitement par la DOX seule par voie intra-péritonéale à une dose unique de 40 mg/kg a provoqué des lésions glomérulaires, congestion et hémorragie interstitielle. Par contre le prétraitement par l'extrait de la propolis montre une diminution significative des altérations histopathologiques ceci explique l'effet cytoprotecteur de l'EPP contre les dommages tissulaires induites par le traitement anticancéreux.

2.6. Mécanismes pro-oxydant de (EPI-DTX) et anti-oxydant et protecteur de la propolis

La toxicité rénale de l'EPI et DTX utilisés en monothérapie comme agents anticancéreux, a été étudiée par plusieurs auteurs (Wu et *al.*, 2017 ; Takimoto *al.*, 2012), mais les mécanismes de la toxicité rénale de l'association (EPI-DTX) restent à élucider jusqu'à nos jours. La propolis possède un pouvoir antioxydant important et bien décrit par plusieurs auteurs (Alyane et *al.*, 2008; Lahoul et *al.*, 2010; Kebsa et *al.*, 2014; Teles et *al.*, 2015) .

D'après les résultats de notre étude nous pouvons proposer le mécanisme par lequel l'association (EPI-DTX) intervient dans l'induction du stress oxydatif rénal d'une part et d'autre part l'effet cytoprotecteur et antioxydant de la propolis. L'EPI (200mg/ m²) et le DTX (75mg/m²) administré en combinaison par voie intraveineuse, conduisent à la formation des métabolites réactifs et à la

production des ROS suite à leur métabolisation, menant de ce fait à l'augmentation de la consommation des molécules de défense antioxydante comme le GSH ce qui a comme conséquence l'oxydation des groupement thiols des protéine en particulier des enzymes antioxydantes comme la GST qui fonctionne en synergie avec le GSH, cela peut également être responsable de l'augmentation de la LPO et libération massive de MDA. L'augmentation de LPO est associée à une diminution de l'activité SOD qui ne pouvait pas éliminer complètement l'anion superoxyde produit lors d'un processus métabolique normal. Cet anion superoxyde peut lui-même provoquer l'initiation et la propagation de la peroxydation lipidique (Somani et *al.*, 2000; Garg et *al.*, 2009). En outre, la diminution de l'activité de la CAT chez peut être due à l'excès de radical anion superoxyde en raison d'une réduction de l'activité de SOD (Mishra et *al.*, 2013). Ce déséquilibre de la balance pro-oxydant-antioxydant que l'EPI et le DTX provoquent se traduit au niveau tissulaire par des altérations histopathologiques à savoir les changements dégénératifs des glomérules et les dilatations tubulaires.

L'extrait éthanolique de la propolis a montré une forte activité anti-oxydante ainsi qu'un effet protecteur puissant contre la toxicité rénale de l'association EPI-DTX, et ce à travers sa capacité à piéger les radicaux libres, de plus EEP protègent les membranes cellulaires soit par la réduction des taux de ROS ou la réduction des ions Fe^{+2} et de ce fait l'inhibition de la réaction de Fenton et de la peroxydation des lipides. Des études récentes montrent également que la propolis est capable d'arrêter les réactions radicalaires par inhibition de l'anion superoxyde, du radical hydroxyle et de la production des peroxydes et d'augmenter les capacités antioxydants tissulaires et donc le maintien de l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants. Grâce à ces mécanismes la propolis joue un rôle important comme puissant antioxydant et assure ainsi la protection des fonctions rénales contre la toxicité de l'association EPI-DTX.

Conclusion

Notre étude portée sur l'évaluation de l'effet de la propolis contre la toxicité rénale de l'association (EPI. 200mg/m²-DTX. 75mg/m²) a montré que :

La propolis de Kaous utilisée est très riche en polyphénols et en flavonoïdes et présente une forte activité antiradicalaire et concentration dépendante contre les radicaux DPPH°.

L'association (EPI-DTX) est cytotoxique pour le rein sur le plan biochimique se traduisant par l'augmentation de la créatinine, de l'urée plasmatique et de la γ -glutamyl-transpeptidase urinaire. Cette association induit également un stress oxydant rénal exprimé par un déficit des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques avec une augmentation de la peroxydation lipidique. Ceci est confirmé par l'apparition des modifications tissulaires sévères au niveau rénal sous forme de congestions glomérulaire, gonflement cellulaire et dilatation tubulaires.

Le prétraitement par la propolis a permis la mise en évidence d'un effet préventif contre la néphrotoxicité de l'association (Epirubicine -Docétaxel) et ce par le maintien des taux de la créatinine, de l'urée et de la γ -glutamyl-transpeptidase aux niveaux cellulaires normaux. La propolis permet également le renforcement des systèmes antioxydants enzymatiques (CAT, GST, SOD) et non enzymatiques (GSH). Elle protège les membranes contre les effets des ROS par inhibition de la peroxydation lipidique et réduction des taux du MDA. Conduisant de ce fait à la réduction des dommages tissulaires issus de l'association (Epirubicine -Docétaxel).

Il ressort clairement de notre étude, que la propolis exerce par son pouvoir antioxydant un effet préventif contre la toxicité rénale causée par l'association EPI-DTX.

Néanmoins, des études complémentaires plus approfondies sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'effet protecteur et d'identifier les molécules bioactives de l'extrait de propolis responsables de ces effets.

Références bibliographiques

- Abdelraouf K., Braggs K H., Yin T.** Characterization of polymyxin Binduced nephrotoxicity: implications for dosing regimen design. *Antimicrobial. Agents Chemotherapy*,2012; 56 (9): 4625–4629.
- Ahn MR., kunimasa K and kumazawa S.** Corelation between antiangiogenic activity and antiaxydant activity of varicose components from propolis. *molucular nutrition and food research*, 2009; 53 :643-651
- Altintas R., Ciftci O., Aydin M., Akpolat N., Oguz F and Beytur A.** Quercetin prevents docetaxel-induced testicular damage in rats. *Blackwell Verlag GmbH Andrologia*, 2014; 2014: 1–9.
- Alyane M., Benguedouar L., Kebsa W., Bousenane HN., Rouibah H and Lahouel M.** Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pakistan Journal Pharmarmaceutical Sciences*, 2008; 21 (3): 201-209.
- Ancerewiez J., Migliavacca E., Carrupt PA., testez B., Bree F., Zini R., Tillement JP., Labidalle S., Guyot D., Chauvet-Monges AM., Crevat A and le Ridant A.** Strcture-property relationship of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidant. *free radical biology and medicine*,1998; 25:1582-1588.
- Bagshow SM and Bellomo R.** Insuffisance rénale aigue : définition, épidémiologie et pronostique eds.Insuffisance rénal aigue . *In Laurent*, 2007: 13-30.
- Baker SD., Sparreboom A and Verweij J.**Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clinical Pharmacokinetics*, 2006; 45 (3): 235-25.
- Bardelmeijer HA ., Ouwehand M., Buckle T., Huisman MT., Schellens JHM., Beijnen JH and Van T.** Low systemic exposure of oral docetaxel in mice resulting from extensive first-pass metabolism is boosted by Ritonavir. *Cancer Research*, 2002; 62(21): 6158-61.
- Benguedouar L., BousenaneHN., Kebsa W., Alyane M., Rouibah H and Lahouel M.** Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats. *Indian Journal Experimental Biology*,2008; 21: 12-119.
- Bonsnes RW., Tausky HH.** On the colorimetric determination of creatinine by the Jaffe reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 1945; 158: 581-600.
- Boulouri AJ., Pakferat A., Tonkaboni A., Aledavood SA., Nadjafi MF., Delevarian Z., Shakeri MT and Mohtashami A.** Preventing and therapeutic Effect of propolis in Radiotherapy Induced Mucositis of Head and Neck Cancer :A Triple-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Iranien Journal of Cancer Prevention*, 2015; 8(5) :2-6.
- Bradford MM.** A rapide and sensitive methode for qantitation of micrograme quantities of protein utilizing the principale of dye binding. *Annals of Clinical Biochemistry*, 1976; 72 :248-252.
- Bruneton J.** Pharmacognosie .4^{ème} édition. Paris : Lavoisier, 2009 ; 261-444.
- Bruno R.,Sanderink GJ.** pharmacoknetics and metabolisme of taxoter (docetaxel). *cancer surveys*, 1993; 17: 305-13.
- Camaggi CM., Strocchi E., Comparsi R., Testoni F., Angelelli B and Pannuti F** Biliary excretion and pharmacokinetics of 49-epidoxorubicin (epirubicin) in advanced cancer patients. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 1986; 18:47–50.
- Camkurt MA., Fındıklı E., Bakacak M., Tolun FI and Karaaslan MF.** Evaluation of Malondialdehyde, Superoxide Dismutase and Catalase Activity in Fetal Cord Blood of Depressed Mothers. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 2017; 15(1) :35-39.
- Cardinault N., Cayeux MO., Percie P du Sert.** La propolis : origine, composition et propriétés, *Phytothérapie*, 2012 ;10(5) :298–304.

- Chen N., Aleksa K., Woodland C., Rieder M and Koren G.** N-Acetylcysteine prevents isosfamide-induced nephrotoxicity in rats. *British Journal of pharmacologie*, 2008 ; 153(7) :1364-1372.
- Chira K., Suh JH., Saucier C and Teissédre P L.** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* , 2008; 6: 75–82.
- Claiborne A.** catalase activity.In : Greenwald RA,eds. *CRC hanbook of methods for oxygen radical research*:283-284.
- Clemo FrancesAS.**Urinary Enzyme Evaluation of Nephrotoxicity in the Dog. *Toxicologic Pathology*, 1998;26(1): 29-32.
- Crespy V., Morand C., Besson C., Manach C., Denigne C and Remesy C.** Comparaison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *Journal of Nutrition* 2004, 131: 2109-2114
- Debab M., Toumi-Benali F and Dif MM.** Antioxidant Activity of Propolis of West Algeria. *Phytothérapie Journal*, 2016 ;016 :1085-89
- De Iuliis F., Taglieri L., Salerno G., Lanza R and Scarpa S.** Taxane induced neuropathy in patients affected by breast cancer: *Literatur review.Critical Reviews in Oncology/Hematology*,2015, 96: 34–45.
- De Rossi T., Panis C., Victorino VJ., Freitas de Freitas L., da Silva do Amaral Herrera AC., Lourenço Cecchini A, Cecchini R.** Breast Cancer and Oxidative Stress in Chemotherapy. *Applied Cancer Research*, 2009 ; 29(4):150-6.
- Desmots F and Guillouzo A.** caractérisation ‘un nouveau gène codant une glutathion transférase de la classe alpha, la GSTA4, étude de sa régulation au cours de la régénération hépatique et de la surcharge en fer, 2000 ; 1-126.
- Dussol B.** Méthodes d’exploration de la fonction rénale. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 2011 ; 26 : 6 -12.
- Dewanto V., Wu X., Adom KK and Liu R H.** Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 3010-3014.
- Edít B., Ildikó B., Anna VO., János KC and songor K.** Anthracycline Antibiotics Induce Acute Renal Tubular Toxicity in Children with Cancer *Pathology oncology research*, 2007; 2007:13 (3).
- El housseini N.** Intérêts et application cliniques de la propolis et médecine bucco-dentaire N° 024, thèse de doctorat, université de Nantes, 2013 ; 20-21.
- Ellman GL.** Tissue sulfhydryl groups. *Biochemistry and Biophysics*, 1959; 82: 70-77.
- Elm’hadi C., Tanz R., Khmamouch MR., Toreis M., Mahfoud ., Alaoui KH., Slimani1., Errihani H and Ichou M.** Toxicities of docetaxel: original drug versus generics a comparative study about 81 cases. *Springer Plus*, 2016; 5:732.
- El-Sayed el S M., Abo-Salem OM., Aly HA.** Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pakistan Journal of pharmaceutical Sciences*, 2009; 22: 168–74.
- Esposito MM., Venturini MO., Vannozzi G., Tolino G., Lunardi O., Garrone C., Angiolini M ., Viale M., Bergaglio L., Mastro D and Rosso R.** Comparative Effects of Paclitaxel and Docetaxel on the Metabolism and Pharmacokinetics of Epirubicin in Breast Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*, 1999; 17 (4): 1132-1140

- F**antini M., Benvenuto M., Masuelli L., Frajese G., Tresoldi I., Modesti A and Bei R. In Vitro and in Vivo Antitumoral Effects of Combinations of Polyphenols, or Polyphenols and Anticancer Drugs: Perspectives on Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015; 16: 9236-9282.
- Fauzee NJS., Dong Z., Wang Y-L. Taxanes: Promising Anti-Cancer Drugs. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2011; 12: 837-851.
- Floege J., Johnsson RJ., Feehally J and Mosby E. Comprehensive, clinical nephrology, 4e edition, 2010.
- Frederike K., Engels., Ron AA., Mathot and Verweij J. Alternative drug formulations of docetaxel. *a review Anti-Cancer Drugs*, 2007; 18:95–103.
- Frey J., Daudon M., Raby N., Augereau C., Dechaux M., Diehl JL., Sicallac P and Bonneau C. Valeur sémiologique des paramètres biochimiques urinaires. *Annales de Biologie Clinique*, 200; 59 (1) :13-25.
- Fridovich I and Beauchamp C. Assay of superoxide dismutase. *Analytical Biochemistry*, 1971, 44 :276-287.
- Fukasawa H., Furuya R., Yasuda H., Yamamoto T., Hishida A and Kitagawa M. Anti-Cancer Agent-Induced Nephrotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2014; 14: 921-927.
- G**anong W. Physiologie médicale. 2ème édition. Edition De boek. 2003; 427.
- Gardana C and Simonetti P. Evaluation of allergens in propolis by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011; 25: 1 675–82.
- Garg DP., Bhall P., Kiran Ravi., Bansal A and Dhawan DK. Vitamin E-mediated protection on methomyl-induced alterations in rat liver. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2009; 91(4): 685–698.
- Gee J., Dupont MS., Day AJ., Plumb GW., Williamson G and Johnson I. Intestinal transport of quercetin glucosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathways. *Journal of Nutrition*, 2000; 130:2765-2771.
- Geisberg C and Douglas BS. Mechanisms of Anthracycline Cardiotoxicity and Strategies to Decrease Cardiac Damage. *Current Hypertension Reports*, 2010; 12(6): 404–410.
- Ghasemzadeh A and Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011 ; 5(31) : 6697-670.
- Ghedira K. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie Journal*, 2005 ; 4: 162-169.
- Gligorov J. Polymorphismes et traitements neoadjuvants des cancers du sein : efficacité du docetaxel
Et polymorphisme d'ABC1/MDR1, thèse de doctorat, 2013 ; 22-23.
- Goszcz K., Duthie GG., Stewart D., Leslie SJ and Megson IL. Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response. *British Journal of Pharmacology*, 2017; 1-1.
- H**abig WH., Pabst MJ and Jakoby WB. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 1974; 25(22):7130-9.

- Haldar S.** Bcl2 is the guardian microtubule of integrity. *Cancer research*, 1997; 57(2): 229-33.
- Haldar S.** Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate. *cancer cells*, 1996; 56: 1253–1255.
- Halliwell B et Gutteridge JMC.** Free radicals in biology and medicine, 2007.
- Haschek WM., Wallig MA and Rousseaux C.** Clinical pathology. *Fundamentals of toxicologic pathology (second edition)*. Elsevier. London,2010; 43-65.
- Haslam ET.** Bitterness and astringency. In Practical polyphenolics (from structure to molecular recognition and physiological action) Cambridge University Press, 1998; 178-225.
- Hertig A et Ythurbide G.** Augmentation de la créatinine. *La revue du praticien médecine générale*, 2012 ; 152-154.
- Hickey EJ., Raja RR., Reid VE., Gross SM., Ray SD.** Diclofenac induced in vivo nephrotoxicity may involve oxidative stress mediated massive genomic DNA fragmentation and apoptotic cell death. *Free Radical Biology Medicine*, 2001; 139-152.
- Hollman PCH and Katan MB.** Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Archives of Toxicology. supplement journal*, 1998; 25: 237-239.
- Hollman P C H., Van Trijp J M P., Gaag M V D., Mengelers M J B and Katan M B.** Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters* ,1997,418:152-156.
- Ho MY and Mackey RJ.** Presentation and management of docetaxel related adverse effects in patients with breast cancer. *Cancer Management and Research*, 2014; 6: 253–259.
- HORÁKOVÁ ĀL.** Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function. *Interdisciplinary Toxicology*, 2011; 4(3): 114–124.
- Hougardy JM., Delanaye P., Le Moine A and Nortier J.** Estimation of the glomerular filtration rate by tests and equations: strengths and weaknesses. *Revue Medicale de Bruxelles*, 2014; 35: 250-7.
- Huisman MT., Chhatta AA., Van TO., Beijnen JH and Schinkel AH.** MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. *International Journal of Cancer*, 2005; 116(5): 824-829.
- Hung Ch-H., Chan Sh-H., Chu P-M., and Tsai K-L.** Docetaxel Facilitates Endothelial Dysfunction through Oxidative Stress via Modulation of Protein Kinase C Beta: The Protective Effects of Sotrastaurin. *Toxicological Sciences Journal*, 2015; 145 (1) :59–67.
- Iarussi D., Indolfi P., Casale F., Coppolino P., Adolfo M., Tedesco and Di Tullio. MT.** Recent Advances in the Prevention of Anthracycline Cardiotoxicity in Childhood. *Current Medicinal Chemistry*, 2001; 8(13): 1649-60.
- Ichikawa M.** Renal antioxidant enzymes Their regulation and fonction. *Kindney International*, 1994; 45 :1-9.
- Ihab Talat AR., Ahmed Ali AG., and Gamal Abdallah M.** Protective Effect of Quercetin against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2009; 32(1): 61-7.
- Ignat I., Volf I., Popa VI.** A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 2011; 126:1821–1835.

- Innocenti F., Iyer L., Irez JR., Mitchell D., Green and Mark J.** Ratine epirubicine glucuronidation is catalyzed by human UDP glucuronosyl transferase. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2001, 29 (5) :686–692.
- Injac R and Strukelj B.** Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 2008; 7: 497-516.
- Iqbal M., Sharma SD., Okazaki M., Jujisawa Y and Okada S.** Dietary supplementation of curcumin enhanced antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddYmalE mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocity. *Pharmacology and Toxicology*, 2003; 92, 33-38.
- Isaza C., Seigneux S and Martin PY.** Protéinurie : rappel physiologique et applications pratiques. *Revue Médicale Suisse*, 2012;8: 466-72.
- Jasprica I., Mornar A., Debeljak Z.** In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *Journal of Ethnopharmacolgy*, 2007; 110: 548–54.
- José M. Sforcin.** Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research*, 2016; 30: 894–905.
- Kamil P., Paulina K., Adam B., Katarzyna WP., Marcin K and Elżbieta P.** Metabolic carbonyl reduction of anthracyclines role in cardiotoxicity and cancer resistance. Reducing enzymes as putative targets for novel cardioprotective and chemosensitizing agents. *Investigational New Drug*, 2017; 10:0443-2.
- Karamian R et Ghasemlou F.** Screening of total phenol and flavonoid content, antioxidant and antibacterial activities of the methanolic extracts of three Silene species from Iran. *International Journal of Agricultural Crop Sciences*, 2013; 5(3): 305-312.
- Karch A., Koch A and Grünwald V.** A phase II trial comparing pazopanib with doxorubicin as first-line treatment in elderly patients with metastatic or advanced soft tissue sarcoma (EPAZ): study protocol for a randomized controlled. *Trials*, 2016 ; 17(1) :312.
- kebsa w.** Effet de la propolis algérienne sur le streese oxydatife methichondriele. these de magister, 2006: 128-138.
- Kebsa W., Rouibah H and Lahouel M.** Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014; 27(6): 1891-1897.
- Kebsa W., Rouibah H and Lahouel M.** Quercetin Protects Liver Cells and Mitochondria Against Doxorubicin Induced Oxidative Stress in Albinos' Rats, 2015; 5 (5): 331 – 338.
- KEBIECHE M.** Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse de doctorat, 2009; 26.
- Kenmotsu H and Tanigawara Y.** Pharmacokinetics, dynamics and toxicity of docetaxel: Why the Japanese dose differs from the Western dose. *Cancer science*, 2015; 106: 497–504.
- Khasraw M., Bell R., Dang CH.** Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast cancer. *A clinical review The Breast*, 2012; 21: 142-149.
- koul A., Gupta S and Prachi.** phytomodulatory potential of lycopersicum exulentum against doxorubicine induced nephrotoxicity. *Indian Journal of experimental biology*, 2013; 635-645.
- Kristen K., Campbell, MC and Rebecca A.** Wingert. Renal stem cells: fact or science fiction. *Biochemical Journal*, 2012; 444 :153–168.

- Kroon J., Kooijman S., Cho NJ., Storm G., and Pluijm Gvd.** Improving Taxane Based Chemotherapy in Castration Resistant Prostate Cancer. *Trends in pharmacological science*, 2016; 1-12.
- Kuropatnicki AK., Szliszka E and Krol W.** Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence Based Complement Alternative Medecine*, 2013; 1–11.
- Kus T., Aktas G., Kalendeabdullah ME., TuncayA., Demiryurek., Ulasli M., Oztuzcu S., Sevinc A., Kul S and Camci C.** Polymorphism of CYP3A4 and ABCB1 genes increase the risk of neuropathy in breast cancer patients treated with paclitaxel and docetaxel. *Onco Targets and Therapy*, 2016 ; 9 :5073–5080.
- Lacour B.** Physiologie du rein et bases physiopathologiques des maladies rénales. *Rein et Pathologies*, 2013 ; 25-37.
- Lahouel M., Boutabet K., Kebsa W and Alyane M.** Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2010; 4(10): 712-720.
- Lahouel M., Boulkour S., Segueni N and Fillastre JP.** The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie Biologie –Journal*, 2004; 52(6): 314-22.
- Lakey-Beitia J., Berrocal R., Rao KS., Armando A.** Durant. Polyphenols as Therapeutic Molecules in Alzheimer’s Disease Through Modulating Amyloid Pathways. *Molecular Neurobiology*. 2015, 51(2): 466-79.
- Lavoie S., Berger M., Schlögelhofer M., Schäfer MR., Rice S., Kim SW., Hesse J., McGorry PD., Smesny S and Amminger GP.** Erythrocyte glutathione levels as long-term predictor of transition to psychosis. *Translational Psychiatry*, 2017 ; 7: 1-7.
- Laurent C.** L’abeille et le conseil à l’officine. Thèse de doctorat, 2014 ; 35-36.
- Lin H., Sue YM., Chou Y.** Activation of a nuclear factor of activated Tlymphocyte 3 (NFAT3) by oxidative stress in carboplatin-mediated renal apoptosis. *British Journal of Pharmacology*, 2010; 161 (7): 1661–1676.
- Maataoui B S., Hmyene A and Hilali S.** Activités anti-radicalaires d’extraits de jus de fruits du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*, 2006; 7(1): 3-8.
- Mackler N J and Pienta K J.** Drug Insight: use of docetaxel in prostate and urothelial cancers. *Nature clinical practice urology* ,2005 ;2(2):92-100.
- Manach C., Morand C., Texier O., Favier M L., Agullo G., Regerat F and Remesy C.** Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets contaming rutin or quercetin. *Journal Nutrition* ,1995;125: 1911-1922.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesty C et Jimenez L.** Polyphenols: Sources and bioavaiblability. *The American journal clinical Nutrition* ,2004 ;9 (5): 727-747.
- Mansouri E., Kooti W., Assarehzadegan M A., Dehbashi F N.** Effect of Pravastatin on Levels of Filtration Slit Diaphragm Protein and Oxidative Stress in Doxorubicin- Induced Nephrotoxicity. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research Jan-Mar*, 2017 ;51 (1) :77-82.
- Menotti G., Pierantonio M., Emanuela. S., Gaetano C ., et Luca Gianni .** Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 2004; 56 :185–229.
- Minotti G., Cairo G., Monti E.** Role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *The FASEB Journal*, 1999; 13(2):199-212.

- Mishra S K., Singh P., and Rath S K. Protective Effect of Quercetin on Chloroquine-Induced Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Mice. *Malaria Research and Treatment* .2013; 2013(2013): pages 10
- Mohan M., Kamble S., Gadhi P et Kasture S. Protective effect of Solanum torvum on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2010 ;48(1):436-40.
- Monegier B., Gaillard C., sablé S and Vuilhorgne M. Structures of the major human metabolites of docetaxel (RP 56976 - Taxotere®). *Tetrahedron Letters*,1994;35(22):3715-3718.
- Nassar A A O., Amal N E A A., Hussam., Mohammed Z., Mohamed A-h., Manal M H., Mongi M A A et Salah M E S. Hepatoprotective Effects Exerted by Propolis against Doxorubicin-induced Rat Liver Toxicity: A Biochemical and Histopathological Study, *Journal of Cancer Prevention*, 2016;4(3): 36-40.
- Nieuweboer AJM., Smid M., de Graan A-JM., Elbouazzaoui S., de Bruijn P., Eskens,PH.,Amberg F., MartensJWM., Sparreboom A., de Wit R., van Schaik RHN and Mathijssen RHJ. Role of genetic variation in docetaxel-induced neutropenia and pharmacokinetics. *The Pharmacogenomics Journal*, 2015 ;3: 1–6.
- Okhawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*,1979;95, 351- 358.
- Pan H., Shen K., Wang X., et al. Protective effect of metalloporphyrins against cisplatin-induced kidney injury in mice. *PLoS One revue*, 2014; 9 (1):86-57.
- Pedraza-Chaverri J., Cruz C., del Socorro Blancas M., Hernández Pando R., Ibarra-Rubio ME.,Larriva-Sahd J., Tapia E. Angiotensin I converting enzyme activity in uranyl nitrate induced acute renal failure in rats. *Renal failure* ,1995: 17(4): 377-88.
- Pelletier P. Examen sommaire et microscopique des urines à ne pas sous-estimer. *Le Médecin du Québec*,2014,49 (12): 35-41
- Pérez-Jiménez J., Neveu V., Vos F., Scalbert A. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol- explorer database *Agric Food. Chemistry journal* ,2010;58:4959–4969.
- Periyasamy L., Deshiredy S., Jestadi D B and Jambhulkar S. Quercetin Attenuating Doxorubicin Induced Hepatic, Cardiac and Renal Toxicity in Male Albino Wistar Rats. *American Journal of phytomedicine and clinical therapeutics*, 2014; 2 (8) :985-1004
- Pieniazzek A., Czepas J., Piasecka-Zelga J., Gwo zdzinski K and Koceva-Chyla A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel., *Advances in Medical Sciences* ,2013; 58:104–111.
- Pietta P G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 2000;63: 1035.
- PORTES E. Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse Doctorat : Université de Bordeaux ,2008
- Procházková D., Boušová I and Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids, *Fitoterapia-Journal-Elsevier* ,2011 ; 82 : 513–523.
- Raguenez-V G., Lahouel M., Ducastelle T., Morin J P. and Fillastre J P. CCNU-Adriamycin association induces earlier and more severe nephropathy in rats. *Archives toxicology*, 1988;61: 282-291.

- Rajni A., Jibodh J., Lagas S., Bastiaan N., Beijnen J H and Jan H M S.** Taxanes: Old drugs, new oral formulations. *European Journal of Pharmacology*, 2013 ;717:40–46.
- Rashid S., Nemat A., Sana N., Shiekh T A., Wani A., Syed K H., and Sarwat S.** Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2013; 23(5): 337–345.
- Ray T S., Sidhartha D., Lahoti DP., Venkatesh T and Robert B.** Doxorubicin-Induced In Vivo Nephrotoxicity Involves Oxidative Stress Mediated Multiple Pro- and Anti-Apoptotic Signaling Pathways. *Current Neurovascular Research*, 2012; 9: 282-295.
- Rechner A R., Spencer J P E., Kuhine G et Rice-Evans C.** Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid and derivatives in vivo. *Free Radical Biology and Medicine –Journal-Elsevier*, 2000; 30: 1213- 1222.
- Richard S., Vander H et Thomas J. L’Ecuyer.** Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Heart and Metabolism*, 2007; 35:1–4
- Ringel I and Horwitz SB.** Studies with RP 56976 (taxotere): a semisynthetic analogue of taxol. *Journal of the National Cancer Institute*, 1991;83 :288-91.
- Robaczewska J., Kedziora-Kornatowska K., Kozakiewicz M., Zary-Sikorska E., Pawluk H., Pawliszak W., Kedziora J.** Role of glutathione metabolism and glutathione- related antioxidant defense systems in hypertension. *Journal of physiology and pharmacology*, 2016; 67, 3: 331-337.
- Robert J.** Epirubicin. Clinical pharmacology and dose-effect relationship. *Drugs*, 1993 ;45 2:20-30.
- Rodrigo R and Bosco C.** Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2006;142 :317–327.
- Roser V and Jordi B.** Taxane-Induced Peripheral Neurotoxicity. *Toxics*, 2015; 3:52-169.
- Rowinsky E-K.** The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annual Review of Medicine*, 1997; 48: 353–374.
- Sahinler N and Kaftanoglu O.** Natural product propolis: chemical Composition. *Natural Product Research*, 2005; 19(2): 183–188.
- Shahidi F., Janitha PK and Wanasundara PD.** Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1992; 32: 67-103.
- Shlipak MG., Sarnak MJ., Katz R., Fried LF., Seliger SL.** Cystatin C and the risk of death and cardiovascular events among elderly persons. *New England Journal Medicine*, 2005; 352: 2049–60.
- Shou M., Martinet M., Kozekwa KR., Ganzalez FJ., Gelboin HV.** Role of human cytochrome P450 3A4 and 3A5 in the metabolism of taxotere and its derivatives: enzyme specificity, interindividual distribution and metabolic contribution in human liver. *Pharmacogenetic*, 1998; 8(5): 391-401.
- Silva-Carvalho R., Baltazar F., and Almeida-Aguiar C.** Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015; 206-439.
- Silverthorn DU.** Physiologie humaine. Une approche intégrée. Pearson Ed. 4e edition, 2007.
- Šimunek T., Štirba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R and Gerši V.** Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron *Pharmacological Reports*, 2009; 61(1):154-71.

- Singleton VL., Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*,1965; 16: 144-158.
- Somani SM., Husain K., Whitworth C., Gary LT., Malafa M and Rybak LP. Dose-Dependent Protection by Lipoic Acid against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats: Antioxidant Defense System. *Pharmacology & Toxicology*, 2000; 86: 234–241.
- Staren’kii VP., Vasil’ev L., Nikitchenko I V ., Uzlenkova NE., Dziuba VN., Medvedeva EP and Dikii NP. Effect of subtherapeutic doses of docetaxel (taxotere) on the efficacy of radiotherapy and pro-oxidant-antioxidant balance in rats with Guerin’s carcinoma., *Radiatsionnaia Biologia Radioecologia*, 2003; 43: 640–646.
- Stelman JM. Encyclopédie de sécurité et santé du travail. Edition originale anglaise. 3ème édition, 2000 ; 88 .
- Sultana S., Verma K and Khan R. Nephroprotective efficacy of chrysin against cisplatin-induced toxicity via attenuation of oxidative stress. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2012; 64: 872–881.
- Surapaneni KM and Jainu M. Comparative effect of pioglitazone, Quercetin and hydroxyl citric acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in experimental non-alcolic streatohepatitis. *Journal of physiology and pharmacology*, 2014; 65(1): 67-74.
- Surangi H., Thilakarathna and H P., Vasantha R. Flavonoid Bioavailability and Attempts for Bioavailability Enhancement. *Nutrients*, 2013; 5(9): 3367-3387.
- Swamy A V., Gulliaya S., Thippeswamy A ., Koti Basavaraj C., Manjula DV. Cardioprotective effect of curcumin against doxorubicin-induced myocardial toxicity in albino rats , *Indian Journal of Pharmacology*, 2012; 44 (1):73-77
- T**abaczar S., Gwozdziński K and Koceva A. Quercetin attenuates oxidative stress in the blood plasma of rats bearing DMBA-induced mammary cancer and treated with a combination of doxorubicin and docetaxel. *General Physiology and Biophysics*, 2013; 32: 535–543.
- Takimoto T., Nakabori T., Osa A., Morita S., Terada H., Oseto S., Iwazawa T and Abe K. Tubular nephrotoxicity induced by docetaxel in non small cell lung cancer patients, *Internationale Journale Clinicale Oncologie*, 2012; 17: 395–398.
- Teles T., Silva TM ., Junior F., Honorato VH., Costa H., Barbosa A., De Oliveira S., Porfirio Z., Liborio A., Borges R and Fanelli F C. Brazilian Red Propolis Attenuates Hypertension and Renal Damage in 5/6 Renal Ablation. *PloS One revue*, 2015; 10(1).
- Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*,2010; 2(12): 1231–1246.
- U**lusoy VCH., Ozturk I and Sonmez M. Protective effect of propolis on methothrexate induced Kidney Injury in the rat. *Renal Failure Journal*, 2016; 38(5):744-50.
- V**acher VL., Bagnis CI., Janus N., Karie S and Deray G. Chimiothérapie et toxicité rénale. *Bulletin du Cancer*, 2008, 95: 96-103.
- Vatsyayan P and Goswami P . Highly Active and Stable Large Catalase Isolated from a Hydrocarbon Degrading *Aspergillus terreus* MTCC 6324. *Enzyme Research*, 2016.
- Vauzour D. Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012;1–16.

-**veloz J., Saavedra N., Lillo A., Alvera M., Barrientos L and Salazar T.** Antibiofilm activity of chilean propolis on *Streptococcus mutans* iS influenced by the Year of collection. *biomed Research Internationale*, 2015; 291-351.

-**Vibet S.** Augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux Parle acides gras polyinsaturés n-3 :rôle du statut oxydant et de la vascularisation tumorale. Thèse de doctorat, 2008: 1-38.

-**Villanueva M., Gonzalez M., Ferneadez H., Wilson M., Manquian N., Orth C and Orth L.** In vivo antibacterial activity of chilean propolis agains *Helicobacter pylorie*. *Revista Chilena Infectologia*, 2015; 32(5): 530-5.

-**Viens P., Roché H., Kerbrat P., Pierre., Guastalla J., DelozierT.** Epirubicin–Docetaxel Combination in First-Line Chemotherapy for Patients with Metastatic Breast Cancer. *American Journal of Clinical Oncology*,2001 ;4(4) :328–335.

-**Vishal S., Vaidya., Michael A., Ferguson and Joseph VB.** Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2008; 48: 463–493.

- **Waikar SS., Betensky RA and Bonventre JV.** Creatinine as the gold standard for kidney injury biomarker studies. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2009; 24: 263-3265.

-**Wagh VD.** Propolis A Wonder bees Product and its pharmacological Potentials. *Advences in Pharmacological Sciences Journal*,2013; 308-249.

-**Wang X., Sankarapandian K., Cheng Y., Woo SO., Kwon HW., Perumalsamy H and Joon A Y.** Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea.,*BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016; 18: 16-65.

-**Weenen H ., van Maanen JM., de Planque MM., McVie JG and Pinedo HM.** Metabolism of 49-modified analogs of doxorubicin. Unique glucuronidation pathway for 49-epidoxorubicin. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 1984; 20: 919–926.

-**Williams RI., Spencer JP and Rice-Evans C.** Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. *Free Radical Biology Medecine –Journal –Elsevier*, 2004; 36(7): 838-849.

- **Wu J., Xu L., Sun C., Zhang B., Li J., Sun J., Zhang Y and Sun D.** Paeonol alleviates epirubicin-induced renal injury in mice by regulating Nrf2 and NF-κB pathways. *European Journal of Pharmacology*,2017; 795: 84–93.

- **Yeung T., Simmonds R H., and Hopewell J W.** The relative toxicity of intravenous and intraperitoneal doses of epirubicin. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* ,1989 ,24:211-218.

Annexe

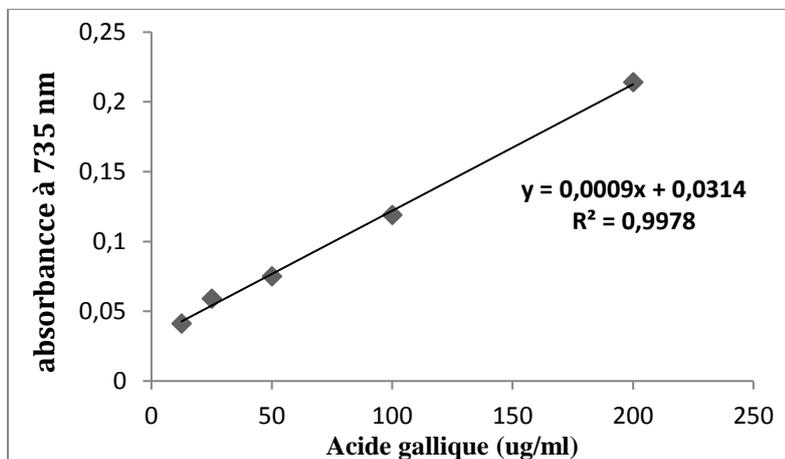


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de dosage des polyphénols en µg/ml (acide gallique comme standard), (moyennes de 3 essais)

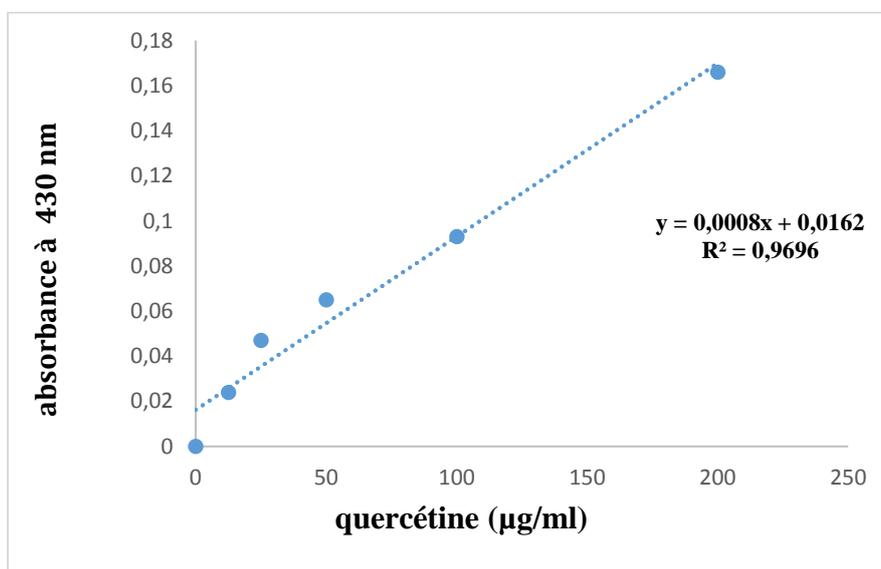


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de dosage des flavonoïdes en µg/ml (quercétine comme standard), (moyennes de 3 essais)

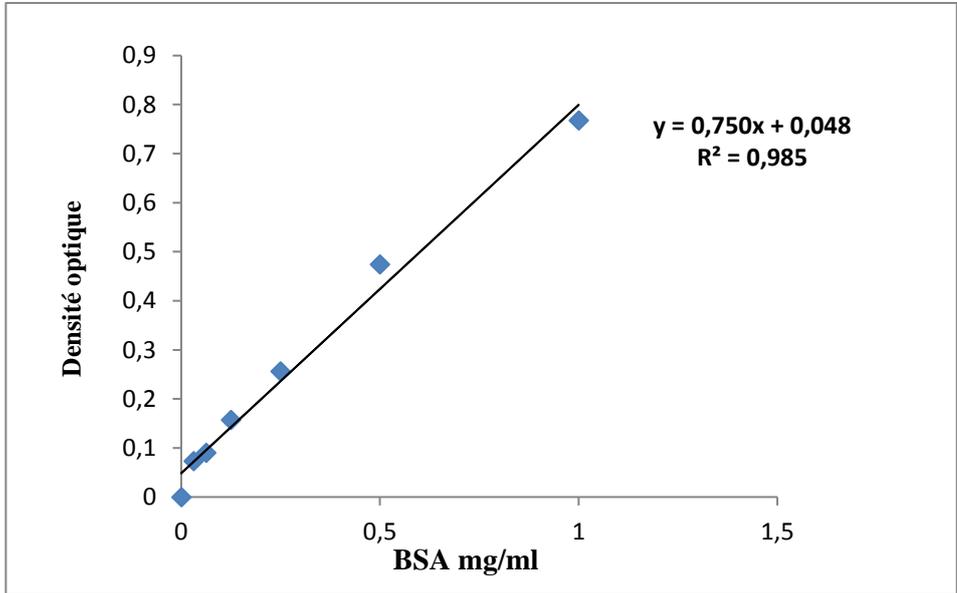


Figure 3 : Courbe d'étalonnage des protéines (BSA comme standard)

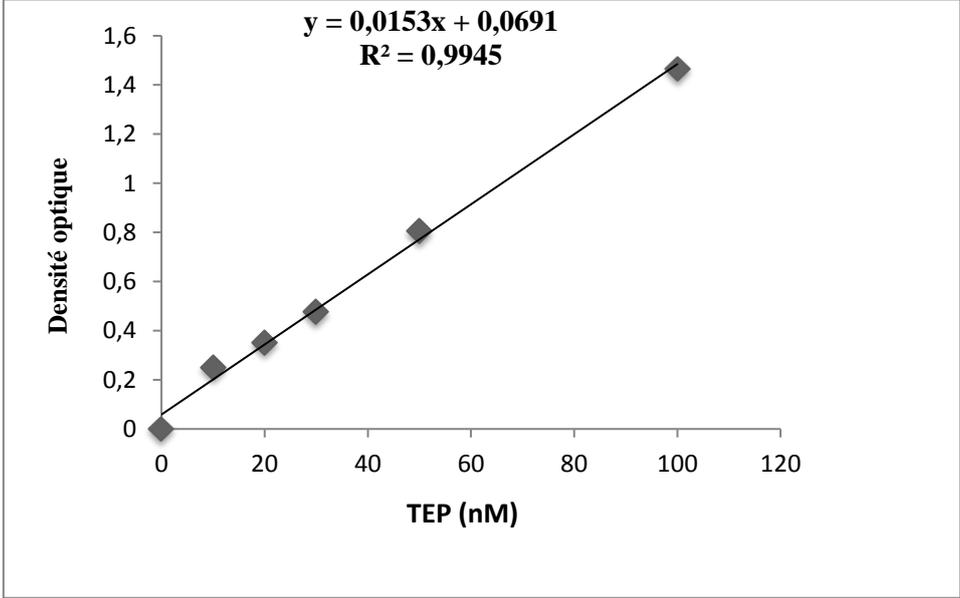


Figure 4 : Courbe étalon du MDA (TEP comme standard)

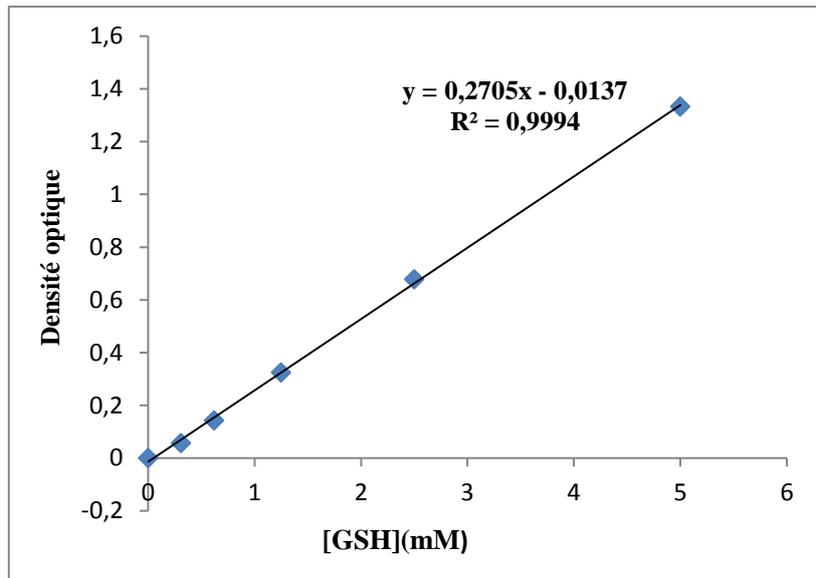


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de glutathion

Réalisée par :

- Bensaci Sihem .
- CHeurfi Loubna.
- CHidekhe Amina

Encadré par :

- KEBSA W.

Effet des polyphénols de la propolis contre la toxicité rénale de l'association (Docetaxel–Epirubicine)

Résumé

L'épirubicine et le Docetaxel sont parmi les médicaments les plus actifs pour le traitement du cancer du sein d'une part, néanmoins ils provoquent de très graves dommages rénaux, surtout en cas d'association. Leur toxicité est due essentiellement aux dommages oxydatifs liés à la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Notre étude vise à évaluer l'effet de la propolis contre la toxicité rénale de l'association (EPI–DTX). L'étude phytochimique a montré que la propolis est riche en polyphénols et en flavonoïdes et possède une activité anti-radicalaire concentration dépendante contre le radical libre DPPH°. Une augmentation des taux de la créatinine, de l'urée plasmatique et de la γ -GT urinaire chez les rats traités par l'association (EPI 200 mg/m²–DTX 75 mg/m²) a été enregistré, ainsi qu'une augmentation significative de malondialdéhyde comme marqueur de la peroxydation lipidique et une diminution des capacités des antioxydants non enzymatique (GSH) et enzymatique (GST, SOD et CAT). Le prétraitement par la propolis à (25 mg/kg /jour) pendant 5 jours a permis de protéger le tissu rénal par le maintien de l'équilibre de la balance antioxydant–prooxydant et la correction du bilan rénal. L'étude histologique a confirmé la toxicité rénale de l'association (EPI-DTX) et l'effet préventif de la propolis.

Mot Clés : EPI, DTX, Toxicité rénale, Propolis, ROS.

Abstract

Epirubicin and Docetaxel are among the most active drugs for the treatment of breast cancer on the one hand, nevertheless they cause very serious kidney damage, especially in case of combination. Their toxicities are mainly due to oxidative damage related to the formation of the reactive oxygen species (ROS). Our study aims to evaluate the effect of propolis polyphenols against renal toxicity of the combination (EPI-DTX). The phytochemical study showed that propolis is rich in polyphenols and flavonoids and has a concentration dependent anti-radicalar activity against the free radical DPPH°. Increased levels of creatinine, urea and urinary γ -GT in rats treated with the combination (EPI 200 mg/m² –DTX 75 mg/m²) were recorded, as well as a significant increase in malondialdehyde as lipid peroxidation marker and a decrease in non-enzymatic (GSH) and enzymatic (GST, SOD and CAT) antioxidants capacities. Pretreatment with propolis (25 mg/ kg/ day) for 5 days protected renal tissue and corrected (EPI-DTX) toxicity by maintaining the antioxidant-prooxidant balance and kidney functions. The histological study confirmed the renal toxicity of the combination (EPI-DTX) and the preventive effect of propolis.

Key words: EPI, DTX, Renal toxicity, Propolis, ROS.

المخلص

الابروبوسين (EPI) و الدوستاكسال (DTX) من بين الأدوية الأكثر نشاطا لعلاج سرطان الثدي من جهة، ومن جهة أخرى فإنهما يسببان أضرارا بليغة على سلامة الكلى وخاصة في حالة الجمع بينهما. تكمن مخاطرها في قدرتهما على تشكيل الجذور الحرة الاكسجينية مما يتسبب في حدوث ضرر تأكسدي للخلايا. تهدف دراستنا الى تقييم دور متعددات الفينول المستخلصة من الدنج ضد السمية الكلوية الابروبوسين و الدوستاكسال (EPI-DTX). أظهرت الدراسة الكيميائية النباتية أن الدنج غني بمتعددات الفينول و الفلافونويدات ولديه تأثير متعلق بالتركيز ضد الجذر الحر DPPH°. تم تسجيل زيادة في مستويات الكرياتينين واليورينا و ال γ -GT البولية عند الجرذان المعالجة ب (EPI 200 mg/m²–DTX 75 mg/m²) ، فضلا عن زيادة معنوية في المالونديالدهيد (MDA) كمعيار تقييمي لأكسدة الدهون , مصحوبة بانخفاض في مضادات الاكسدة الغير انزيمية (GSH) والانزيمية (GST, SOD, CAT). المستخلص الايثانولي للدنج بتركيز بجرعة يومية (25مغ/كغ) لمدة 5 أيام تمكن من تصحيح الاضرار الناتجة عن التسمم الكلوي ل (EPI-DTX) و ذلك عن طريق الحفاظ على التوازن بين مسببات و مضادات الاكسدة و تصحيح معايير الوظيفة الكلوية . أكدت الدراسة النسيجية السمية الكلوية ل(EPI-DTX) و التأثير الوقائي للدنج.

الكلمات المفتاحية: الابروبوسين، الدوستاكسال، التسمم الكلوي، الدنج الجذور الحرة.

