

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2016

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

❖ *Mahdjouba Lakehal*

❖ *Fatima Zohra Bendjelloul*

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: NUTRITION ET SANTÉ**

**THÈME**

L'effet des polyphénols de la propolis de  
Tigzirt sur l'hépatotoxicité induite par  
l'épirubicine chez les rats Wistar.

Soutenu publiquement le 31/05/2016

DEVANT LE JURY

Président            **A. Chaalel**  
Encadreur           **Y. Boufadi**  
Co-encadreur       **S. Chaa**  
Examineurs         **S. Keddari**

**MCB U. Mostaganem**  
**MCA U. Mostaganem**  
**Doct. U. Mostaganem**  
**MCB U. Mostaganem**

*Thème réalisé au Laboratoire de LMBAFS*

*Dédicaces :*

*Je dédie ce travail à tous ceux que j'aime  
et que j'estime en particulier :*

*A mes parents qui m'ont toujours  
soutenue avec beaucoup d'amour.*

*A mes sœurs Fatma, Zohra et Salima pour  
leur amour, leur patience.*

*A mes frères pour leurs soutiens éternels,  
Et à tout ma famille.*

*A tous mes amis surtout Amina , Khadidja,  
Naçéra, zahra et à toute la promo du  
Nitrution et Santé.*



Mahdjouba.

## *Dédicaces*

*A l'aide de dieu j'ai pu réaliser ce modeste travail que je le dédie à tous ceux que j'aime et que j'estime en particulier :*

*A ma chère mère, Nana, ceux qui m'ont donné sans rien en retour*

*A mes parents, pour leur amour, leur présence et leur soutien de chaque instant.*

*A ma sœur, pour leur amour, leur patience et leur soutien éternel.*

*A mes frères, pour son amour.*

*A ma famille*

**A tous mes amis**



*Fatima zohra*

## *Remerciements*

*Avant tout, nous adressons premièrement nos sincères remerciements à Dieu, notre créateur qui nous a toujours guidés jusqu'au terme de ce projet.*

*Nous remercions Professeur Ali Riazi, responsable du master Nutrition et Santé et directeur du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS) pour son accueil et ses conseils.*

*Un merci tout particulier au Dr. Yasmina BOUFADI Maitre de Conférences à l'université de Mostaganem, de nous avoir encadré avec un grand cœur, pour ses conseils et son suivi tout au long de cette étude, nous lui assurant le témoignage de notre profonde reconnaissance.*

*On remercie aussi Melle Sara Chaa de nous avoir Co-encadrés, pour leur disponibilité, pour les précieux conseils constructifs qu'ils ont prodigués et nous n'oublie pas leur patience et gentillesse.*

*Nous remercions Dr. Soumia Kaddari, Maitre de Conférences à l'université de Mostaganem, pour l'honneur et le plaisir d'examiner ce modeste travail.*

*Nos remerciements s'adressent également au Dr. Abdelmalek Chaalel, Maitre de Conférences à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté de présider ce jury.*

*Nous tenant à remercier également tous nos enseignants du département de biologie, aussi Belhamiti Mustapha, Touil Amel, Saymi Yahiya, Otsman el haou Sihem et Bendjerrmikh Latifa qui nous ont aidé et encouragés.*

# Sommaire

Introduction

Remerciment

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

## **Chapitre I : La propolis et ses vertus thérapeutiques**

I.1. Historique	01
I.2. Définition	01
I.3. Origine de la propolis	02
I.3.1. Origine botanique	02
I.3.1.1. Propolis des zones tempérées	02
I.3.1.2-Propolis des zones tropicales	03
I.3.2.Origine de la propolis algérienne	04
I.4.Récolte de la propolis	05
I.4.1.Par les abeilles	05
I.4.2. Par l’homme au niveau de la ruche	06
I.5. Conservation de la propolis	07
I.6. Propriétés de la propolis	07

I.6.1. Propriétés physiques	07
I.6.2. Caractères organoleptiques	08
I.7. Composition chimique	08
I.8. propriétés biologiques de la propolis	09
I.8.1. Antimicrobienne	09
I.8.1.1. Antiviral	10
I.8.1.2. Antifongique	10
I.8.1.3 Antiparasitaire	10
I.9. Anticancéreux	10
I.10. Activité anti-angiogénique	10
I.11. Activité immunomodulatrice	11
I.12. Activité anti-inflammatoire	11
I.13. Activité cicatrisante et régénératrice	11
I.14. Activité antioxydant /anti radicaux libres	11
I.15. Effet cardiovasculaire	12
I.16. Effet digestives	12
I.17. Effet hépatoprotecteur	12

## **Chapitre II : L'hépatotoxicité et les dérivés de la chimiothérapie**

II.1. L'hépatotoxicité	13
II.1.1. La toxicité moléculaire directe	14

II.1.2. La toxicité moléculaire indirecte	14
II.1.3.La toxicité mixte	14
II.2. Mécanismes d'hépatotoxicité	15
II.3. Les produits de la chimiothérapie : Cas des anthracyclines	17
II.4. L'EPURIBICINE	17
II.4.1Mécanismes d'action d'Epirubicine	18
II.4.1.1. Intercalation dans l'ADN	18
II.4.1.2. Inhibition de la synthèse de macromolécules	18
II.4.1.3. Inhibition de l'hélicase	18
II.4.1.4. Inhibition de la topoisomérase II	18
II.4.2.Activités biologiques d'Epirubicine	19
II.4.3 Les effets secondaires d'Epirubicine	19

### **Chapitre III : Matériels et méthodes**

III.1.Origine de la propolis utilisée	20
III.2.Préparation de l'extrait de la propolis	20
III.3.Epirubicine	21
III.4.Animaux, conditions de l'expérience et les différentes analyses des prélèvements sanguins	22
III.5.Analyse des paramètres sériques	24
III.5.1.Dosage de NFS Numérotation formule sanguine	24
III.5.2Dosage de protéines totales	24

III.5.3. Dosage de l'albumine	25
III.5.4. Dosage de la glycémie	25
III.5.5. Dosage de la triglycéridémie	25
III.5.6. Dosage de la Cholestérolémie	26
III.6. Biomarqueur d'hépatotoxicité	26
III.6.1. Dosage de l'ASAT/ALAT	26
III.6.2. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)	26
III.6.3. Dosage du gamma glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT)	27
III.7. Détermination du statut antioxydant	27
III.7.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	27
III.7.2. Dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)	28
III.7.3. Dosage Peroxydation lipidique (malonaldéhyde MDA)	29
III.7.4. Dosage de glutathion hépatique (GSH)	29

## **Chapitre 1V : Résultats et discussion**

IV.1. Dosage de FNS (formule de numération sanguine)	31
IV.2.1. Dosage de protéines totales	32
IV.2.2. Dosage d'albumine	33

IV.2.3. Dosage de la glycémie	34
IV.2.4. Dosage de la triglycéridémie	36
IV.2.5. Dosage de la cholestérolémie	37
IV.6. Dosage de l'ASAT	39
IV.7. Dosage de l'ALAT	40
IV.6.7. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)	41
IV.6.8. Dosage du gamma glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT)	42
IV.7.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	43
IV.7.2. Dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)	44
IV.7.3. Dosage Peroxydation lipidique ( malonaldéhyde MDA)	45
IV.7.4. Dosage de glutathion hépatique (GSH)	47

Conclusion

Références bibliographiques

## **Liste des figures et des tableaux**

<b>Figure 1:</b> Butineuse récoltant et portant deux gouttelettes de propolis.	01
<b>Figure 2:</b> Récolte de la propolis par l'abeille.	05
<b>Figure 3 :</b> Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche.	06
<b>Figure 4 :</b> Composition de la propolis.	09
<b>Figure 5 :</b> Différents types d'hépatotoxicité médicamenteuse selon les cellules atteintes.	13
<b>Figure 6 :</b> Principaux mécanismes et différents types d'hépatotoxicité.	16
<b>Figure 7 :</b> Propolis brute.	21
<b>Figure 8 :</b> L'extrait de propolis.	21
<b>Figure 9 :</b> Un flacon d'EPI.	22
<b>Figure 10 :</b> Les rats wistar dans leurs cages.	23
<b>Figure 11 :</b> solution de la propolis 200mg/kg/j(à gauche), propolis 50mg/kg/j (au milieu) et Rutin(à droite)	24
<b>Figure 12 :</b> Un rat lors de la prise du Rutine.	24
<b>Figure 13 :</b> Principe de dosage du glutathion.	30
<b>Figure 14:</b> les protéines totales (g/l) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et d'epirubicine.	32
<b>Figure 15:</b> L'albumine (g/l) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutin et d'epirubicine.	34
<b>Figure 16:</b> La glycémie (g/l) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutin et d'épirubicine	35
<b>Figure 17 :</b> le triglycéride (g/l) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutin et d'épirubicine.	36
<b>Figure 18:</b> Cholestérolémie (g/l) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutin et d'épirubicine.	38

- Figure 19 :** AST (unité/ml) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert (EAP), de rutine et d'épirubicine. 39
- Figure 20 :** ALT (unité/ml) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert (EAP), de Rutin et d'épirubicine. 40
- Figure 21 :** PAL (U/l) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'épirubicine. 41
- Figure 22 :**  $\gamma$  GT (U/mgHb) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'épirubicine. 42
- Figure 23 :** CAT (U/mgHb) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'épirubicine. 43
- Figure 24 :** SOD (U/cgHb) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert (EAP), de Rutine et 9 mg/kg d'épirubicine. 44
- Figure 25 :** MDA (nmol/ml) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'épirubicine. 46
- Figure 26 :** GSH (U/mgHb) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'épirubicine. 47
- Tableau 01 :** Origine de la propolis des zones tempérées.
- Tableau02 :** Origine de propolis des zones tropicales.
- Tableau03 :** Les résultats du dosage de formule de numération sanguine.

## **Liste des abréviations**

**A** : Absorbance

**ALAT** : Alanine amino transférase

**ANTS** : Les anthracyclines

**ASAT** : Aspartate amino transférase

**CAT** : catalase.

**Conc** : concentration

**Cu<sup>2+</sup>** : le cation de cuivre.

**DOX** : doxuribucine

**DTNB** : Dithiobis 2-nitro benzoïque

**EAP** : extrait d'acétate d'éthyle de la propolis

**EDTA** : Ethylène diamine tétra-acétique.

**EEP** : l'extrait éthanolique de la propolis.

**EPI** : Epiribucine

**EtOAc** : éthyle acétate

**G** : groupe.

**G/dl** : gramme /dici litre.

**G/l** : gramme/litre

**GSH**: glutathion hépatique.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)

**HCV** : hépatite C

**MDA** : malonaldéhyde.

**mg/kg** : milligramme /kilogramme.

**mg/ml** : milligramme/millilitre

**min**: minute

**mmol/l** : milimol/litre

**mol/l** : mole/ litre

**NBT** : nitroblue de tetrazolium

**NFS**: numération formule sanguine.

**NIH- USA**: Nationale Institute of health- United State American.

**nm**: nano mitre.

**No<sup>-</sup>** : monoxyde nitrique

**PAL** : la phosphatase alcaline

**PBS** : Le tampon phosphate saline

**RE** : réticulum endoplasmique.

**ROS** : Reactive oxygen species

**SOD**: superoxyde dismutase.

**Sp**: espèce

**T** : témoin

**TNB** : Thionitrobenzoïque

**TNP** : tétraméthoxypropane

**UI/L** : unité inter national/ litre.

**γ GT** : gamma glutamyl transférase

**λ**: la longueur d'onde

**U/ml** : unité /millilitre

**μl** : micro litre

## **Résumé**

Cette étude explore l'effet des polyphénols de l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis (EAP) de Tizert sur certains paramètres de statut antioxydant et les marqueurs de l'hépatotoxicité chez les rats Wistar soumis à une hépatotoxicité induite par l'épirubicine (EPI). Un total de 25 rats males de poids moyen entre 200 et 250 g. Les rats ont été divisés en 5 lots et recevant de l'EAP ou la rutine (comme flavonoïde standard) avant et après l'induction de l'hépatotoxicité par l'épirubicine en injection intraveineuse (i.v). En fin d'expérience, les prélèvements sanguins ont été effectués par ponction cardiaque.

Les résultats obtenus indiquent que chez les rats soumis à l'hépatotoxicité et non traité par l'extrait d'éthyle de la propolis on remarque une diminution de taux du cholestérol, de triglycéride, d'hémoglobine d'une part et d'autre part une augmentation de la glycémie, d'albuminurie, le taux de protéine totale et aussi augmentation des biomarqueurs d'hépatotoxicité (TGP, TGO, PAL,  $\gamma$ -GT). L'effet des polyphénols de l'extrait d'éthyl de la propolis de Tizert sur les marqueurs d'hépatotoxicité et le stress oxydatif apparait chez les rats traités par la dose de 200 mg/kg/j où il y a une amélioration de leur formule numérotation sanguine (FNS) avec une baisse de MDA et une augmentation du SOD, CAT et GSH hépatique.

Les polyphénols d'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert permet de rétablir les perturbations de l'homéostasie, d'une part la prévention des rats d'un dysfonctionnement hépatique et d'autre part le maintien d'un statut redox équilibré dans les hépatocytes.

**Mots clés** : Hépatotoxicité, rat Wistar, propolis, statut antioxydant, homéostasie.

## **Abstrat**

This study explores the effect of polyphenols of the ethyl acetate extract of propolis (EAP) Tizirt on some antioxidant status parameters and markers of hepatotoxicity in Wistar rat with hepatotoxicity induced epirubicin (EPI) . A total of 25 rats average weight of males between 200 and 250 g . The rats were divided into 5 groups and receiving EAP or rutin ( as standard flavonoid ) before and after induction of hepatotoxicity by épurubicine by intravenous injection ( i.v. ) . End of the experiment , blood samples were taken by cardiac puncture.

The results obtained indicate that in rats subjected to hepatotoxicity and not treated with the extract of propolis ethyl we notice a cholesterol decrease rate , triglyceride , hemoglobin on the one hand and on the other hand an increase in blood sugar, albuminuria , the rate of total protein and also increased biomarkers of hepatotoxicity ( TGP , TGO , PAL,  $\gamma$ -GT) . The effect of polyphenols of ethyl extract of propolis Tizirt on markers of liver toxicity and oxidative stress appears in rats treated with 200 mg / kg / day where there is an improvement in their blood formula dialing (NSF ) with a decrease of MDA and increased SOD , CAT and hepatic GSH.

The ethyl acetate extract polyphenols propolis Tizirt resets the disruption of homeostasis on the one hand prevention of rat liver dysfunction and secondly maintaining a status redox balance in hepatocytes .

**Keywords :** Hepatotoxicity, Wistar rat, propolis, antioxidant status , homeostasis.

## **Introduction**

Le foie est un organe central qui assure des fonctions essentielles à l'homéostasie de l'organisme. Il s'agit de fonctions de synthèse (par exemple de protéines), de métabolisme (par exemple du glucose), de dégradation (par exemple de médicaments) et d'excrétion (par exemple de bilirubine) [Richard \(2014\)](#). Les lésions du foie induites par les médicaments représentent actuellement un des aspects les plus fascinants de l'hépatologie, du fait de leur diversité, de leur fréquence, de leur mécanisme, de la difficulté de leur reconnaissance, et de la difficulté de leur prédiction ([Benhamou, 1986](#)).

L'hépatotoxicité se définit par la capacité d'une substance à détruire les cellules du foie. Dans la grande majorité des cas, cette destruction est liée à la prise d'un médicament : on parle alors d'hépatotoxicité médicamenteuse ([Benhamou, 1986](#)).

Les médicaments anticancéreux comme la daunorubicine, la doxorubicine et l'épirubicine. (EPI) ont des effets hépatotoxiques ([Nielsen et al., 1990](#) ; [Allen, 1992](#) ; [Goebel, 1993](#)).

Les mécanismes biochimiques impliqués dans la hépatotoxicité ne sont pas clairement élucidés, mais il a été suggéré que l'épirubicine est susceptible d'induire une hépatotoxicité en produisant des ROS au cours de son métabolisme ([Germain et al., 2003](#)).

Dans les conditions biologiques normales, il existe un équilibre entre les taux intracellulaires des ROS et les systèmes antioxydants endogènes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et le glutathion (GSH). Il est connu que l'exposition des organismes à des facteurs exogènes et endogènes pourvus d'un pouvoir prooxydant pouvant produire un déséquilibre redox intracellulaire au profit d'une vaste gamme de ROS [Halliwell et Gutteridge \(2007\)](#). Ensuite, ces ROS sont susceptibles d'oxyder les molécules environnantes en milieu biologique (les acides nucléiques, les lipides, les glucides, les protéines) [Farber \(1994\)](#) en provoquant des lésions cellulaires se terminant par la nécrose ou l'apoptose ([Halliwell et Gutteridge, 2007](#)).

Il est reconnu que l'intervention de la nutrition peut augmenter l'apport de phyto-antioxydants pouvant réduire la menace des radicaux libres ([Arora et al., 2003](#)).

Les polyphénols jouent un rôle chémoprotecteur vis-à-vis du stress oxydatif produit dans le cytosol et les mitochondries de l'hépatocyte, lors de l'administration de L'EPI aux animaux de laboratoire. Par leur pouvoir scavenger contre les espèces réactives de l'oxygène, ils possèdent une activité antioxydante ([Kebieche, 2009](#)).

La propolis a été depuis des siècles un thème très intéressant qui attire l'attention des chercheurs grâce à ces propriétés antibactérienne [Boyanova et al. \(2002\)](#), antioxydante [Martini et Seiller \(2006\)](#), anti-inflammatoire [Park et al. \(2002\)](#), détoxifiante et hépatoprotectrice ([Sauvager, 2014](#)).

Notre présente étude s'inscrit dans la mise en évidence, à priori, des aspects biochimiques et toxicologiques de l'hépatotoxicité induite par l'EPI au niveau du foie et à fortiori, une évaluation de l'effet chémoprotecteur de ces mêmes compartimentations cellulaires suite de l'administration des extraits d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizert en association avec cet anticancéreux chez les rats.

## **Chapitre I : La propolis et ses vertus thérapeutiques**

### **I.1. Historique**

Pour comprendre l'étymologie du mot "propolis", il faut se tourner du côté du grec ancien où les mots "pro" et "polis" signifient respectivement "devant, en avant de" et "ville, cité"; en d'autres termes le sens "devant la cité" ferait référence à la propolis placée à l'entrée de la ruche par les abeilles pour prévenir l'intrusion de prédateurs. Il est aussi possible que propolis vienne du latin "propolire" qui signifie "enduire"; la propolis étant en effet utilisée par les abeilles pour enduire et lisser l'intérieur de la ruche (Maryadele et al., 2001).

Les abeilles ouvrières récupèrent la propolis sur les arbres et arbustes et la stockent ensuite dans leur corbeille à pollen située sous leurs pattes arrières. Lorsqu'elles ramènent la propolis à la ruche, les abeilles maçonnes s'en emparent et commencent immédiatement à la travailler. La propolis est alors mélangée à la cire, les abeilles y ajoutent aussi un peu de leur propre salive pour la rendre plus malléable (Finstrom et al., 2010).

### **I.2. Définition**

La propolis est formée à partir des résines végétales sécrétées par les bourgeons et l'écorce de certains arbres. La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source qu'elle attaque avec ses mandibules. Elle décolle les fragments de résine, les mélange avec ses mandibules et les incorpore à sa salive. Puis, tête redressée, elle se recule afin d'étirer la particule saisie jusqu'à ce qu'elle soit transformée en un fil et que celui-ci se rompe. Enfin, elle entasse et loge les gouttelettes formées dans ses corbeilles et les rapporte à la ruche (fig. 1) (Prost, 2005 ; Donadieu, 2008).



**Figure 1:** Butineuse récoltant et portant deux gouttelettes de propolis (Gharbi, 2011).

La propolis est donc utilisée en médecine populaire depuis les temps les plus reculés. Son utilisation sans avoir été permanente s'est poursuivie au fil des années jusqu'à ce qu'elle soit redécouverte de façon relativement récente. Ces dernières années de nombreux travaux ce sont intéressés à la composition chimique et aux effets biologiques de cette substance. Ces travaux ont montré que cette substance est composée essentiellement de flavonoïdes. Cette composition varie en fonction de son origine, de l'espèce d'abeille et du temps de la récolte (Boufadi et al., 2014).

### **I.3. Origine de la propolis**

#### **I.3.1. Origine botanique**

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'origine botanique de la propolis, en se basant sur leurs observations et dans certains cas en se référant à des connaissances chimiques faibles qui comportent des comparaisons entre échantillons de propolis et matériel végétal. Les plantes et les arbres sécrètent une substance résineuse et gommeuse pour se protéger des insectes, des bactéries et des moisissures lorsqu'elles sont blessées. Après plusieurs études, Crane a établi une liste de plantes suspectées d'être la source de la propolis. La collecte de la propolis est une activité rare des abeilles, difficile à observer. Elle se fait souvent au niveau des arbres (Bankova et al., 2000). C'est pour cette raison que nous ne discuterons que les résultats des études de comparaisons chimiques entre la propolis et les plantes pour les deux zones : tempérée et tropicale.

##### **I.3.1.1. Propolis des zones tempérées**

Plusieurs études ont démontré que dans les zones tempérées : en Europe, Afrique du Nord, Asie et en Amérique du Nord, la source principale de la propolis est le peuplier (*populus. sp*) avec toutes ses espèces (Francisco et al., 1993). Les espèces utilisées sont comme suit (tableau 1) :

**Tableau 01 :** Origine de la propolis des zones tempérées.

Les zones tempérées	Les espèces (source végétale)
Europe	<i>Populus nigra</i> (Maciejewicz et al., 2001).
Bulgarie	<i>Populus nigra</i> , <i>Populus nigra italia</i> , <i>P.trenula</i> (Bankova et al., 1994 ; Marcucci 1995).
Albanie	<i>Populus nigra</i> (Bankova, 1994).
Mongolie	<i>P. suaveolens</i> (Bankova et al., 1994 ; Marcucci, 1995).
USA	<i>Populus fremontii</i> (Greenway et al., 1990)

### I.3.1.2. Propolis des zones tropicales

Dans les zones tropicales où le peuplier est inexistant, les abeilles cherchent une autre source de propolis. Chaque région et chaque colonie à une plante préférée comme il est cité dans le tableau suivant (tableau 2) :

**Tableau 2 :** Origine de propolis des zones tropicales.

Les zones tropicales	Les espèces (source végétale)
Brésil	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC (Lopez et al. 2003), <i>aroucacia</i> , <i>vernomia</i> , <i>diclenia</i> , <i>hyptis</i> (Santos et al. 2003) et <i>eucalyptus</i> (Lopez et al., 2003).
Venezuela	<i>Clusia major</i> et <i>Clusia minor</i> sont la source principale de la propolis (Valcic et al., 1999).
Australie	<i>Xanthorrhoea pressii</i> Endl et <i>X. australis</i> (Francisco et al., 1993).
Hawaii	<i>Plumeria accuminata</i> AIT, <i>P. rubra acutifolia</i> , <i>Schinus terebinthifolius</i> et <i>Psidium guajava</i> (Francisco et al., 1993)

La connaissance de la source végétale de la propolis est très importante pour sa standardisation chimique. La propolis est ainsi facilement caractérisée (Merghem et al., 2011).

### **I.3.2. Origine de la propolis algérienne**

Selon la flore botanique disponible en Algérie, on peut déduire que notre propolis est d'origine soit du pin (*Pinus sp*) qui occupe les zones semi arides, le chêne (chêne liège et chêne zeen) qu'on trouve au nord-est du pays, châtaignier, Cyprès (*Cupressus sp*) casuarina, et le peuplier (*Populus sp*). D'après une étude faite sur la propolis algérienne, récoltée dans quatre régions (Tlemcen, Guelma, M'silla et Tizi-Ouzou) nous pouvons conclure que : Les échantillons analysés ont comme source principale le Peuplier (*Populus nigra*) avec la participation d'autres espèces. Sauf pour l'échantillon de Tizi-Ouzou, car on remarque L'absence de Pinocembrin, Pinobanksin, Chrysin et Galangin (Moudir, 2004).

### **I.4. Récolte de la propolis**

#### **I.4.1. Par les abeilles**

La récolte de la propolis est faite par un nombre restreint d'abeilles ouvrières butineuses. Ces ouvrières sont très spécialisées dans cette activité puisqu'elles ne semblent pratiquement effectuer aucun autre travail au sein de la colonie et cela même si la demande s'en fait sentir. Leur travail se limite au colmatage de l'intérieur de la ruche (Merghem, 2001).

La récolte qui ne répond pas à des règles bien définies et constantes, dépend de nombreux facteurs :

- Facteurs saisonniers : la récolte a lieu, selon les cas, soit en début de saison (c'est à dire au printemps) soit le plus souvent à la fin de la miellée, ou à l'approche de l'automne (au moment où la colonie commence ses préparatifs d'hivernage). De plus il faut noter, que c'est au moment où la miellée de nectar est la plus abondante, que la récolte de la propolis est la moins importante, les abeilles semblent alors y consacrer moins de temps et moins d'efforts (Lavie, 1975).

- Facteurs géographiques : il n'a été constaté que les ruches situées dans les régions boisées récoltent plus que les ruches de plaines (Hegazi, 1997).
- Facteurs climatiques (la température): les abeilles récolteuses de propolis déploient leur activité au cours des journées chaudes (température supérieure à 20°C) et en particulier pendant les heures les mieux exposées à cette chaleur (soit entre 10 h et 15 h 30 en moyenne). Ceci est dû au fait que les substances ramassées sont trop dures pour être exploitées en dehors de ces horaires (Hegazi, 1997).
- Facteurs liés à la race d'abeille: il est reconnu que les caucasiennes et certaines autres races d'Asie mineure (celle d'Anatolie centrale en particulier), en général, davantage que les autres. Dans de nombreux autres cas, les données concernant ce facteur sont encore insuffisantes pour établir des comparaisons précises (Hegazi, 1997).

Cette récolte s'effectue schématiquement de la façon suivante :

- La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source. Ensuite elle l'attaque avec ses mandibules, enfin elle détache la particule saisie ;
  - Elle l'entasse dans l'une des corbeilles de ses pattes postérieures (3<sup>ème</sup> paire) à l'aide de ses autres pattes pour accumuler ainsi progressivement une pelote (fig. 2) (qui est en général un peu plus petite qu'une pelote de pollen) qu'elle rapportera à la ruche (Segueni, 2011).



**Figure 2:** Récolte de la propolis par l'abeille (Segueni, 2011).

#### **I.4.2. Par l'homme au niveau de la ruche**

La propolis peut être récoltée selon deux techniques diverses :

- Raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche (fig. 3), de préférence par température assez basse. La propolis alors dure et friable se détache mieux (Lavie, 1975).
- Utilisation de différents dispositifs: grille moulée en matière plastique ou en métal. On pose cette grille comme couvre cadres. Les abeilles s'empressent d'obturer ces trous de propolis. Le moment idéal se situe après la récolte d'été, les abeilles se consacrent plus facilement à cette tâche, sachant l'hiver proche (Krell, 1996). Cette dernière technique est meilleure.

La quantité récoltée est très variable. Elle est sous la dépendance de facteurs qui conditionnent la propre récolte par les abeilles. Elle se situe en moyenne entre 100 et 300 g par ruche et par an. Cette propolis brute doit être purifiée avant toute utilisation (Lavie, 1975).



**Figure 3 :** Récolte de la propolis par l'homme au niveau de la ruche (Segueni, 2011).

#### **I.5. Conservation de la propolis**

La propolis se conserve assez facilement, dans de bonnes conditions, sans précautions. Mais il paraît néanmoins préférable de la garder dans des récipients opaques, bien fermés et à l'abri de la lumière et de la chaleur (à 10 ou 12°C de préférence). De nombreuses expériences ont montré que le stockage de longue durée de la propolis ne diminue pas sa teneur en

composants chimiques, ni ses activités biologiques. Cependant, pour en obtenir de meilleurs effets et résultats, il vaut toujours mieux l'utiliser la plus fraîche possible. Il faut signaler enfin, que la lyophilisation de la propolis (dessiccation obtenue par congélation brutale à basse température, suivie d'une sublimation sous vide, permettant d'obtenir une poudre poreuse qui se conserve indéfiniment sous vide) maintient aussi ses propriétés biologiques (Krell, 1996).

## **I.6. Propriétés de la propolis**

### **I.6.1. Propriétés physiques**

- consistance variable selon la T°: dure et friable à 15°C, molle à 30 et gluante et collante au-delà et fond à 60, 70°C. (Sauvager, 2014).
- Densité : 1,2
- La propolis est peu ou pas soluble dans l'eau. Selon Bankova et *al.* (1998) quelques composants de la propolis sont solubles dans l'eau bouillante. Elle est soluble partiellement dans l'alcool (éthanol, méthanol), l'acétone, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, l'éther, le trichloréthylène, le glycol...etc. (Justin, 1996).
- Seul un mélange adéquat de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (Justin, 1996).

### **I.6.2. Caractères organoleptiques**

- Couleur : De couleur très variable selon sa provenance, allant du jaune clair (conifères) au brun très foncé, presque noir en passant par toute une gamme de brun extrême riche et étendue (rougeâtre, verdâtre, etc.) (Sauvager, 2014).
- Odeur : D'odeur variable selon son origine, en général arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille...etc.) .Si elle est brûlée, elle dégage une odeur d'encens très délicate et très recherchée en rapport avec les résines aromatiques (Metzner et *al.*, 1997).

- Saveur : âcre, piquante, parfois amère, qui donne une insensibilisation de la muqueuse buccale (Sauvager, 2014).

### **I.7. Composition chimique**

La composition chimique de la propolis est extrêmement complexe. Elle est composée essentiellement de cire, résine et produits volatiles. La cire est sécrétée par les abeilles. Les deux autres composants proviennent des sécrétions des plantes butinées lors de la collecte de la propolis (Marcucci, 1995).

La composition chimique de la propolis a éveillé l'intérêt de nombreux chercheurs. Plusieurs travaux ont été effectués sur des propolis de différents pays et ont abouti aux conclusions suivantes : la composition chimique de la propolis varie selon l'origine botanique Bankova *et al.* (2000) ; Negri *et al.* (2000) ; Popova *al.* (2002), l'espèce d'abeille, le temps de la récolte et la zone géographique Ghisalberti (1979), mais elle présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable.

D'une manière générale la propolis est composée de 45 à 55% de résine contenant principalement des flavonoïdes et des acides phénoliques ainsi que leurs esters, 25 à 35% de cire, 3% de pollen et 3% d'autres composés organiques avec comme minéraux: calcium, magnésium, fer, zinc, silice, potassium, phosphore, manganèse, cobalt et vitamines: A, B1, B2, B3, C, E, H et la vitamine P Ghisalberti (1979) ; Ivanov (1980), Sucres (D-glucose, D-fructose), Acides Aminés (sérine, glycine, acide glutamique, acides aspartique, tryptophane, phénylalanine, leucine, arginine, proline) (fig. 4) (Sauvager, 2014).

### **I.8. Propriétés biologiques de la propolis**

La propolis est connue par de nombreuses propriétés :antibactérienne Ghisalberti (1979) ; Velikova *et al.* (2000), antivirale Dimov *et al.* (1991) ; Murad *et al.* (2002), anti-inflammatoire Miyataka *et al.* (1997), anti-oxydante, anticancéreuse Burdock (1998) ....etc. Son efficacité une fois prouvée lui a valu un intérêt particulier par l'ensemble des chimistes,

biochimistes, biologistes, pharmacologues...ect, qui essayent d'identifier de nouveaux principes actifs susceptibles d'être utilisés en thérapeutique (Burdock, 1998).

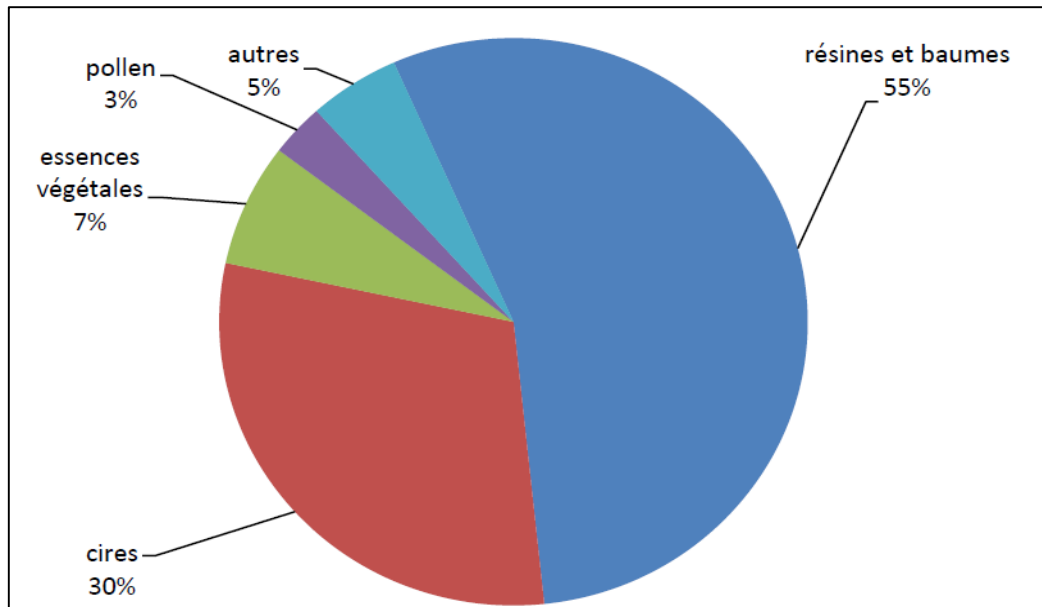


Figure 4 : Composition de la propolis (Gharbi, 2011).

### I.8.1. Antimicrobienne

Les flavonoïdes empêchent la division bactérienne, inhibent la détection du quorum, synergisent avec pénicilline et streptomycine (Grange, 1990). Grâce à ces ses activités antimicrobienne, la propolis est souvent nommée antibiotique naturel. Un grand nombre d'études ont démontré l'effet d'inhibition sur les différents microorganismes (Krell, 1996).

#### I.8.1.1. Antiviral

Les études de Schnitzler *et al.* (2010) ont montré que la propolis et ses constituants étaient efficaces contre nombreux virus : virus *Herpes* (bouton de fièvre), virus des hépatites (*HBV*, *HCV*), virus de la grippe, virus des gastroentérites (*entérovirus*, *rotavirus*)

#### I.8.1.2. Antifongique

La propolis exerce une activité fongicide contre les germes appartenant au genre *Candida albicans*, *Aspergillus* selon Ozcan (2004), et les germes de trichophyton *microsporium* (Dobrowolski *et al.* 1991).

### **I.8.1.3. Antiparasitaire**

Les études ont montré que la propolis était efficace contre les parasites vaginaux (*Trichomonas*) selon Xu et Shi (2006), aussi contre les Parasites intestinaux (*Giardia*) (Abdel-Fatteh et Nada, 2006).

### **I.9. Anticancéreux**

La propolis a également un pouvoir chémoprotecteur contre plusieurs maladies (Halliwell et Gutteridge, 2007). La propolis verte et brune (carcinome mammaire souris) (métastase osseuse et au cerveau d'une lignée c. cancer prostate) (Banskota, 2001). La propolis inhibe l'expression de la télomérase (chez cellule tumoral (Banskota, 2001).

### **I.10. Activité anti-angiogénique**

La propolis est plus spécialement l'artepelline C (propolis verte) et le CAPE (propolis de peupliers) réduisent l'angiogenèse in vitro et in vivo via une limitation de la néo vascularisation, une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire, et cette manière de dose –dépendante (Ahn et al., 2009).

### **I.11. Activité immunomodulatrice**

La propolis possède une action immune modulatrice in vitro et in vivo sur l'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou acquise (Orsatti et al., 2010).

La propolis stimule le pouvoir de présentation des macrophages et leur activité lytique contre les cellules tumorales. Elle augmente la production de cytokinines pro-inflammatoires, renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (Izuta et al., 2009).

### **I.12. Activité anti-inflammatoire**

Sur des modèles in vivo d'arthrite, d'œdème de la patte ou d'inflammation chronique et aigue, la propolis exerce un effet anti inflammatoire significatif (Ramos et Miranda, 2007).

Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés : inhibition de l'activation de certaines molécules du système immunitaire et inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie

métabolique de l'inflammation, quercétine, galangine : inhibition de la cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase et phospholipase, interleukines pro inflammatoires (Khayyal *et al.*, 1993).

### **I.13. Activité cicatrisante et régénératrice**

La Propolis entraîne la stimulation des processus de régénération tissulaire et de cicatrisation. La propolis joue un rôle nutritif notable dans l'intégrité cutanée. Ces propriétés proviennent du flavonoïde dû à la présence d'acides aminés tels l'arginine et la proline, dont on connaît le rôle dans le processus de régénération de la peau. Ils permettent d'augmenter la synthèse du collagène et est ainsi accélérer la réparation de l'épiderme abîmé (Sauvager, 2014).

### **I.14. Activité antioxydant /anti radicaux libres**

Les flavonoïdes présents dans les plantes possèdent un fort effet antioxydant (Pannala *et al.*, 1997). Cette propriété est liée aux polyphénols et aux flavonoïdes pour lesquels il a été démontré qu'ils étaient capables de casser les réactions en chaînes sur les lipides, d'inhiber les réactions de chimioluminescences et de piéger les certains ROS. Les nombreux oligoéléments et minéraux de la Propolis favorisent également l'action antioxydant (Sauvager, 2014).

### **I.15. Effet cardiovasculaire**

La propolis diminue la tension sanguine et produise un effet sédatif en maintenant le niveau de sérum du glucose dans le sang. Les dihydroflavonoïdes contenant la propolis renforcent les capillaires. Elle produit une activité antihyperlipidique (Kedzia *et al.*, 1986).

### **I.16. Effet digestives**

Elle est inhibitrice des spasmes des voies digestives. Elle protège l'estomac contre des lésions induites par l'éthanol. L'extrait de propolis agirait en inhibant la lipoxygénase et protège la muqueuse gastrique du stress oxydatif.

L'ester phényléthylque du CAPE de la propolis atténue les symptômes de la colite induite par le peptodoglycane-polysaccharide bactérien réduisant la production de cytokines pro-inflammatoires (Kedzia *et al.*, 1986).

Il est intéressant de constater que, quel que soit le pays et la race de l'abeille, l'action de la propolis et les propriétés sont toujours les mêmes, alors que ces constituants sont différents. Le champ d'action de la propolis est extrêmement vaste (Sauvager, 2014).

### **I.16. Effet hépatoprotecteur**

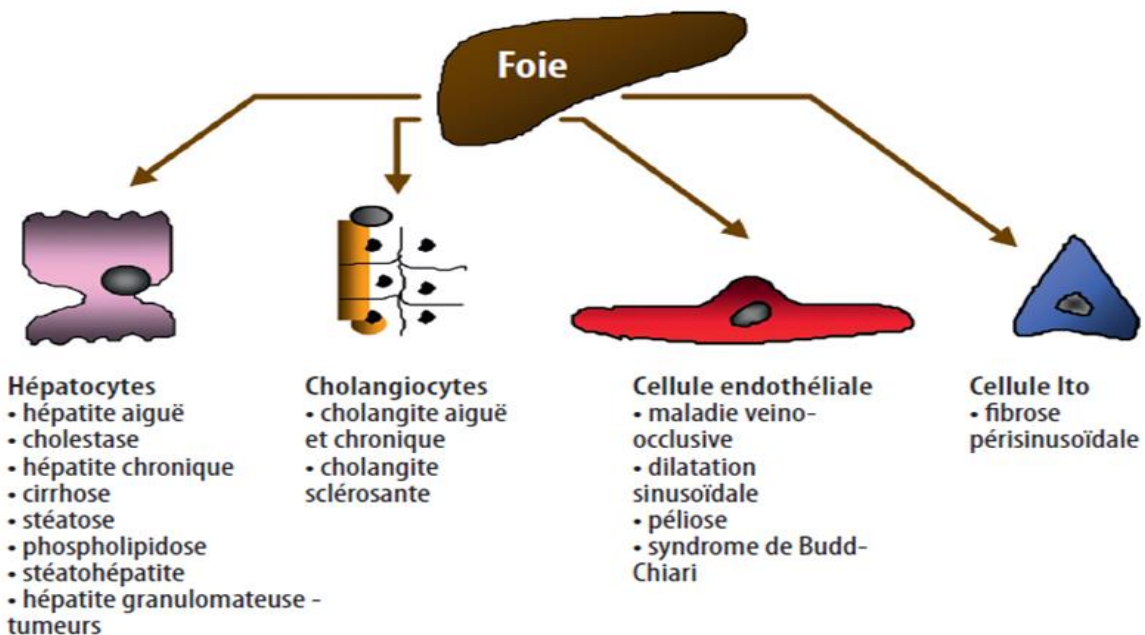
De nombreux travaux ont montré l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité des médicaments anticancéreux (Lahouel *et al.*, 2004). De plus, la propolis possède un effet hépatoprotecteur contre la toxicité du paracétamol (Seo *et al.* (2003), du CCl<sub>4</sub> (El-Khatib *et al.*, 2002) et de l'alcool (Lin *et al.*, 1999). Ces effets sont en rapport avec les propriétés antioxydantes de cette substance.

## Chapitre II : L'hépatotoxicité et les dérivés de la chimiothérapie

Le foie est un organe important car il permet à notre organisme d'éliminer les substances nuisibles aux quelles nous sommes quotidiennement exposés (Therrien, 2009). Il est le siège principal de ce métabolisme. Les médicaments absorbés au niveau intestinal vont être transformés au sein des hépatocytes avant de parvenir à la circulation générale. C'est ce que l'on appelle l'effet de premier passage hépatique, d'importance très variée (de 10 % à plus de 90 % d'un médicament à l'autre) (Benhamou, 1986). Les lésions du foie induites par les médicaments représentent actuellement un des aspects les plus fascinants de l'hépatologie (Benhamou, 1986).

### II.1. L'hépatotoxicité

Est définie comme le pouvoir qu'a une substance (comme les médicaments) de provoquer des dommages au foie. La toxicité au foie se manifeste sous forme d'inflammation ou encore de nécrose dans les cas les plus sévères. La stéatose hépatique survient lorsqu'il y a accumulation de gras dans le foie (Larrey, 2000). L'hépatotoxicité peut atteindre plusieurs cellules hépatiques (fig. 5).



**Figure 5 :** Différents types d'hépatotoxicité médicamenteuse selon les cellules atteintes (Larrey, 2000).

Il existe trois types d'hépatotoxicité (Megrebane et al., 2010).

### **II.1.1. La toxicité moléculaire directe**

Est intrinsèque obligatoire et prévisible, l'effet toxique implique la substance elle-même. Le métabolisme de nombreux xénobiotiques consomme de l'oxygène dans divers compartiment cellulaires (mitochondries, Reticulum Endoplasmique) cela a pour conséquence la production de l'anion superoxyde ( $O^{2-}$ ), qui sera converti en  $H_2O_2$  sous l'action du superoxyde dismutase, ceci se passe spécifiquement au niveau des mitochondries là ou l'élimination du  $O^{2-}$  n'est pas possible (Therrien, 2009).

### **II.1.2. La toxicité moléculaire indirecte**

Les métabolites réactifs de plusieurs médicaments sont responsables d'une hépatite dont les aspects cliniques corrèlent avec une origine immuno-allergique. Elle est idiosyncrasique facultative et imprévisible, l'effet toxique implique est relatif à un mécanisme immuno-allergique visible à la 2<sup>ème</sup> exposition caractérisé par une fièvre néosinophilie, arthralgies, exanthème. Il peut être relatif à un mécanisme idiosyncrasique (prédisposition génétique) (Therrien, 2009).

### **II.1.3. La toxicité mixte**

La toxicité mixte est prévisible, l'effet toxique implique un des métabolites réactifs de la substance en question. Le mécanisme est idiosyncrasique (prédisposition génétique polymorphisme : acétylation (halothane) (Therrien, 2009).

L'hépatotoxicité des xénobiotiques comprenant les médicaments, les plantes médicinales et les agents chimiques est un problème de santé publique et constitue un véritable challenge pour les médecins, et les agences de santé (Zimmerman et al., 1999 ; Kaplowitz et al., 2007). Pour les médecins, le challenge est double : le diagnostic pour éviter que le malade ait une aggravation de la maladie générée par un médicament et le remplacement du produit en cause pour assurer la prise en charge de la maladie concernée. Pour les autorités sanitaires, il s'agit

de permettre l'accès à des médicaments plus efficaces sans augmenter le risque sur la santé de la population. Il existe une très grande diversité des xénobiotiques mis en cause puisque, plus de 1200 médicaments « classiques » sont actuellement répertoriés auxquels il faut ajouter les produits de phytothérapie [Larrey, \(1997\)](#) ; [Stickel et al. \(2005\)](#) et les agents chimiques industriels ([Tolman et al., 2007](#)). Les lésions hépatiques induites par les xénobiotiques sont très variées. En effet, toutes les cellules du foie peuvent être atteintes ([Zimmerman et al., 1999](#) ; [Kaplowitz et al., 2007](#)).

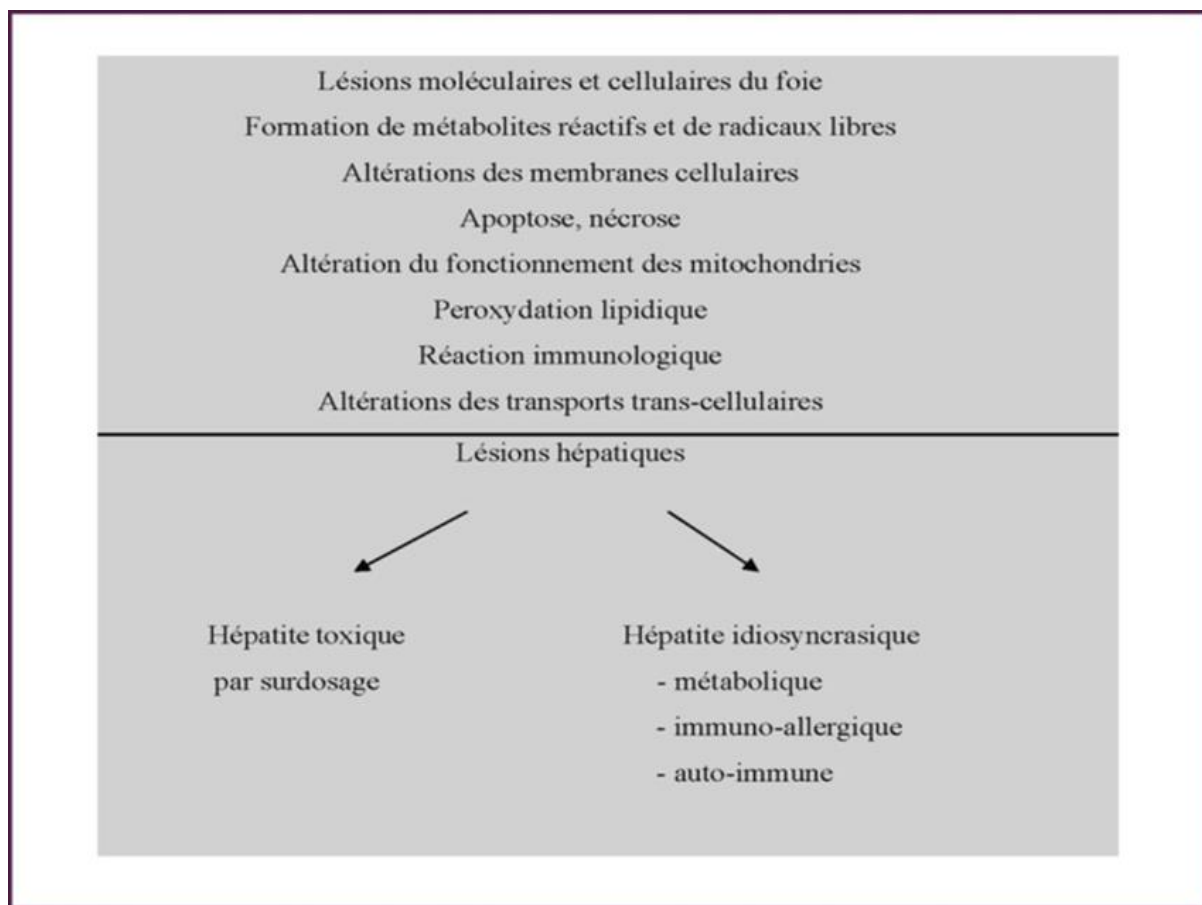
Toute médication n'est pas saine entraîne des effets secondaires surtout les radicaux libres qu'il faut atténuer par un apport nutritionnel adéquat. Malgré un grand nombre d'études ayant été faites dans ce contexte, la compréhension des mécanismes de l'induction des lésions hépatiques est encore insuffisante et n'a pas convaincu les laboratoires pharmaceutiques d'arrêter et de supprimer les médicaments les plus toxiques. Par ailleurs, il est reconnu que l'intervention de la nutrition peut augmenter l'apport de phyto-antioxydants pouvant réduire la menace des radicaux libres ([Arora et al., 2003](#)).

## **II.2. Mécanismes d'hépatotoxicité**

Les mécanismes impliqués dans l'hépatotoxicité et la cardiotoxicité par les produits de la chimiothérapie (comme l'épirubicine) ne sont pas clairement identifiés ([Germain et al., 2003](#)). D'autres travaux scientifiques suggèrent que la toxicité causée par ces anticancéreux ou leurs métabolites est médiée par la production des radicaux libres ([Le Bot et al., 1988](#) ; [Germain et al., 2003](#)).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des radicaux libres résultant du métabolisme de l'oxygène. Chez l'homme, les principaux ROS, l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ), le monoxyde nitrique ( $NO^\cdot$ ) sont constamment générés à l'intérieur de cellules suite à l'exposition aux xénobiotiques dans notre environnement ambiant et / ou à un certain nombre de métabolites endogènes impliquant des enzymes d'oxydo-réduction et de la chaîne respiratoire lors de transfert d'électrons ([Borg et Reeber, 2008](#)). Dans les conditions biologiques normales. Il est connu que l'exposition des organismes à des facteurs exogènes et endogènes pourvus d'un pouvoir prooxydant ([fig. 6](#))

pouvant produire un déséquilibre redox intracellulaire au profit d'une vaste gamme de ROS (Halliwell et Gutteridge, 2007). Ensuite, ces ROS sont susceptibles d'oxyder les molécules environnantes en milieu biologique (les acides nucléiques, les lipides, les glucides, les protéines) Farber (1994) en provoquant des lésions cellulaires se terminant par la nécrose ou l'apoptose (Halliwell et Gutteridge, 2007).



**Figure 6 :** Principaux mécanismes et différents types d'hépatotoxicité (Kaplowitz, 2004).

Cette oxydation de diverses biomolécules est également un facteur étiologique essentiel impliqué dans de nombreuses pathologies chroniques telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, la cirrhose, la maladie d'Alzheimer (Pong, 2003).

D'autre mécanisme, production des métabolites réactifs toxiques (principalement par les cytochromes P450 hépatiques ou CYP). Ces métabolites réactifs sont détoxifiés par différents systèmes de protection, comme la conjugaison au glutathion et les époxydes hydrolases.

Lorsque ces mécanismes sont insuffisants, les métabolites réactifs peuvent se lier de façon covalente sur des constituants des hépatocytes et entraîner la mort cellulaire et la perturbation fonctionnelle des protéines, lésion du matériel génétique (cassure des brins nucléotidiques).en interférant avec l'homéostasie cellulaire ou en déclenchant des réactions immunologiques (Allen et al., 1998).

Les anthracyclines (ANTS) antibiotiques antinéoplasiques restent agents chimiothérapeutiques cliniquement efficaces pour les tumeurs malignes (Kalyanaraman, 2013). Les deux médicaments les plus représentatifs de ce groupe sont la doxorubicine (DOX) et daunorubicine, bien que d'autres médicaments aient été développés au sein de cette famille (par exemple épirubicine, idarubicine).

### II.3. Les produits de la chimiothérapie : Cas des anthracyclines

Au début des années 60, des chercheurs Français et Italiens ont isolé simultanément la même molécule antibiotique à partir de souches de *Streptomyces caeruleorubidus* et *peucetius*. Le nom italien de cet antibiotique fut daunomycine Marco et al. (1963), et le nom français fut rubidomycine Dubost et al. (1963) pour enfin de compte être actuellement distribué sous le nom de daunorubicine ou daunomycine. L'activité antitumorale de cet antibiotique fut rapidement mise en évidence et il devint le chef de file d'une famille d'anticancéreux appartenant à la famille des anthracyclines. La doxorubicine (adriamycine), un analogue 14hydroxy de la daunorubicine, fut isolée d'une souche mutante de *Streptomyces peucetius varcaesius* Arcamone et al. (1969). Depuis les années 70 de nombreuses anthracyclines ont été développées au cours d'études in vitro et in vivo, et ont montré une large diversité dans leurs actions biologiques et chimiques (Muggia et Green, 1991).

### II.4. L'épirubicine

Chlorhydrate d'épirubicine (EPI) injectable est un agent cytotoxique de type d'anthracycline, destinée à être administrée par voie intraveineuse, il est d'une couleur variant entre l'orange et le rouge, poudre lyophilisée stérile dans des flacons à dose unique contenant 50 mg ou 200 mg de chlorhydrate d'EPI. Chaque flacon de 50 mg et 200 mg contient 250 mg et 1000 mg d'ingrédient inactif, le lactose, respectivement (Kalyanaraman, 2013).

EPI est un agent Intercalant : stabilisation du complexe ADN, inhibition helicase et des ARN Polymerases (Rousseau, 2014).

## **II.4.1. Mécanismes d'action d'Epirubicine**

### **II.4.1.1. Intercalation dans l'ADN**

L'épirubicine se lie de façon non covalente aux doubles-brins de l'ADN pour former un complexe [ADN-anthracycline]. Les interactions dans ce complexe sont de deux ordres, hydrophobes et électrostatiques. Les interactions électrostatiques impliquent d'une part, le groupe amine chargé positivement en C3' de la daunosamine des anthracyclines, et d'autre part le groupe phosphate chargé négativement de l'ADN (Priebe et Soler, 1993). Les interactions hydrophobes impliquent la structure anthraquinone des anthracyclines, par l'intermédiaire des cycles aromatiques B, C et D, et les paires de bases de l'ADN (Booser et Hortorbagyi, 1994). Les liaisons hydrophobes se traduisent par un empilement, qui pourrait expliquer l'atténuation de la fluorescence émise par les anthracyclines en présence d'ADN (Barthwal et al., 1994). Les sites d'intercalation ne sont pas spécifiques mais sélectifs pour les triplets de bases (Pyrimidine-Adénine-Pyrimidine), et se situent préférentiellement dans des régions associées à des délétions et de substitutions de bases (Anderson et al., 1991).

### **II.4.1.2. Inhibition de la synthèse de macromolécules**

L'inhibition de la biosynthèse des acides-nucléiques (ADN et ARN) reposent sur une intercalation directe des anthracyclines et/ou par inhibition de l'activité de l'ADN-polymérase (Gewirtz, 1999).

### **II.4.1.3. Inhibition de l'hélicase**

La mise en évidence de l'altération, par les anthracyclines, de l'enroulement ou de la séparation des brins de l'ADN par inhibition de l'hélicase a été effectuée uniquement dans des expérimentations en solution sans cellule (Gewirtz, 1999).

### **II.4.1.4. Inhibition de la topoisomérase II**

Les topoisomérases sont des enzymes chargées de réguler les conversions topologiques de l'ADN et de permettre le bon fonctionnement nucléaire. Elles sont classées en deux types d'enzymes I et II. Les topoisomérases de classe I produisent des cassures simples brins transitoires de l'ADN selon un mécanisme ATP-indépendant, et sont principalement actives pendant la transcription et l'élongation. Les topoisomérases de classe II induisent des cassures doubles brins transitoires de l'ADN afin de permettre à un segment de l'ADN de passer à travers un autre (Gewirtz, 1999).

#### **II.4.2. Activités biologiques d'épirubicine**

L'épirubicine prévient la croissance des cellules cancéreuses en parasitant l'action du matériel génétique (A.D.N.) qui est nécessaire à leur reproduction. Elle s'utilise seule ou en association avec d'autres antinéoplasiques pour traiter de nombreux types de cancer, notamment les cancers du sein, des poumons, des ovaires, de l'estomac et les lymphomes (Twelve et al., 1992).

#### **II.4.3. Les effets secondaires d'épirubicine**

- Les complications cutanéomuqueuses sont probablement celles qui engendrent le plus d'appels et de consultation de la part des patients et de son entourage. Lors de l'annonce d'un traitement par chimiothérapie un des premiers effets secondaires venant à l'esprit des patients, et principalement les femmes, après l'évocation et vomissement, et l'alopécie (Dufor, 2014).
- Dysgueusie, les patients décrivent fréquemment un changement de goût.
- Les aliments non plus la même saveur, deviennent insipides. Un goût métallique, une amertume sont décrits. La disparition du goût peut soit toucher les sensations acides, soit l'amertume (Dufor, 2014).
- Le degré d'alopécie est variable et directement dépendant de la drogue cytotoxique utilisée, de sa demi-vie et de son mode d'utilisation, bolus ou continue. La perte des

cheveux du débute généralement du traitement, les cheveux pourront changer de structure de couleur (Dufor, 2014).

- Onycholyse : ongle friable avec chute unguéale possible (Dufor, 2014).
- Diarrhées : éliminer une étiologie infectieuse (parasitaire, fongique) et carcinomateuse, Les diarrhées peuvent être (dans les 24heures suivant le traitement) ou tardives et conduire à une déshydratation majeure source de mortalité (Dufor, 2014).
- La complication cardiaque la plus fréquente survient environ dans l'année suivant la chimiothérapie sous la forme d'une dysfonction diastolique du ventricule gauche suivie dans le cas les plus sévères d'une diminution de la fonction systolique (Dufor, 2014).

L'épirubicine est limitée par des taux élevés de réactions indésirables aux médicaments, qui se caractérise par accumulée et dépendante de la dose pour provoquer le cœur, le foie, cerveau ou des lésions rénales. Ces toxicités d'organes sont dus - au moins en une partie - par le fait que les fourmis favorisent la formation d'oxygène réactif espèces (ROS) (Štěřba et al., 2013). Répercussions cardiaques sont encore plus répandues en raison d'une plus grande sensibilité de cet organe aux dommages induits par les radicaux libres, étant donné le métabolisme oxydatif haut du cœur et son niveau inférieur des défenses antioxydants. Un autre site commun pour EPI induite la mort cellulaire et des lésions tissulaires se trouve dans le foie.

L'EPI est l'un des médicaments les plus utilisés en clinique thérapeutique à cause de son efficacité thérapeutique et sa faible cardiotoxicité (Li et al., 2005). Il est métabolisé dans le foie chez les animaux et l'homme pour donner des métabolites tels que l'épirubicinol, EPI glucuronide (Weenen et al., 1984). La doxorubicine et l'épirubicine sont considérés les plus toxiques des anthracyclines dans les hépatocytes (Weenen 1984 ; Le Bot et al., 1988). Malgré cette toxicité, l'EPI continue à être utilisé en Europe comme agent anticancéreux (Andersson et al., 1999).

## **Chapitre III : Matériels et méthodes**

### **III.1. Origine de la propolis utilisée**

La propolis utilisée dans ce travail est celle produite par la race d'abeille *Apis mellifica intermissa* qui a été récolté durant le printemps 2014 après la miellée de Tizirt (Tizi Ouzou).

La récolte de la propolis brute a été effectuée par la méthode des grilles. La propolis est stockée au congélateur à une température de -18°C.

### **III.2. Préparation de l'extrait de la propolis**

L'extrait de la propolis a été préparé selon le protocole de Boufadi *et al.* (2014) qui consiste à découper la propolis brute en petit morceaux, à les broyer avant d'en extraire les principes actifs avec de l'éthanol (v/v) (dans les proportions propolis brute /solvant = 1/10 : p/v) dans un bain d'eau froide a ultrason pendant 1h et 30 min. Cette opération d'extraction est répétée 3 fois .La suspension est ensuite filtrée sur papier Whatman N°1 avant évaporation du solvant à sec sous pression réduite à une température de 60°C. Ce filtrat représente l'extrait éthanoïque de la propolis (EEP).

Une partie de cet extrait éthanoïque secs (EEP) par la suite a été mis en suspension dans 200 ml d'eau distillée et extrait avec 200 ml de chloroforme .La couche organique a été éliminée et la phase aqueuse a été extraite avec 200 mL d'acétate d'éthyle (EtOAc) trois fois. La phase organique d'EtOAc a été recueillie après évaporation complète du solvant acétate d'éthyle noté EAP (fig. 7, 8)



**Figure7** : Propolis brute.



**Figure8**: L'extrait de propolis.

### III.3. Epirubicine

Epirubicine (EPI) est une chimiothérapie de la famille des anthracyclines utilisé dans le traitement des cancers. Elle est susceptible de causer un dommage profond suite à la production intensive de radicaux libres provoquant un déséquilibre dans le statut redox cellulaire au profit des pro-oxydants. L'épirubicine est reconstitué stockée dans des flacons de 5 mL à raison de 2 mg/mL (fig. 9).



**Figure 9** : Un flacon d'épirubicine.

### III.4. Animaux, conditions de l'expérience et les différentes analyses des prélèvements sanguins :

Vingt de cinq rats mâles Wistar albinos pesant entre 150 et 200 g ont été utilisés dans la présente expérimentation (fig. 10). Les rats ont été fournis par l'institut Pasteur d'Algérie. Le protocole est conforme aux lignes directrices du National Institute of Health (NIH-USA).

Dès leur réception, les rats ont été mis aléatoirement dans des cages métaboliques par groupes de trois pour une période d'adaptation de 2 semaines à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité. Les rats ont un accès libre à la nourriture (croquettes provenant de la société de production des aliments pour animaux, Bouzaréa, Alger) et à l'eau. Après deux semaines d'acclimatation, les animaux ont été divisés en cinq groupes. Tous les rats ont l'accès à l'eau et la nourriture *ad libitum*.

Les rats du premier lot reçoivent 1 mL d'eau physiologique par voie orale (témoin négatif T), les rats du groupe G1 et G2 sont administrés, respectivement, par 50 et 200 mg/kg d'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tigzirt (EAP). Tandis que les animaux du groupe G3 sont traités par 20 mg/kg de rutine, et ceux du groupe G4 sont administrés par 1 mL d'eau physiologique.

Au deuxième jour, les animaux du lot témoin ont été injectés par 1 mL d'eau physiologique, et les rats du groupe G1 au G4 ont reçu l'épirubicine à raison de 9 mg/kg par voie intraveineuse. Le troisième jour de l'expérimentation, les rats des lots T et G4 ont été traités par 1 mL d'eau physiologique, et les G1, G2 et G3 ont été administrés, respectivement par 50 mg/kg EAP, 200 mg/kg EAP et 20 mg/kg de rutine.

24 heures après (4<sup>ème</sup> jour de l'étude), les rats ont été maintenus sous une légère anesthésie de chloroforme avant d'être sacrifiés afin d'éviter tout risque de changement des paramètres chimiques avant la collecte des échantillons de sang. Le sang est prélevé par une ponction cardiaque dans des tubes secs et des tubes héparines ou EDTA. Les échantillons de sérum ont été obtenus à partir des tubes secs ; alors que les échantillons de plasma ont été obtenus à partir des tubes héparines. Les érythrocytes restants sont lavés avec de l'eau physiologique trois fois de suite, puis sont lysés par addition de l'eau distillée glacée et incubés 15 min dans de la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 5000 t/min pendant 5 min, et le lysat est ensuite récupéré afin de doser les enzymes anti-oxydantes érythrocytaires.



**Figure 10 :** Les rats Wistar dans leurs cages.

### III.5. Analyse des paramètres sériques

L'analyse des paramètres sériques est effectuée suivant des méthodes enzymatiques ou colorimétriques.

#### III.5.1. Dosage de NFS Numérotation formule sanguine

L'hémogramme est l'examen biologique le plus prescrit toutes pathologies confondues. Il apporte des informations sur les cellules du sang contribuant au maintien de l'intégrité de l'organisme : oxygénation des tissus, défense de l'organisme contre les agents pathogènes, prévention du risque hémorragique. L'hémogramme est effectué par des automates équipés de compteurs optiques ou électroniques (Caquet, 2008).

#### III.5.2. Dosage de protéines totales

Dosage des protéines totales par la méthode colorimétrique (réaction du Biuret).

**Principe :** Pour toute chaîne polypeptidique contenant au moins 2 liaisons peptidiques, les liaisons peptidiques forment, en milieu très alcalin, un complexe coloré avec les ions  $\text{Cu}^{2+}$ . Si on met en œuvre un réactif standardisé, en excès, on peut ainsi doser les protéines par colorimétrie avec une longueur d'onde  $\lambda=540$  nm (Gornall et al., 1949).

#### III.5.3. Dosage de l'albumine

L'albumine est déterminée par une méthode colorimétrique (Kit Biomagreb, France).

**Principe :** l'albumine sérique induit après sa fixation avec le vert de bromo-crésol, un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration d'albumine dans l'échantillon. La lecture se fait à une longueur d'onde  $\lambda= 630$  nm (Doumas B et al., 1971).

#### III.5.4. Dosage de la glycémie

Le dosage de la glycémie repose sur une méthode enzymatique utilisant le glucose oxydase. Les résultats obtenus par mesure sur sang veineux (prélèvement veineux).

**Principe** : Détermination enzymatique du glucose selon les réactions suivantes:

$\text{Glucose} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acide urique} + \text{H}_2\text{O}_2$  (à l'aide d'enzyme Glucose oxydase).

$2(\text{H}_2\text{O}_2) + \text{phénol} + 4\text{-Amino-antipyrine} \rightarrow \text{Quinoneimine (rose)} + 4\text{H}_2\text{O}$  (Nathan et al., 2008).

### III.5.5. Dosage du triglycéride

La mesure de la concentration en triglycérides sanguins est importante dans le diagnostic et le suivi des hyperlipidémies.

**Principe** : Méthode de Fossati et Principe couplée a une réaction de Trinder. Le schéma réactionnel est le suivant :

$\text{Triglycérides} \rightarrow \text{glycérol} + \text{acides gras libres. (à l'aide d'enzyme lipase)}$

$\text{Glycerol} + \text{ATP} \rightarrow \text{glycerol 3 phosphate} + \text{ADP}$  à l'aide d'enzyme gluco kinase

$\text{Glycerol 3 phosphate} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Dihydroxyacétonephosphate} + \text{H}_2\text{O}_2$

$\text{H}_2\text{O}_2 + 4 \text{ chlorophénol} + \text{PAP} \rightarrow (\text{POD}) \text{ quinonéimine (rose)} + \text{H}_2\text{O}$

L'absorbance du complexe coloré (quinonéimine), proportionnelle à la concentration en triglycéride dans le spécimen, est mesurée à 505 (Young, 1995).

### III.5.6. Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol total permettre le diagnostic de maladies hépatiques.

**Principe** : Méthode enzymatique décrite par Allain et al. (1974), selon le schéma réactionnel suivant :

$\text{Cholestérols estérifié} \rightarrow (\text{CE}) \text{ cholestérol} + \text{acides gras libres}$

$\text{Cholesterol} + \text{O}_2 \rightarrow (\text{Co}) \text{ cholesten 4 one 3} + \text{H}_2\text{O}_2$

$2 \text{H}_2\text{O}_2 + \text{phénol} + \text{PAP} \rightarrow (\text{POP}) \text{ quinonéimine (rose)} + 4\text{H}_2\text{O}$  (Allain et al. 1974).

### **III.6. Bio-marqueurs d'hépatotoxicité**

#### **III.6.1. Dosage de l'ASAT/ALAT**

•**ASAT**: enzyme présente dans le cytosol et les mitochondries; se trouve dans le foie, les muscles, le cœur, les reins, le cerveau et le pancréas.

•**ALAT**: enzyme présente dans le cytosol; relativement spécifique du foie.

**ASAT** et **ALAT** participent à la néoglucogénèse en catalysant le transfert de groupes aminés de l'acide aspartique ou de l'alanine à l'acide ceto-glutarique afin de produire de l'acide oxaloacétique et de l'acide pyruvique

Une augmentation de l'activité de ces deux enzymes est due à une libération à partir de cellules hépatiques endommagées (Tietz, 2009).

#### **III.6.2. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)**

Les mesures de l'activité phosphatase alcaline sont utilisées pour le diagnostic, le traitement et la recherche des maladies hépatobiliaires et des maladies osseuses associées à une activité ostéoblastique. La phosphatase alcaline est aussi utilisée dans le diagnostic des maladies de la parathyroïde et de l'intestin.

**Principe :** Le substrat phosphate p-nitrophényl est hydrolysé par la Phosphatase Alcaline de l'échantillon, en présence d'ions Magnésium, pour former du p-nitrophénol de couleur jaune qui peut être lu à 405 nm.

L'intensité de la couleur produite est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline présente dans l'échantillon (Thomas, 1998).

#### **III.6.3. Dosage du gamma glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT)**

Gamma glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT), également connu comme Gamma glutamyl transpeptidase, est un microsome une enzyme ayant une distribution large des tissus. Cependant, une mesure de son activité dans le sérum a été trouvée utile dans l'abus associée à une augmentation des phosphatases alcalines sériques. Cette dernière enzyme dans le sérum est d'origine hépatique (Rajagopal et Rafi, 2005).

### III.7. Détermination du statut antioxydant

#### III.7.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité enzymatique de catalase est déterminée dans l'érythrocyte selon la méthode de Luck en 1965 qui consiste en une analyse spectrophotométrie de la peroxydase d'hydrogène. En présence de la catalase, la décomposition de la peroxydase conduit à une diminution de l'absorbance de la solution de  $H_2O_2$  en fonction du temps.

Le milieu réactionnel contient 1 ml d'  $H_2O_2$ , 1 ml d'érythrocyte, 1ml d' $H_2O_2$  1 ml de tampon phosphate (50mol/l, PH 7,4) et 2 ml de catalase (3U/ $\mu$ L). Après incubation de 5 min, 1 ml du réactif sulfate d'oxyde de titanium( $TiOSO_4$ ) [1,7 g dans 500 ml  $H_2SO_4$  2N] est ajouté. La lecture est faite à 240 nm. Les concentrations en  $H_2O_2$  restant sont déterminées à partir d'une gamme d'étalon de  $H_2O_2$  avec le tampon phosphate et le réactif  $TiOSO_4$  de façon à obtenir dans le milieu réactionnel de 0,5 à 2 Mm/L.

Le calcul d'une unité d'activité enzymatique est :

$$A = \log A_1 - \log A_2.$$

$A_1$  : l'absorbance de  $H_2O_2$  DE départ.

$A_2$  : l'absorbance de  $H_2O_2$  après incubation (au bout de 5 min).

L'activité spécifique est exprimée en U/mg Hb (Luck, 1965).

#### III.7.2. Dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de cette enzyme est mesurée selon la méthode d'Elstner et al., (1983). Le principe est basé sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de  $MnCl_2$  et de mercaptaéthanol.

L'oxydation du NADPH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu.

Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle entraîne l'inhibition de l'oxydation du NADPH.

**Réactif 1** : 5ml de tampon phosphate (0.2M/L ,pH 7.4) ,1ml d'hydroxylamine chloride (0.69mg/mL L'activité de cette enzyme est mesurée selon la méthode (d'Elstner et al. 1983).

Le principe est basé sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de  $MnCl_2$  et de mercaptaéthanol.

L'oxydation du NADPH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu.

Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle entraîne l'inhibition de l'oxydation du NADPH.

**Réactif 1 :** 5ml de tampon phosphate (0.2M/L, pH 7.4) ,1ml d'hydroxylamine chloride (0.69mg/ml),1ml d'antraquinone (0,1332mg/ml) et 1ml de diaphorase (1 mg/ml d'une solution de 15U/ml).

**Réactif 2 :** 6ml de sullfanilamide à 10 mg/ml d'HCL à 25% et 6 ml de naphylethylène diamine à 0.2 mg/ml.

400  $\mu$ L du mélange éthanol/chloroforme (62.5/37.5 :V/V) sont ajoutés à 250 $\mu$ l d'érythrocytes pour précipiter les protéines. Après centrifugation à 4000 t/min pendant 5 min, le surnageant est récupéré.

Le milieu réactionnel contient 5  $\mu$ L de surnageant, 10 $\mu$ L de tampon phosphate et 100 $\mu$ L de NAPH pendant 15 min à température ambiante. Puis 100 $\mu$ L de réactif 2 sont ajoutés.

La lecture se fait à 540nm, après incubation de 20 min. la gamme d'activité enzymatique est réalisée avec la SOD étalon. Les résultats sont exprimés en U/cgHb ,1ml d'antraquinone (0,1332mg/ml) et 1ml de diaphorase (1 mg/ml d'une solution de 15U/ml).

### **III.7.3. Dosage Peroxydation lipidique (malonadéhyde MDA)**

Le dosage de la peroxydation lipidique a été réalisé sur le plasma selon le protocole de [Yagi et al. \(1997\)](#) qui consiste à mélanger 20ml de plasma à 0.8ml de  $H_2SO_4$ .

Après agitation, 100 $\mu$  L de solution d'acide phosphotungstique(10 % : P/V) sont ajoutées et laissées 5 min dans l'obscurité puis centrifugées de nouveau 10min à 1600tours/min. le surnageant est éliminé et le culot re-suspendu dans 0.4 ml de  $H_2SO_4$  additionnés de 60 $\mu$ l d'acide phosphotungstique puis centrifugées de nouveau 10min à 1600 t/min. le surnageant est éliminé et le culot résultant dissous dans 2 ml d'eau +50ml d'eau +50ml d'acide acétique 99% ). Le mélange résultant a été chauffé au bain -marie 95C° pendant 60 min. la solution a

été refroidie et extraite par 2.5 ml de butanol. La fluorescence de la phase butanolique a été mesuré avec une longueur d'onde d'émission à 553nm, 10nm étaient glissière avec la coupure à 515nm. La quantité de la peroxydation lipidique a été exprimée en équivalent MDA à partir de plusieurs concentrations de la tétraméthoxypropane (TMP) Standard.

#### **III.7.4. Dosage de glutathion hépatique (GSH)**

Ses enzymes sont séléno-dépendantes contenant 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de séléno cystéine (Milane, 2004). Elles se trouvent dans le cytosol, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau. Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme et une réplétion la restaure (Favier, 2003) ; (Servais, 2004). Ces enzymes sont, sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par l'oxydation des acides gras ou du cholestérol (Favier, 2003).

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

## Chapitre IV : Résultats et discussion

### IV.1. Dosage de FNS (formule de numération sanguine)

Nous avons constaté que l'injection de l'Epirubicine G1 chez les rats a provoqué une augmentation du taux d'hématies, leucocytes et aussi le taux des plaquettes sanguines par rapport au groupe témoin (tableau03) d'une part, et d'autre part, une diminution du taux d'hémoglobine.

**Tableau0 3 :** La formule de numération sanguine.

		Témoin		G1	G2	G3	G4
<b>Leucocytes</b>	<b>LYM</b>	<b>%</b>	75.66	69.32	75.32	80.39	89.22
		<b>10<sup>3</sup>/µl</b>	3.46	4.25	3.49	6.79	8.40
	<b>MID</b>	<b>%</b>	18.53	19.99	19.00	20.00	22.12
		<b>10<sup>3</sup>/µl</b>	2	2.92	2.13	3.12	3.48
	<b>GRA</b>	<b>%</b>	1.02	1.82	1.26	3.13	5.03
		<b>10<sup>3</sup>/µl</b>	0.66	0.75	0.70	0.84	0.98
<b>Hématies</b>	<b>10<sup>6</sup>/µl</b>	8.24	8.45	7.92	8.47	8.49	
<b>Hémoglobine</b>	<b>g/dl</b>	16.10	15.80	16.00	15.40	15.00	
<b>Plaquettes</b>	<b>10<sup>3</sup>/µl</b>	879	972	870	987	1120	

Nous avons constaté chez les rats qui ont reçus la propolis (50 et 200 mg/kg). respectivement, ainsi chez les rats du groupe standard une diminution du taux d'hématies, leucocytes ainsi le taux de plaquette d'une part. Et d'autre part une augmentation taux d'hémoglobine par rapport au groupe 4 selon la norme biologique d'après (DESCAT, 2002).

La diminution du taux d'hématies, leucocytes et le taux de plaquette chez les rats du groupe 1

qui ont reçus 50 mg/kg EAP +9mg/kg d'Epirubicine est légère par rapport au groupe G2. L'augmentation du taux d'hémoglobine chez les mêmes rats est aussi légère par rapport au groupe G2.

La formule de numérotation sanguine du groupe G2 qui a ont reçus 200 mg/kg EAP + 9mg/kg d'Epirubicine est proche de celle du groupe témoin.

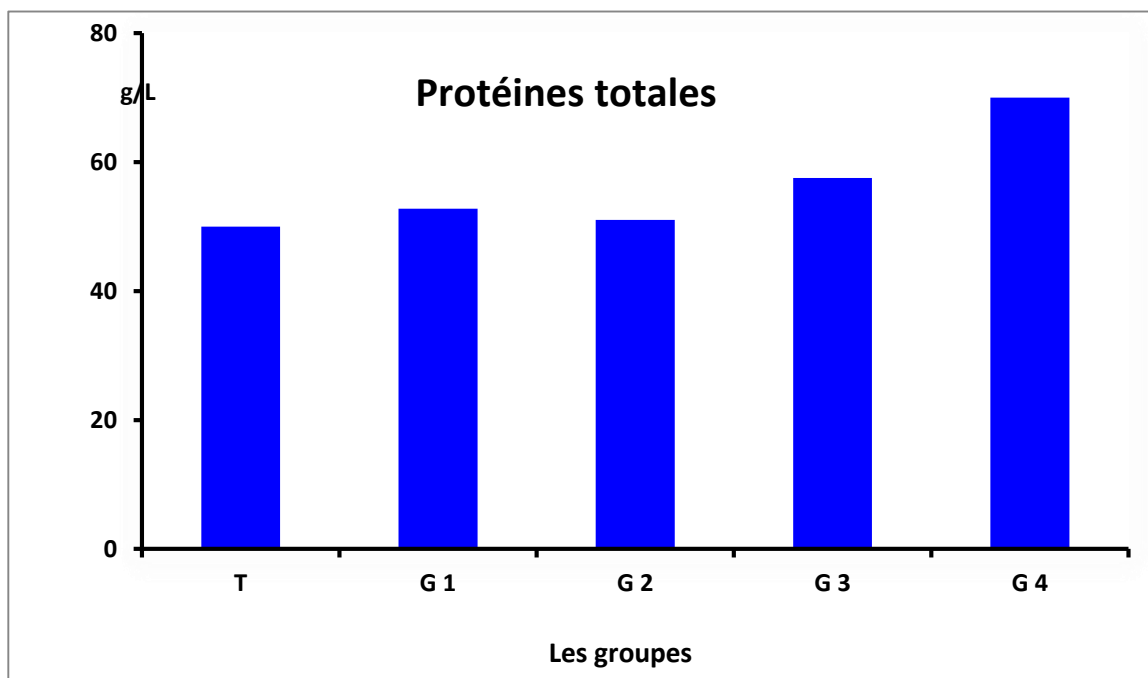
Nous avons constaté que la formule de numérotation sanguine entre les rats du groupe G3 qui ont reçus 20 mg/kg de Rutine+ 9mg/kg d'Epirubicine et les rats du groupe 4 est similaire.

L'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis a un effet hémato protecteur mais il est nécessaire que la dose doit être suffisante.

## **V.2. Les paramètres biochimiques**

### **IV.2.1. Dosage des protéines totales**

D'après nos résultats (fig. 14), les rats du G4 qui sont injectés uniquement par l'épirubicine montrent une augmentation significative en protéine totales de 71% par rapport au groupe témoin.



**Figure 14:** Les protéines totales (g/l) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine + 9 mg/kg d'Epirubicine. T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et

9mg/kg d'Epirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'Epirubicine ; G04 : 9mg/kg d'Epirubicine.

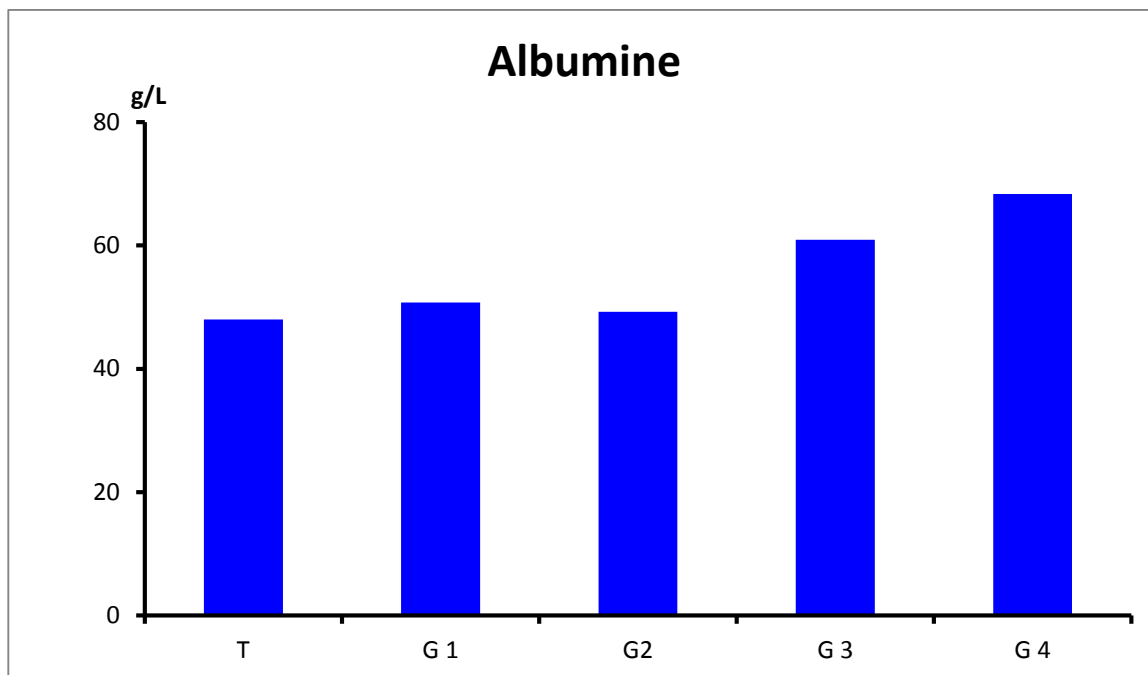
Chez les rats des groupes G1 et G2 qui ont reçu, respectivement, 50 et 200 mg/kg d'extrait d'acétate éthyle de la propolis de Tizirt, on constate une diminution significative du taux de protéines totales de 69 et 68% par rapport au groupe G4.

Nos résultats sont en accord avec ceux [Durdane et al. \(2001\)](#), qui ont remarqué une augmentation de taux des protéines totales chez les rats intoxiqués par l'alcool. La même remarque a été faite par [Wu et al. \(2016\)](#) qui ont provoqué l'hépatotoxicité par Epirubicine chez les rats Femelle BALB/c.

Par le biais des résultats obtenus sur le taux des protéines totales chez les rats traités ou non par la propolis, on peut dire que l'augmentation du taux des protéines totales est un indice d'hépatotoxicité car le taux de ces dernières diminue chez les rats qui ont pris la propolis. Les meilleurs résultats ont été obtenus chez les rats traités par 200 mg/kg d'EAP.

#### **IV.2.2. Dosage d'albumine**

Selon les résultats obtenus dans la [\(fig. 15\)](#), on constate qu'il y a une augmentation de 70% du taux de l'albumine chez le groupe G4 (qui a été injecté par l'épirubicine) par rapport au groupe témoin. En revanche, on observe qu'il y a une chute de l'albuminémie de 74 et 72% chez les rats traités, respectivement, par 50 et 200 mg/kg d'extrait acétate d'éthyle de la propolis par rapport au groupe G4.



**Figure 15:** L'albumine (g/l) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutin et 9 mg/kg d'Epirubicine.

T : Témoin ; G01 : 50mg/kg/j d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G02 : 200 mg/kg/j d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G03 : 20mg/kg/j de rutine et 9mg/kg d'Epirubicine ; G04 : 9mg/kg d'Epirubicine.

L'albuminémie des rats du 2<sup>ème</sup> groupe (qui a ont reçus 200 mg/kg EAP) est similaire à celle du groupe témoin. Il y a aussi une similarité entre l'albuminémie des rats du groupe 3 qui ont reçus 20 mg/kg de Rutine et celle des rats du groupe 4 non traités. Ce qui explique, que les flavonoides purs n'ont aucun effet hépatoprotecteur.

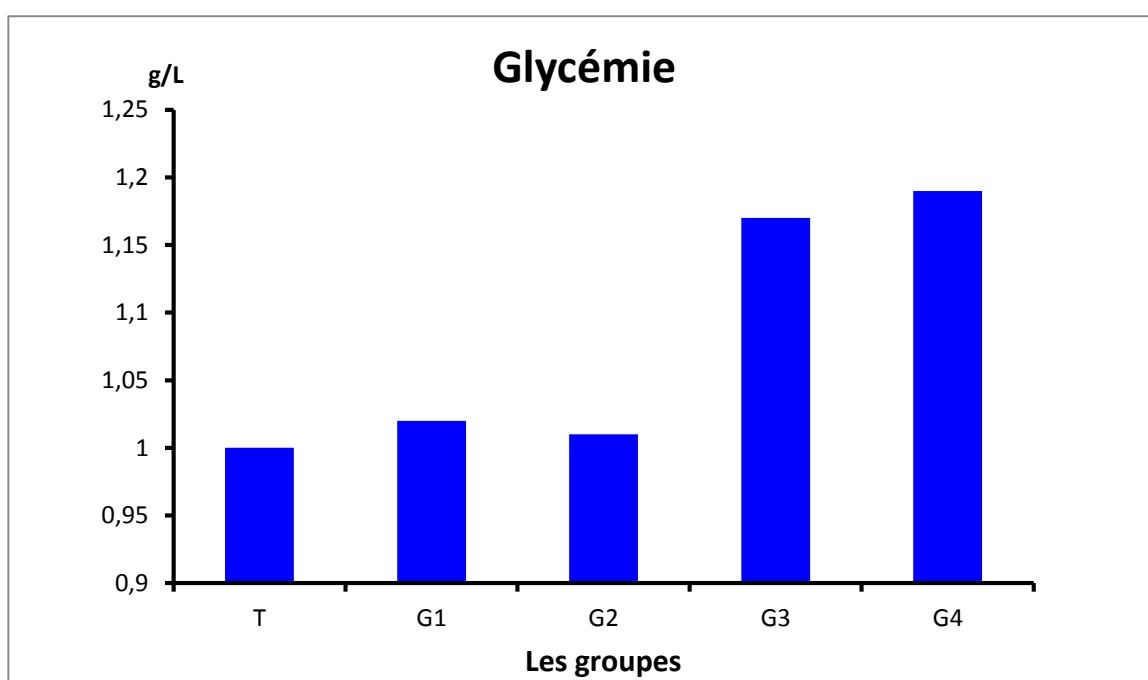
Les mêmes résultats ont été obtenus par [Durdane et al. \(2002\)](#) qui ont provoqué une hépatotoxicité chez les rats de Wister par l'alcool. Ainsi par [Wu et al. \(2016\)](#) qui ont induit l'hépatotoxicité par épirubicine chez les rats Femelle BALB/c.

#### IV.2.3. Dosage de la glycémie

La glycémie et l'inflammation sont deux aspects de notre santé qui dans certaines situations peuvent entrainer plusieurs maladies, il y a un lien fort qui existe entre les désordres glycémiques et l'inflammation qui aboutit à l'hépatotoxicité. ces deux déséquilibres de processus

normaux surtout quand ils sont associés, peuvent entraîner de nombreux problèmes de santé.

D'après nos résultats illustrés dans la (fig. 16), on remarque une augmentation de 84% chez les rats du G4 (qui ont reçus une injection d'épirubicine) par rapport au groupe témoin. En revanche, on remarque que 50 et 200 mg/kg de propolis a diminué la glycémie chez les rats de groupe G1 et G2, respectivement, 86 et 84%, par rapport au groupe 4.



**Figure 16:** La glycémie (g/l) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'épirubicine.

T : Témoin ; G01 : 50mg/kg/j d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'épirubicine ; G04 : 9mg/kg d'épirubicine.

On constate aussi une légère diminution de la glycémie chez les rats de groupe 3 qui ont reçus 20 mg/kg de rutine par rapport au G4.

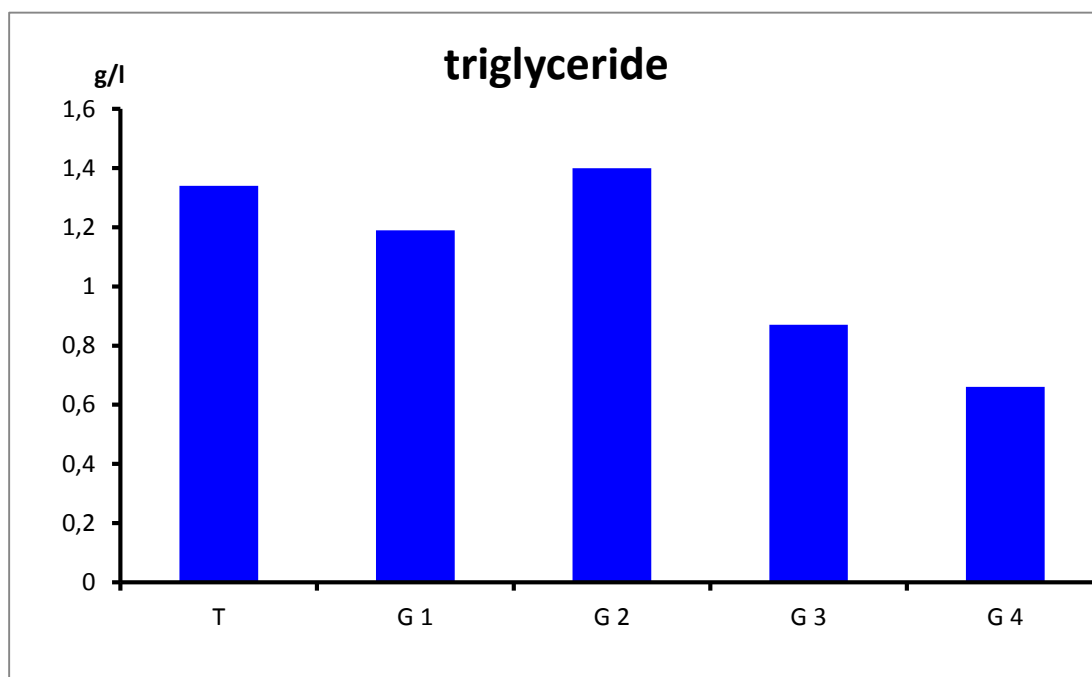
La glycémie des rats du 2<sup>ème</sup> groupe qui a ont reçus 200 mg/kg d'EAP est proche à celle du groupe témoin T.

Nos résultats sont similaires à ceux de [Durdane et al. \(2002\)](#) et [Kebieche \(2009\)](#).

D'après la comparaison entre les résultats de la glycémie des groupes traités ou non par la propolis, on peut dire que l'hyperglycémie est un indice d'hépatotoxicité car il y a une amélioration du taux de la glycémie chez les rats traités par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt surtout chez les rat du deuxième groupe qui ont reçu 200 mg/kg de ce dernier. Cet effet de la propolis se traduit par une internalisation de glucose sanguin dans les tissus périphériques.

#### IV.2.4. Dosage de triglycéride

L'injection d'épirubicine (9mg/kg) chez les rats du G04 a causé une diminution de la teneur en triglycéride de (49%) par rapport au groupe témoin (1.34g/l) ([fig. 17](#)).



**Figure 17:** Triglycéridémie(g/l) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'Epirubicine.

T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg

d'Epirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'Epirubicine ; G04 : 9mg/kg d'Epirubicine.

On a remarqué chez les rats du G1 et G2 qui ont reçu respectivement, 50 et 200 mg/kg d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt, une augmentation du taux de Triglycéridémie (55%,47%) comparé au G4 et une légère augmentation de (82%) observé chez les rats du G03 qui ont été traités par 20 mg/kg de rutine.

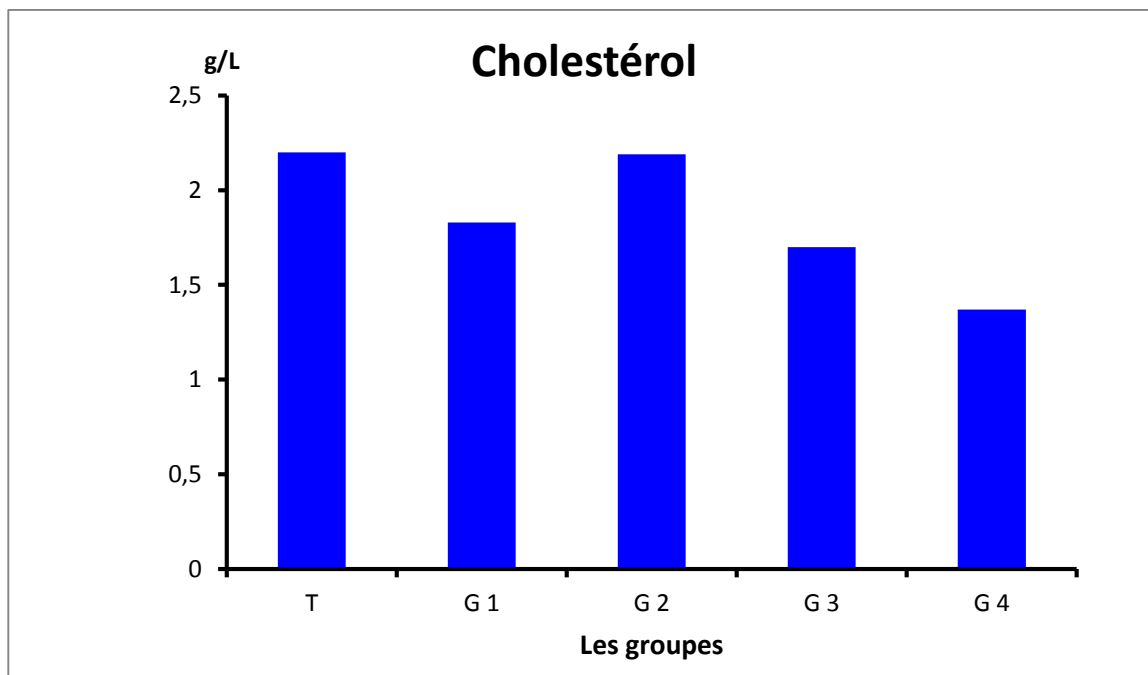
Le taux de triglycérides des rats du groupe 2 (qui a ont reçus 200 mg/kg EAP) est concorde avec celui des animaux du groupe témoin. Cette hypothèse est confirmée par [Durdane et al. \(2002\)](#) et [Kelley et al. \(2015\)](#) qui ont provoqué une inflammation chez les humains par Citrus limonin glucoside, et aussi par [Alam et al. \(2016\)](#) qui ont induit l'hépatotoxicité par paracétamol.

[Hany et al. \(2016\)](#) ont montré une augmentation du bilan lipidique chez les rats intoxiqués par Hesperidin e cisplatine.

On peut dire que la diminution du taux de triglycéride chez les rats des groupe 1, 3, 4 est un signe d'endommagement et dysfonctionnement des hépatocytes, et que l'administration d'une quantité suffisante d'extrait acétate d'éthyle de la propolis préserve ces lésions hépatiques et les résultats du groupe 2 confirme cette hypothèse.

#### **IV.2.5. Dosage de la cholestérolémie**

Les résultats de ce dosage ([fig. 18](#)) montrent que chez les rats du G4 qui ont injectés par l'Epirubicine à 9 mg/kg par voie intraveineuse, il y a une diminution de la teneur en cholestérol de 62% par rapport au groupe témoin (2.20 g/L).



**Figure 18:** Cholestérolémie (g/l) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et (9mg/kg) d'Epirubicine.

T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'Epirubicine ; G04 : 9mg/kg d'Epirubicine.

Par contre les rats du G1 et G2 qui ont reçu, respectivement, 50 et 200 mg/kg d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt, ont enregistré une augmentation du taux de cholestérol 74 et 62% comparé au G4 et une légère augmentation de 28% observée chez les animaux du G3. Mais, il y a une amélioration dans le taux de cholestérol chez les rats du deuxième groupe parce que les valeurs de ce dernier proche à celles du groupe témoin.

Il y a aussi une simultanéité entre le taux de cholestérolémie chez les rats du groupe 3 qui ont reçus 20 mg/kg de rutine et les rats du groupe 4 qui ont reçus seulement l'épirubicine.

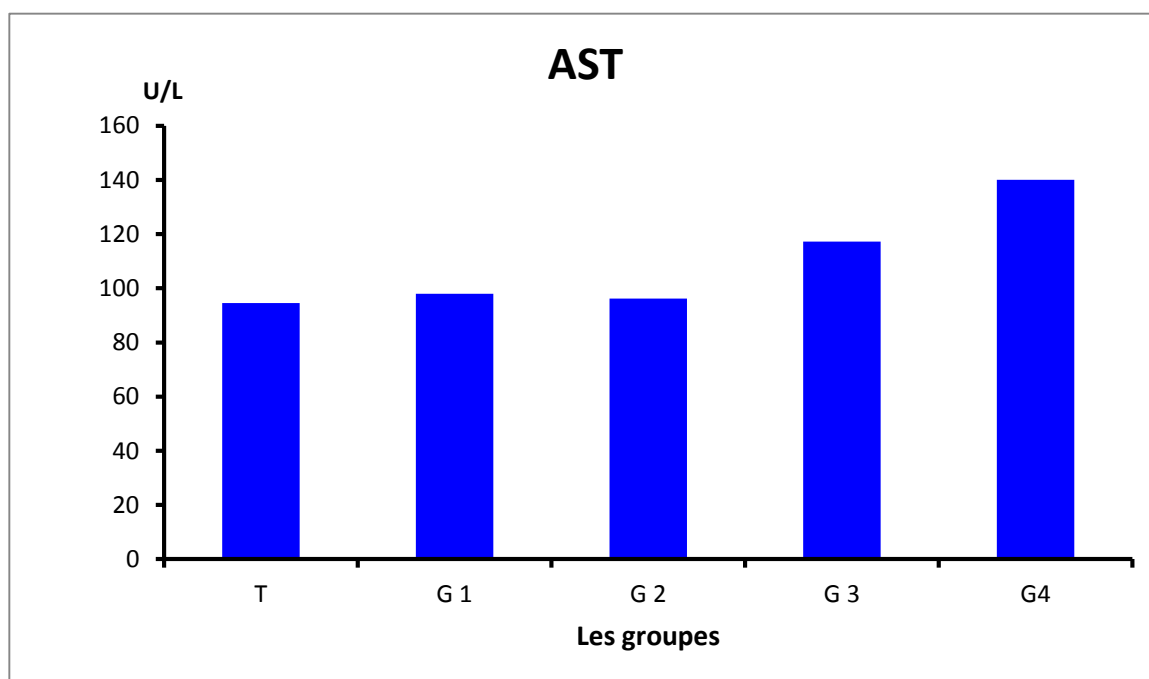
Ces résultats sont en accord avec ceux de [Kelley et al. \(2015\)](#) qui ont provoqué une inflammation chez les humains par Citrus limonin glucoside, ainsi avec [Hany et al. \(2016\)](#) qui ont induit d'hépatotoxicité par Hesperidine et cisplatine.

L'hypocholestérolémie chez le groupe 1, 3, 4 est un résultat d'une hépatotoxicité puisqu'il y a une amélioration significative chez les rats du deuxième groupe traités par la plus forte dose de la

propolis (200 mg/kg).

#### **IV.6. Dosage de l'ASAT**

L'effet de l'épirubicine sur les fonctions hépatiques avec ou sans l'extrait de propolis est illustré par la figure suivante (fig. 19). On constate une élévation significative (67%) du niveau sérique de TGO chez les rats traités par 9 mg/kg d'épirubicine par rapport au groupe témoin (94.50 U/mL).



**Figure 19 :** AST (unité/ml) chez les rats traités où/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9 mg/kg d'épirubicine. T : Témoin ; G01 : 50mg/kg/j d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'épirubicine ; G04 : 9mg/kg d'épirubicine.

L'administration des polyphénols de la propolis de Tizirt diminue l'effet du médicament anticancéreux et normalise la valeur de cette enzyme avec une diminution de 68 et 70% chez les rats du G1 et G2, respectivement, par rapport au G4.

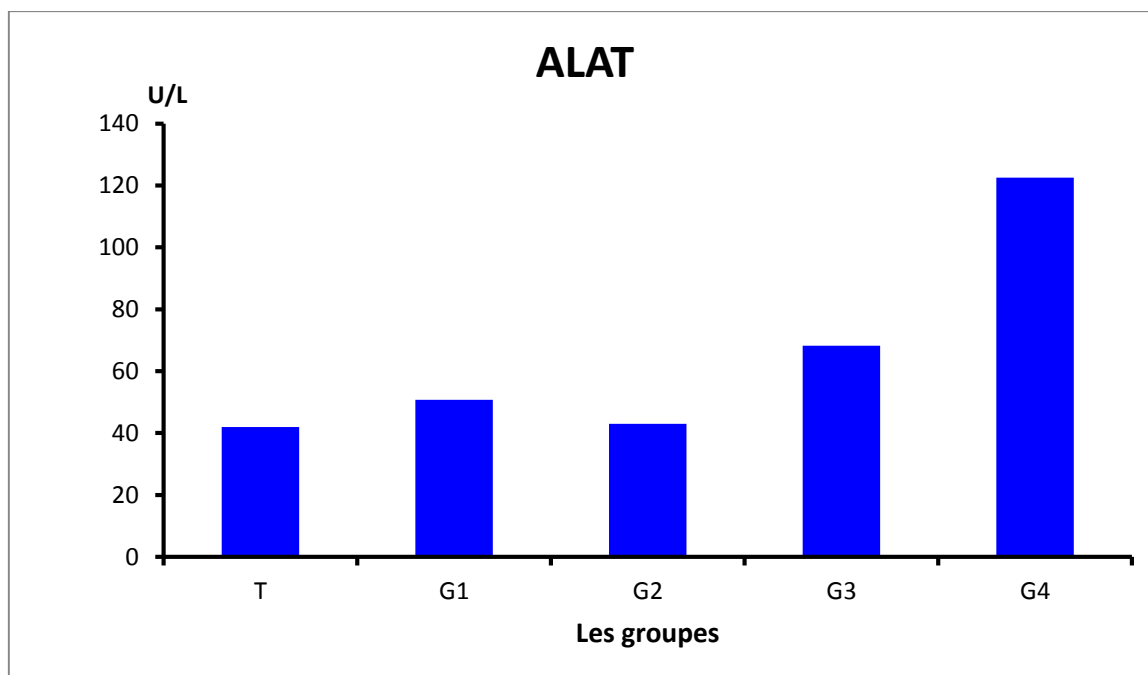
On constate une légère diminution de 29% chez les rats traités par la rutine par rapport au groupe 4.

Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Durdane et al. (2002) ; Kebieche et al. (2009) ; Hany et al (2016) ; dans le cas d'hépatotoxicité provoqué par l'épirubicine, l'alcool, Hesperidin –cisplatine et l'Doxorubicine. Les mêmes résultats avec Türkez et al. (2010) qui provoque une hépatotoxicité par aluminium.

L'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt préserve le foie contre la toxicité provoquée par l'EPI.

#### IV.7. Dosage de l'ALAT

L'activité d'ALT du groupe 4 était significativement plus élevée de 84% que celle dans le groupe témoin (42 unité/mL) (fig. 20). L'administration des extraits phénoliques de la propolis de Tizirt améliore la fuite des transaminases avec une forte diminution de 85% chez les rats traités par 200 mg/kg d'EAP, et une légère diminution de 19% chez les rats du groupe témoin par rapport au groupe contrôle positive G4.



**Figure 20 :** ALT (unité/ml) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'épirubicine.

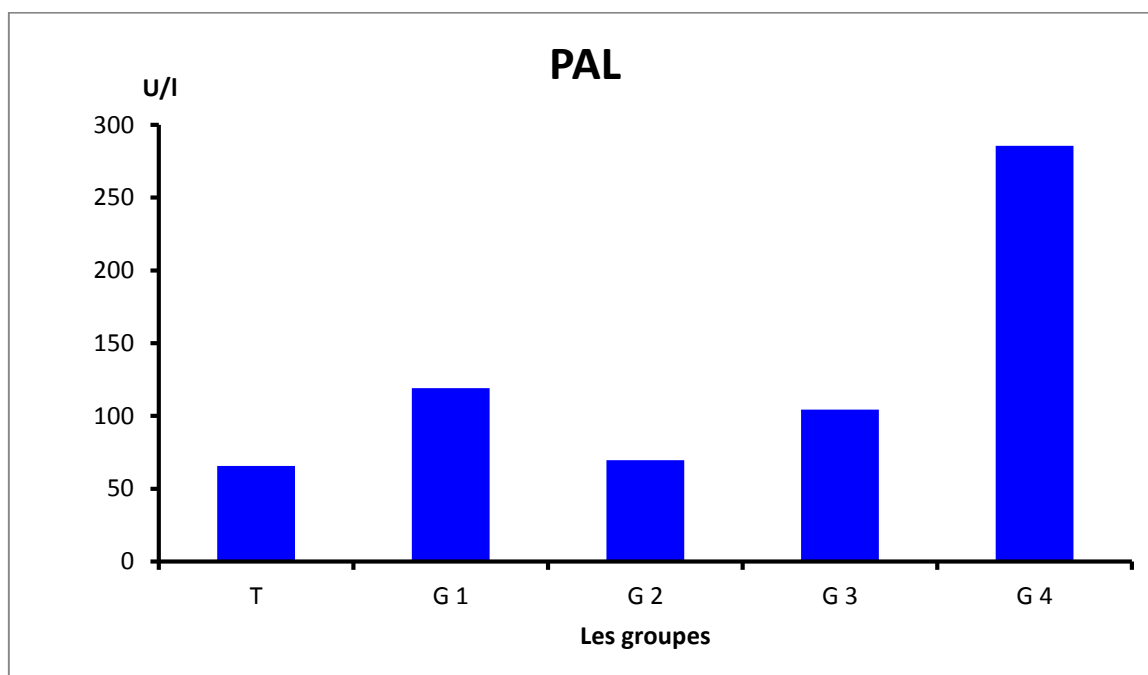
T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'épirubicine ; G04 : 9mg/kg d'épirubicine.

Selon les résultats obtenus par [Kebieche et al. \(2009\)](#) ; [Durdane et al. \(2002\)](#) ; [Vicente et al. \(2008\)](#) ; [Türkez et al. \(2010\)](#) qui ont induit l'hépatotoxicité chez les rats de Wistar par l'Epirubicine, l'alcool, cadmium, aluminium respectivement, et avec nos résultats on peut dire que l'augmentation de l'ALAT est un indice d'une hépatotoxicité.

L'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt possède un effet protecteur contre les dommages hépatiques, et lutte contre la fuite des transaminases hépatiques et leur passage dans le sang.

#### IV.6.7. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

On constate une élévation significative du taux du PAL chez les rats du groupe 4 qui ont reçu une injection d'épirubicine (82%) par rapport au groupe témoin (65.66 UI/L) d'une part, et d'autre part une forte diminution chez les rats du deuxième groupe de (74 %) par rapport au groupe contrôle positif ([fig. 21](#)).



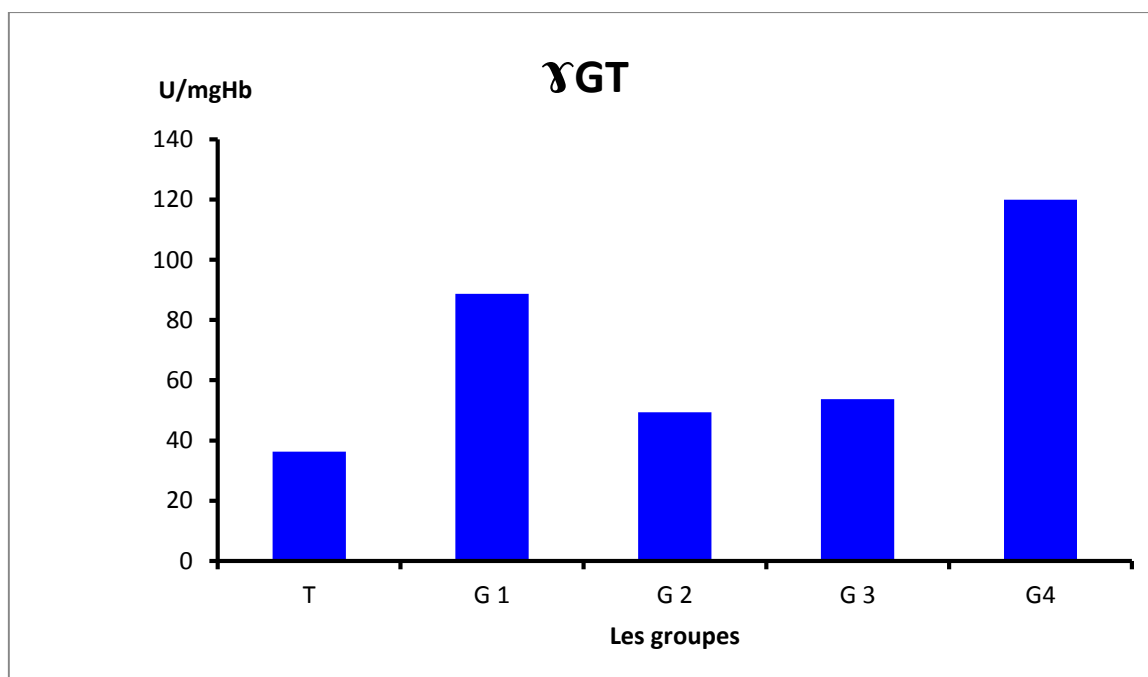
**Figure 21** : PAL (U/l) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9 mg/kg d'épirubicine. T : Témoin ; G01 : 50mg/kg/j d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G03 : 20mg/kg/j de rutine et 9mg/kg d'épirubicine ; G04 : 9mg/kg d'épirubicine.

Nos résultats obtenus concernant la PAL traduisent une alerte de dysfonctionnement hépatique où l'administration des polyphénols de la propolis de Tizirt normalise cette enzyme et va les conduire vers la norme biologique de ce dernier.

On a les mêmes résultats que [Kebieche et al. \(2009\)](#) ; [Wu et al. \(2016\)](#) dans le cas d'une hépatotoxicité provoquée par l'Epirubicine et [Türkez et al. \(2010\)](#) qui ont induit l'hépatotoxicité par l'Aluminium.

#### IV.6.8. Dosage du gamma glutamyl transférase ( $\gamma$ -GT)

L'effet de l'Epirubicine sur les fonctions hépatiques avec ou sans l'extrait des polyphénols de la propolis de Tizirt est illustré par la figure précédente. Dont on enregistre une élévation significative du niveau sérique du  $\gamma$ -GT chez les rats traités par l'EPI (9 mg/kg) de (30%) contre le groupe témoin (36.33 U/mg Hb) ([fig. 22](#)).



**Figure 22 :**  $\gamma$ GT (U/mgHb) chez les rats traités ou non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9 mg/kg d'epirubicine. T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'epirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'epirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'epirubicine ; G04 : 9 mg/kg d'epirubicine.

Le traitement avec l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis neutralise l'effet du médicament anticancéreux avec une diminution de 73 et 41% chez les rats du G1 et G2,

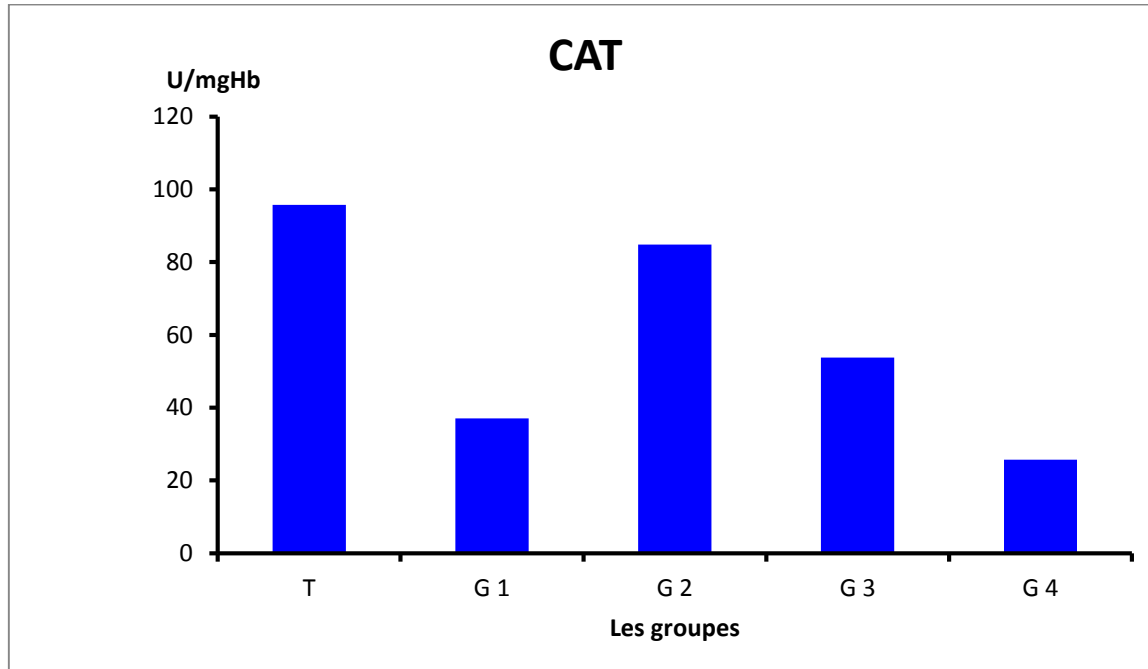
respectivement, et une légère diminution de (44%) chez les rats du groupe standard par rapport au G4.

Kebieche *et al.* (2009) ont rapporté que l'administration du quercétine neutralise l'effet d'épirubicine chez les rats souffrant du stress oxydatif en diminuant la fuite des enzymes hépatiques. De même, dans une étude menée par Vicente *et al.* (2008) dans le cas d'une hépatotoxicité provoqué par cadmium.

#### IV.7. Evaluation du statut oxydant

##### IV.7.1. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité du catalase est réduite significativement chez les rats du quatrième groupe de (26%) par rapport au groupe contrôle négative (fig. 23) après l'injection d'Epirubicine à 9 mg/kg. En comparaison avec le groupe contrôle positive, il y a augmentation de ce dernier chez les rat prétraités avec la propolis et ses composants de (69%) pour le premier groupe, (30%) pour le deuxième groupe et (47%) pour le troisième groupe par rapport au groupe témoin(95.77 U/mgHb).



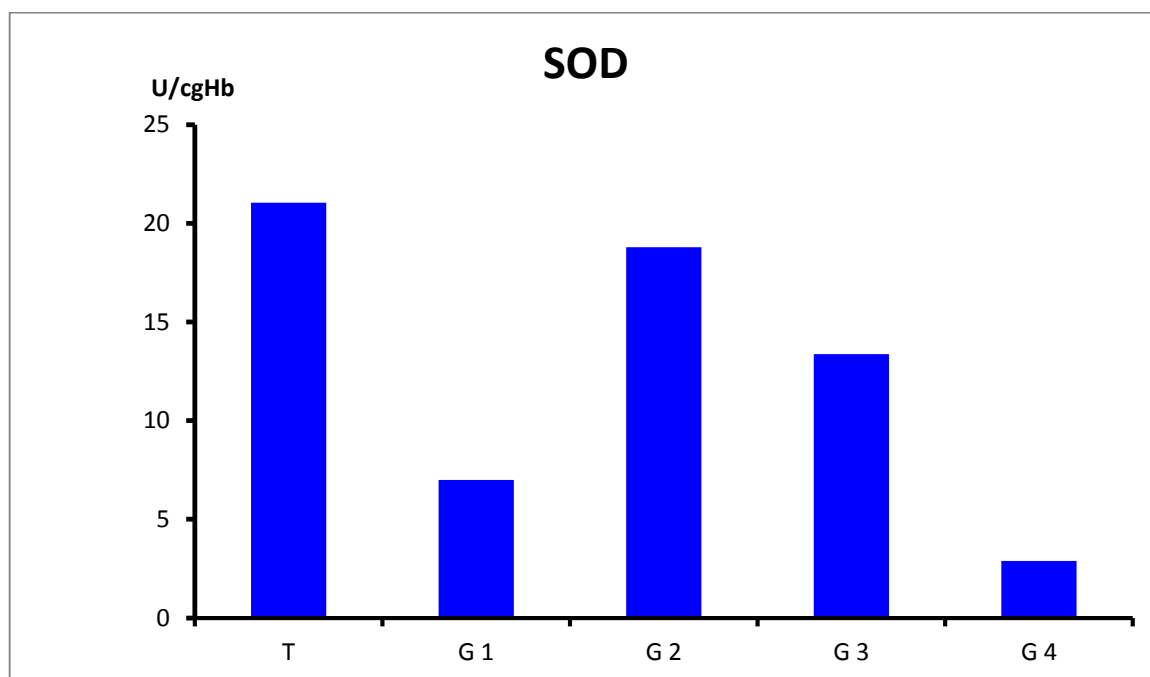
**Figure 23 :** CAT (U/mgHb) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9 mg/kg d'épirubicine. T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9 mg/kg d'épirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'épirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'épirubicine ; G04 : 9mg/kg d'épirubicine.

La diminution de cette enzyme chez les rats traités par l'Epirubicine (9 mg/kg) seulement est due à un problème de redox cellulaire. Et la propolis maintient un statut redox équilibré surtout chez les rats du deuxième groupe qui ont co-traité par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt.

Ce même résultat que le nôtre a été mentionné par [Wu et al. \(2016\)](#) ; [Kebieche et al. \(2009\)](#) qui ont induit une hépatotoxicité chez les rats de Wistar par Doxorubicin et Epirubicine respectivement.

#### IV.7.2. Dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

L'injection d'épirubicine (9 mg/kg) chez les rats du groupe contrôle enregistre une réduction du taux du SOD de 14% par rapport au groupe témoin (21.05 U/cgHb), et une élévation de ce dernier chez les rats co-traités avec l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt à 200 mg/kg, 50 mg/kg/j et la rutine 20mg/kg par rapport au quatrième groupe ([fig.24](#)).



**Figure 24** : SOD (U/cgHb) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9 mg/kg d'Epirubicine. T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'Epirubicine ; G04 : 9mg/kg d'Epirubicine.

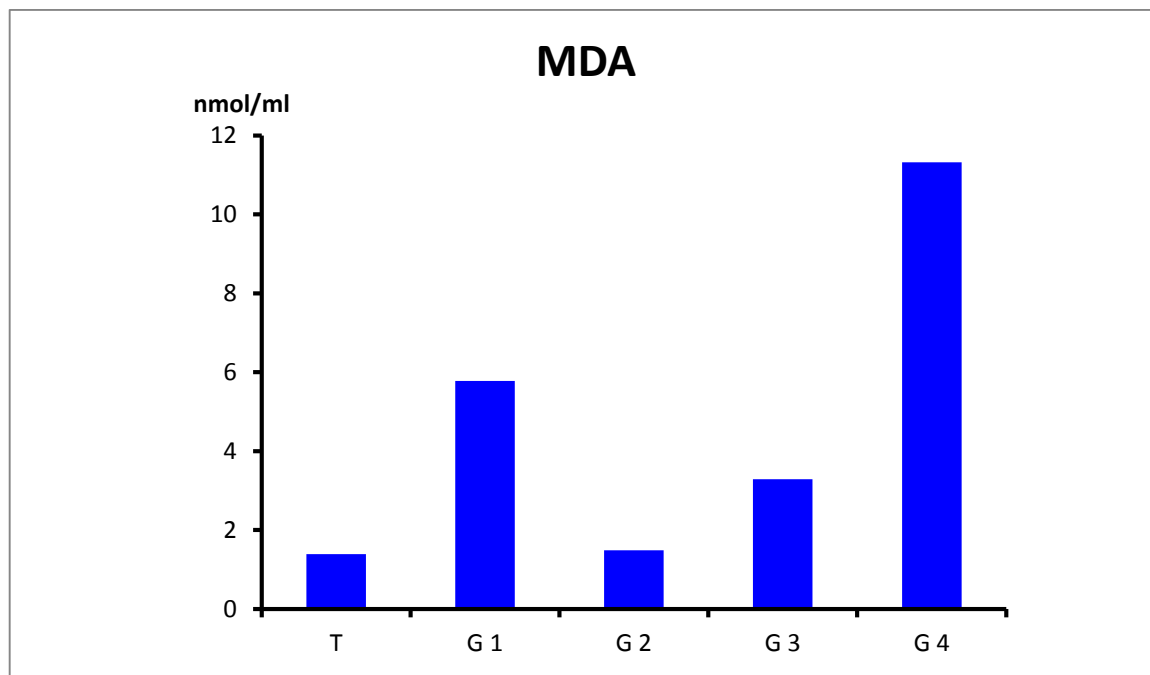
Mais l'élévation est significative chez les rats qui ont la plus dose concentré de la propolis (200 mg/kg) de (15%). Cependant l'élévation de ce dernier est légère chez les rats qui ont reçus la propolis 50mg/kg et la Rutine 20mg/kg d'une valeur de (43%), (21%) respectivement.

Ce résultat peut expliquer une production intensive de l'anion suproxyde suite au traitement des animaux par le médicament. Par contre, le prétraitement des animaux par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt atténue complètement ces effets puisque les taux du SOD et de CAT reviennent à la normale surtout chez les rats du deuxième groupe qui ont reçus 200 mg/kg de la propolis.

Nos résultats en accord avec ceux obtenus dans l'étude de l'activité antioxydante des flavonoïdes extraits de la Propolis dans le cas de l'hépatotoxicité induite par le cyclophosphamide et le paracétamol par [Lahouel et al. \(2004\)](#). Ainsi avec [Kebieche et al. \(2009\)](#) ; [Hany et al. \(2016\)](#) qui ont provoqué d'hépatotoxicité par et Hesperidin-cisplatine respectivement.

#### **IV.7.3. Dosage Peroxydation lipidique ( malonadéhyde MDA) :**

Dans cette présente étude, les résultats ([fig. 25](#)) ont montré clairement une élévation significative du MDA cytosolique et mitochondrial, lorsque les animaux sont traités avec l'EPI (9 mg/kg), traduisant une augmentation de la lipoperoxydation de (29%) par rapport au groupe témoin (3.29 nmol/ml). Par contre, l'administration préventive de l'extrait d'acétate de propolis associés avec l'Epirubicine chez les rats du premier et deuxième groupe enregistre une diminution de ce dernier, de (51%) pour G01 et (13%) pour le groupe 02, et une légère diminution de (29%) pour le groupe standard par rapport au groupe contrôle positive.



**Figure 25** : MDA (nmol/ml) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9mg/kg d'epirubicine.

T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'epirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'epirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'epirubicine ; G04 : 9mg/kg d'epirubicine.

Le taux du MDA est relativement similaire chez les rats du deuxième groupe et ce dernier chez les rats du groupe témoin.

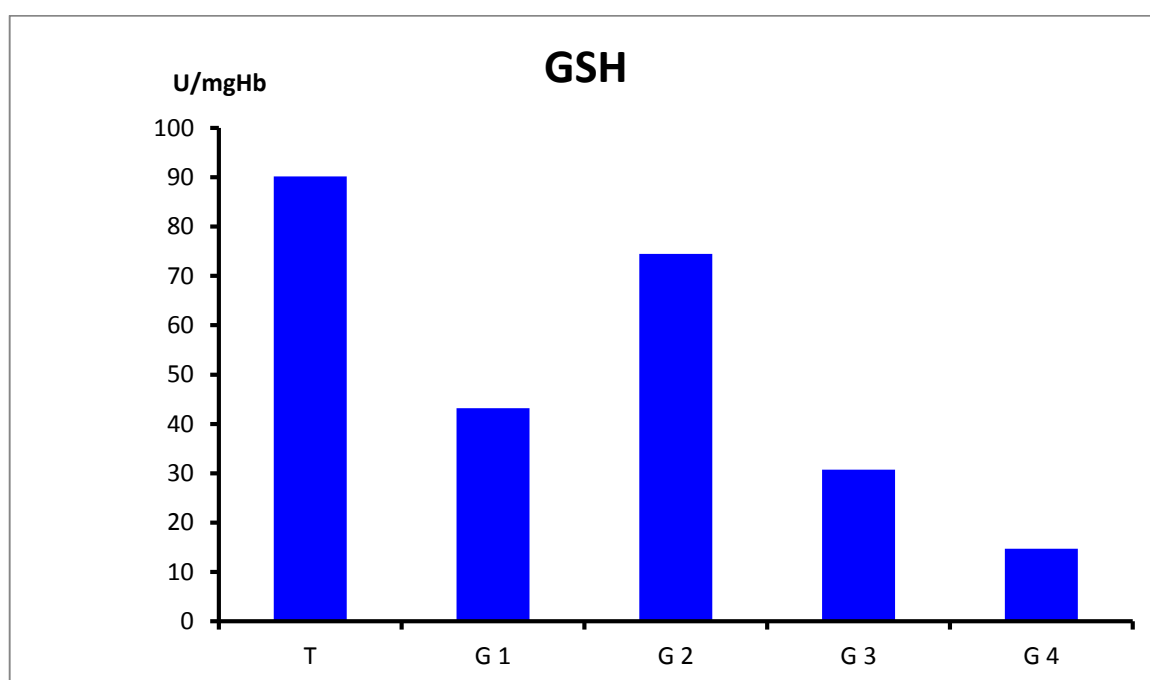
L'augmentation significative du MDA chez le troisième et quatrième groupe pourrait être un résultat des dommages tissulaires par la formation excessive des radicaux libres (Sanmugapriya et Venkataraman, 2006). Maintiennent l'équilibre du système redox intrahépatocytaire. Et l'administration de la plus forte dose de la propolis neutralise l'effet des radicaux libres.

Newairy et al. (2009) ont rapporté que l'administration de la propolis 200 mg/kg en association avec CCL<sub>4</sub> a empêché la lipoperoxydation en tant qu'un antioxydant efficace et aidé dans l'empêchement des dommages peroxydatifs. On outre lahoul et al. (2009) ont montré que le prétraitement des rats de wistar avec l'extrait des flavonoïdes inhibe la lipoperoxydation oxydative induit par le paracétamol et cyclophosphamid.

#### IV.7.4. Dosage de glutathion hépatique (GSH) :

Le glutathion réduit (GSH), antioxydant non enzymatique, constitue la première ligne de défense antiradicalaire (Raja *et al.* 2007). La déplétion du GSH hépatique est souvent associée à l'hépatotoxicité médicamenteuse (Hewawasam *et al.* 2003 ; Raja *et al.* 2007) comme le cyclophosphamide et la vinblastine (Lahouel *et al.* 2004).

Dans le graphe suivant, les résultats (fig. 26) ont révélé une déplétion significative du GSH hépatique chez les animaux traités par 9mg/kg d'Epirubicine de (16%) par rapport au groupe témoin (90.18 U/mgHb).



**Figure 26** : GSH (U/mgHb) chez les rats traités ou/non par l'extrait d'acétate d'éthyle de la propolis de Tizirt (EAP), de Rutine et 9 mg/kg d'Epirubicine. T : Témoin ; G01 : 50mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G02 : 200 mg/kg d'EAP et 9mg/kg d'Epirubicine ; G03 : 20mg/kg de rutine et 9mg/kg d'Epirubicine ; G04 : 9mg/kg d'Epirubicine.

Par contre, la teneur hépatocytaire de ce tripeptide est maintenue à son niveau cellulaire normal quand les rats sont traités par 9 mg/kg d'Epirubicine associée à 200 mg/kg d'EAP avec une augmentation de (19%) par rapport au groupe 04. Mais l'augmentation de ce dernier chez les rats co-traités avec la propolis 50mg/kg et la rutine 20 mg/kg respectivement est légère avec (33%) et (47%) par rapport au groupe contrôle.

Cet effet de la propolis de Tizirt démontre le pouvoir chémoprotecteur anti-radicalaire des polyphénols en général. Ces molécules sont donc capables d'empêcher la chute du GSH et stimulent sa régénération à partir de GSSG (Martin, 2003), suite à la neutralisation des ROS par les flavonoïdes.

## **Conclusion**

La propolis est un remède naturel utilisé depuis l'Antiquité. Il est utilisé comme une substance naturelle grâce à ces propriétés thérapeutiques telle que propriétés antivirale, antiparasitaire, anti-inflammatoire, anti-oxydante, anticancéreuse. L'apport des polyphénols permet de renforcer ces propriétés mais aussi de jouer un rôle plus spécifique sur les défenses de l'organisme. Jusqu'à l'heure actuelle, cette propolis suscite encore un intérêt très particulier. Elle est considérée comme un antibiotique naturel dans un temps où les infections nosocomiales prennent une grande ampleur et suscitent la recherche de nouveaux antibiotiques efficaces.

L'évidence de l'hépatotoxicité sous l'effet de l'épirubicine (EPI) est confirmée par fuite des transaminases. Cet anticancéreux est susceptible de causer un dommage profond suite à la production intensive de radicaux libres provoquant un déséquilibre dans le statut redox cellulaire au profit des pro oxydants. Les polyphénols de la propolis de Tizert jouent un rôle chémoprotecteur vis-à-vis du stress oxydatif produit dans les hépatocytes, lors de l'administration de L'EPI chez les rats de Wister. Donc ces substances possède un pouvoir pharmaceutique, ce qui supporte son usage traditionnel pour la prévention contre divers pathologie notamment l'hépatotoxicité.

Grâce à nos expériences et à nos recherches, nous avons constaté que la propolis montre des propriétés antioxydantes dont lutter contre l'oxydation de peroxydase et l'inhibition des radicaux libres Ainsi, nous avons découvert que ces propriétés sont principalement dues à sa concentration en eau et polyphénols. Qui agissent sur la prévention contre l'hépatotoxicité chez des rats exposés à l'EPI.

On peut conclure que la propolis et les autres produits de la ruche, telle que gelée royale, sont beaucoup utilisés par l'homme pour leurs diverses propriétés. On trouve dans la propolis les principaux polyphénols dont l'acide gallique, l'acide tonique, l'acide succinique, l'acide caféique, chrysin, rutine.....etc. Ces polyphénols sont des antimicrobiens à large aspect, ils agissent au niveau systématique en luttant contre les divers hépatopathologies. Donc l'étude doit être orientée vers la détermination des composés actifs de la propolis de Tizert et leur rôle de signalisation impliquée dans le processus hépatotoxique.

### Références Bibliographiques

1. **Abdel-Fattah, N. S et Nada, O. H. (2007)**. Effect of propolis versus metronidazole and their combined use in treatment of acute experimental giardiasis. *J.Egypt Soc Parasitol* (37): 691-710.
2. **Ahn, M. R., Kunimasa, K., Kumazawa, S. (2009)**. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res* (7): 51-643.
3. **Alam, J., Mujahid, M., Badruddeen., Jahan, Y., Bagga, P., Rahman, M. A. (2016)**. Hepatoprotective potential of ethanolic extract of *Aquilaria agallocha* leaves against paracetamol induced hepatotoxicity in SD rats. *ELSEVIER-Journal of Traditional and Complementary Medicine XXX* : 1-5.
4. **Allain, C. C., Poom, LS., Chan, C. S., Richmonal, W. S., Fu, P. C. (1974)**. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem* 20: 470-475.
5. **Allen, A. (1992)**. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semiological Oncology* (19): 529- 542.
6. **Allen, R. T., Cluck, M. W et Agrawal, D. K. (1998)**. Mechanisms controlling cellular suicide- role of caspases. *Cell Mol Life Sei* 54(5): 427-45.
7. **Anderson, R. D., Veigl, M., Baxter et Sedwick, W. D. (1991)**. DNA sequence specificity of doxorubicin-induced mutational damage in *uvrB- Escherichia coli*. *Cancer Res* 51(15): 3930-7.
8. **Andersson, B., Eksborg, S., Vidal, R., Sundberg, M., Carlberg, M. (1999)**. Anthraquinoneinduced cell injury: Acute toxicity of carminomycin, epirubicin, idarubicin and mitoxantrone in isolated cardiomyocytes. *Toxicology* (135): 11-20.
9. **Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C et Spalla, C. (1969)**. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. caesius. *Biotechnol Bioeng*, II (6): 1101-10.
10. **Arora, S., kaur, k., Kaur, S. (2003)**. Indian medicinal plants as a reservoir of protective phytochemicals. *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis supplements* (1): 301-312.
11. **Bankova, V., Castro, S. L., Marcucci, M. C. (2000)**. Propolis : recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* (31) :3-15.

12. **Bankova, V., Christov, R., Delgado T. A. (1998).** Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry* (49): 1411–1415.
13. **Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Pureb, O., Bocari, G. (1994).** Volatile constituents of propolis. *Z Naturforsch* (49): 6-10.
14. **Banskota, A. H, Tezuka, Y and Kadota, S. (2001).** Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* (15): 561-71.
15. **Barthwal, R., Mujeeb, A. et Govil, G. (1994).** Interaction of daunomycin with deoxydinucleotide d-CpG by two- dimensional proton magnetic resonance techniques. *Arch Biochem Biophys* 313(2): 189-205.
16. **Benhamou, J. P (1986).** Métabolisme hépatique des médicaments et lésions hépatiques médicamenteuses. *médecine/science* : 1,19,20.
17. **Booser, D. J et Hortorbagyi, G. N. (1994).** Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* 47(2): 223-58.
18. **Borg, J. M., Reeber A. (2008).** Biochimie métabolique, *Ellipses, France*: 257-269.
19. **Boufadi, Y. M., Soubhy, J., Riazi, A., Vanhaeverbeek, M., Néve, J., Boudjeltia, K. Z. et Antwerpen, P. (2014).** Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis.
20. **Boyanova, L., Kolarov, M., Kilgova, G., Mitov, M. (2006).** In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe* (12): 173-177.
21. **Burdock, G. A. (1998).** Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology* (36): 347-363.
22. **Caquet, R. (2008).** Numération formule sanguine, in : 250 examens de laboratoire. *Issy-les-Moulineaux : édition Elsevier Masson* : 290-3.
23. **DESCAT, F. (2002).** Hématologie du rat : hemogramme et myelogramme, Thèse du doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse.
24. **Di ,M. A., Gaetani, M., Dorigotti, L., Soldati, M. et Bellini, O. (1963).** Studi sperimentali sull'attivata' antineoplasica del nuevo antibiotico *daunomicina*. *Tumori* (49): 203-17.
25. **Dimov, V., Ivanoska, N., Manolova, N., Bankova, V., Nicolov, N., Popov, S. (1991).** Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. *Apidologie* (22): 155-162.

26. **Dobrowolski, J. M., Vohora, S. B., Sharma, K. (1991).** Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* (35): 77-82.
27. **Donadieu, Y. (2008).** La Propolis. *Editions Dangles*. 90.
28. **Doumas, B. (1971).** *Clin. Chim Acta*: 31- 87.
29. **Dubost, M., Granter, P., Maral, R., Ninet, L., Pinnert, S. (1963).** Un nouvel antibiotique à propriétés cytostatiques: la rubidomycine. *C. R. Academie des Sciences*: 1813-15.
30. **DUFOUR, A. (2014).** Indications, effets indésirables et particularités des antinéoplasiques , *Réseau de cancérologie de la Montérégie* : 75.
31. **Durdane, K., Gu, I. S., Kadriye, S., Bekir, S. (2002).** Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Elsevier, Food Chemisty* (78): 213-217.
32. **Ellman, G. L. (1959).** Plasma antioxidants. *Arch Biochemistry and Biophysics* 82: 70-77.
33. **Elstner, E. F., Youngman, R. J., Obwald, W. (1983).** Superoxyde dismutase in methods of enzymatic analysis., 3<sup>nd ed</sup>. *H. B Bergmeyer* (3): 293-303.
34. **Farber, J. L. (1994).** Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Environmental Health perspectives* (102) : 17-24.
35. **Favier, A. (2003).** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique* novembre: 108-115.
36. **Finstrom, M. S., Spivak, M. (2010).** Propolis and bee health, the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* (41) :295-311.
37. **Francisco, A. T. B., Garcia-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomas-Lorente, F. (1993).** Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis From Venezuela. *Phytochem* 1 (34): 191-196.
38. **Germain, E., Bonnet, P., Aubourg, L., Grangepon, M. C., Chajès, V., Bognoux, P. (2003).** Anthracycline-induced cardiac toxicity is not increased by dietary omega-3 fatty acids. *Pharmacological Research* (47): 111–117.
39. **Gewirtz, D. A. (1999).** A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 51(7) : 649-56.

40. **GHARBI, M. (2011)**. Les produits de la ruche, Origines - Fonctions naturelles - Composition, Propriétés thérapeutiques. Thèse du doctorat. université Claude-Bernard - Lyon I.
41. **Ghiszalberty, E. (1979)**. Propolis a review. *Bee World* 60 (2): 59-84.
42. **Goebel, M. (1993)**. Oral idarubicin an anthracycline derivative with unique properties. *Annals of Hematology* (66): 33-43.
43. **Gornall, A. G., Bardawill, C. J et David, M. M. (1949)**. Détermination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem* (177):751-66.
44. **Grange, J. M et Davey, R. W. (1990)**. Antibacterial properties of propolis. *Journal of The Royal Society of Medicine* (83): 159-160.
45. **Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R. (1990)**. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World* (71): 107-118.
46. **Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007)**. Free Radicals in Biology and Medicine. 4<sup>th</sup> ed. *Oxford university Press*: 20-31.
47. **Hany, A. O., Wafaa, R. M., Arafa, A. E. S., Shehata, B. A., Gamal, A. E. S., Arab, H. H., Elgendy, A. A. M. (2016)**. Hesperidin alleviates cisplatin-induced hepatotoxicity in rats without inhibiting its antitumor activity. *Pharmacological Reports, Elsevier* (68): 349-356.
48. **Hegazi, A. G., Abd El Hady, F. K. (1997)**. Egyptian Propolis: 3-Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. *Z Naturforsch* 57c: 395-402.
49. **Hewawasam, R. P., Jayatilaka, K. A. P. W., Pathirana, C., Mudduwa, L. K. B. (2003)**. Protective effect of *Asteracantha longifolia* extracts mouse liver injury induced by carbon tetrachloride and paracetamol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (55): 1413-1418.
50. **Ivanov, T. (1980)**. Composition and physico-chemical properties of propolis. *Zhivotnovudni* 17 (8), 96-103.
51. **Izuta, H., Shimazawa, M., Tsuruma, K. (2009)**. Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complement Altern Med* : 9-38.
52. **Jean-Prost, P et Conte, L. (2005)**. Apiculture. Connaître l'abeille, conduire le rucher. 7<sup>ème</sup> édition, *TEC & Doc Lavoisier*: 689.
53. **Justin, O. (1996)**. chemical composition and application. *Bee product*(45): 15- 26.

54. **Kaplowitz, N., DeLeve, L. D. (2007).** Drug-induced liver disease. New-York, London. *Informa healthcare*.
55. **KEBIECHE, M. (2009).** 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 Présentée pour l'obtention du diplôme en sciences d'option Biochimie. Université Mentouri Constantine.
56. **Kebieche, M., Lakroun, Z., Lahouel, M., Bouayed, Z. Meraihi, Soulimani, R. (2009).** Evaluation of epirubicin-induced acute oxidative stress toxicity in rat liver cell and mitochondria, and the prevention of toxicity through quercetin administration. *Elsevier Experimental and Toxicological Pathology* (61) :161-167.
57. **Kedzia, B et Holderna, E. (1986).** Investigations on the combined action of antibiotics and propolis on *staphylococcus aureus*. *Herba Pol* (32) :187-195.
58. **Kelley, D. S., Yuriko C. A., Zunino, S. J., Woodhouse, L. R., Bonnel, E. L., Breksa, A. P., Manners, G. D., Mackey, B. E. (2015).** Citrus limonin glucoside supplementation decreased biomarkers of liver disease and inflammation in overweight human adults. *Elsevier. journal of functional foods* (12): 271-281.
59. **Khayyal, M. T., El-Ghazaly, M., El-Khatib, A. S. (1993).** Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp Res* (19): 197- 203- 303.
60. **Krell, R. (1996).** Value-added products from beekeeping food and Agriculture Organization of the united nations. *Rome, Italy, FOA Agricultural Services, Bulletin*: 124.
61. **Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., Fillastre, J. P. (2004).** The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxidation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie Biologie* (52): 314-322.
62. **Larrey, D. (1997).** Hepatotoxicity of herbal medicines. *J Hepatol* 26(Suppl.1): 47-51.
63. **Larrey, D. (2000).** Drug-induced liver diseases. *J Hepatol* 32(Suppl. 1): 77-88.
64. **Lavie, P. (1975).** La propolis. *Edition: Apimondia. Bucharest* : 63-71.
65. **Le Bot, M. A., Bégué, J. M., Kernaleguen, D., Robert, J., Ratanasavanh, D., Riché, C., Guillouzo, N. (1988).** Different cytotoxicity and metabolism of doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, esorubicin and idarubicin in cultured human and rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology* (37): 3877-87.

66. **Li, R., Dong, L., Huang, J. (2005).** Ultra performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry for the determination of epirubicin in human plasma. *Analytica chemica Acta* (546): 167-173.
67. **Lopez, F. C., Bankova, V., Sforcin, J. M. (2003).** Effect of three vegetal sources of propolis on macrophages activation. *Phytomedecine* (10): 343-343.
68. **Maciejewicz, W., Daniewiski, M., Mielniczuk, Z., Suprynowicz, Z. (2001).** Gas chromatography-mass spectrometry investigation of propolis. Analysis of beta-steroids. *Acta Pol Pharm* (39), 277-279.
69. **Maraydele, J., Ann, S., Hechelman, E., Buvadari. S. (2001).** The Merk Index: An encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals, 13<sup>th</sup> *MERCK & CO* (2564) : 7928.
70. **Marcucci, M. C. (1995).** Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* (26): 83-99.
71. **Martin, F (2001).** Vannin-1, un nouveau régulateur moléculaire du stress oxydant et de l'inflammation. Thèse de Doctorat de l'Université de la Méditerranée, centre de l'immunologie de Marceille- Luminy.
72. **Martini, M. C et Seiller, M. (2006).** Actifs et additifs en cosmétologies. 3<sup>ème</sup> édition, *Lavoisier* : 338-350.
73. **Mégarbane. B., Deye, F. J. B. (2010).** Hépatites toxiques : mécanismes lésionnels et principes de prise en charge. *Elsevier Masson SAS* : 48.
74. **Merghem, R. (2010).** Origine et biogénèse des molécules d'origine naturelle, importance pour l'industrie pharmaceutique. Proceeding du 1er Séminaire national sur les substances bio actives d'origine végétale : 105-111.
75. **Metzner, J., Schneidewind, E. M. (1997).** Studies on the question of potentiating effects of propolis constituents. *Pharmazi* 33 (7).
76. **Milane, H. (2004).** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs novel dose modification scheme. *Europeen Journal of Cancer* 39, 580-586.
77. **Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., Sotah, T (1997).** Evaluation of propolis I.Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* 20, 497-501.
78. **Moudir, N. (2004).** Les polyphénols de la propolis algérienne. Thèse de magister en chimie. Université Mohamed Boudiaf, M'sila.
79. **Muggia, F. M. et Green, M. D. (1991).** New anthracycline antitumor antibiotics. *Crit Rev Oncol Hematol* (1),43-64.

80. **Murad, J. M., Calvi, S. A., Soares, M. V., Bankova, V., Sforcin, J. M (2002).** Effect of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophage against *Paracoccidivides Brasiliensis*. *J Ethnopharm* 79, 331-334.
81. **Negri, G., Marcucci, M. C., Salatino, A. M., Salatino, L. F. (2000).** Comb and propolis waxes from Brazil (states of Sao Paulo and Panama). *J Braz* 1, 5453-457.
82. **Nielsen, D., Jensen, J. B., Dom Bernowski, P., Munck, O., Fogh, J., Brynjoff, L., Havsteen, H., Hansen, M. (1990).** Epirubicin cardiotoxicity: a study of 135 patients with advanced breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 8: 1806-1810.
83. **Orsatti C. L., Missima F., Paglarione A. C. (2010).** Th1/Th2 cytokines expression and production by propolis treated mice. *J Ethnopharmacol* (129) :7-314.
84. **Ozcan, M. (2004).** Inhibition of *Aspergillus parasitus* NRRL2999 by pollen and propolis extracts. *J Med Food* (7) : 7-417.
85. **Pannala, A. S., Rice-Evans, C. A., Haliwell, B., Singh, S., (1997).** Inhibition of peroxynitrite- mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols. *Biochemical and Biophysical research Communications* (232): 164-168.
86. **Park, E. K., Kim, S. H., Park, S. S. (1996).** Anti-Inflammatory activity of propolis. *Archives. Pharmacy research* 19(15): 337-41.
87. **Pong, K. (2003).** Oxidative stress in neurodegenerative diseases: Therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. *Expert Opinion in Biological therapy* (3): 127-139.
88. **Popova, M., Bonkova, V., Chimov, A., Sileva, M. (2002).** A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylan balsamum* trees. *Apidologie* (33) : 87-88.
89. **Priebe, W. et Perez Soler, R. (1993).** Design and tumor targeting of anthracyclines able to overcome multidrug resistance: a double-advantage approach. *Pharmacol Ther* 60(2): 215-34.
90. **Rachel, T. (2007).** Pharmacist, Bpharm, Msc. *Tibotec* :1.
91. **Raja, S., Nazeer, A. K. F. H., Kumar, V., Mukherjee, K., Bandyopadyay, A., Mukherjee, P. K. (2007).** Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of ethnopharmacology* 109: 41-47.
92. **Rajagopal, G et Rafi, M. (2005).** Serum gamma glutamyl transferase ( $\gamma$ gt) activity in alcoholics with liver abscess and chronic alcoholics. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 20(2) 198-199.

93. **Ramos, A. F. N., Miranda, J. L. (2007).** Propolis a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J Venom Anim Toxins Inel Trop Dis* (13): 697-710.
94. **Richard, L. D. (2014).** Les fondamentaux de la pathologie digestive, Chapitre 6. Foie-Voies biliaires. *Elsevier-Masson*: 1-2.
95. **ROUSSEAU, F. (2014).** Toxicité cardiaque des anticancéreux , *Elsevier Mason* : 4.
96. **Santos, F. A., Bastos, E. M., Maia, A. B. R. A., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A. (2003).** Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on peridontopathogens. *Phytotherapy Research* (17): 285-289.
97. **Sauvager, F. (2014).** La propolis: définition, récolte, propriétés et utilisation: (3) : 18-33.
98. **Schnizler, P., Neuner, A., Nolkemper, S. (2010).** Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compound. *Phytother Res* 24(Suppl 1) : 20-8.
99. **Segueni, N. (2011).** Contribution à l'étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis .thèse de doctorat. En chimie pharmaceutique. Université de Constantine.
100. **Servais , S. (2004).** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1, France.
101. **Sterba, M., Popelová, O., Vávrová, A., Jirkovský, E., Kovarčíková, P., Geršl, V., Šimůnek, T. (2013).** Oxidative stress, redox signaling, and metal chelation in anthracycline cardiotoxicity and pharmacological cardioprotection. *Antioxid. Redox Signal.* (18): 899–929.
102. **Stickel, F., Patsenker, E., Schuppan, D. (2005).** Herbal hepatotoxicity. *J Hepatol* (43): 901-10.
103. **Tolman, K. G., Dalpiaz, A. S. (2007).** Occupational and environmental hepatotoxicity. Drug-induced liver disease. *New-York, London: Informa Healthcare* : 755-70.
104. **Türkez, H., Yousef, M. I., Geyikoglu, F. (2010).** Propolis prevents aluminium-induced genetic and hepatic damages in rat liver. Elsevier. *Food and Chemical Toxicology* (48) : 2741-2746.
105. **Twelves, C. J., Dobbs N. A., Michael, V. ( 1992).** Clinical pharmacokinetics of epirubicin . The importance of liver biochemistry tests. *Br. J. Cancer* (66): 765-769.

106. Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A. M., Avila, G., Franzblan, S., Singh, M., Maiese, W. M., Timmerman, B. N. (1999). Phytochemical, Morphological and Biological investigation of propolis from Central Chile. *Z.Naturforsch* (54c): 406-416.
107. Velikova, M., Bonkova, V., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I., Kujungiev, A. (2000). Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. *Z Naturforsch* 55(9-10), 785-9.
108. Vicente. C. S., Egido, J., González P. D., Novoa, L., Morales, A. I. (2008). Effect of the flavonoid quercetin on cadmium-induced hepatotoxicity. *Elsevier. Food and Chemical Toxicology* (46) :2279–2287.
109. Weenen, H., Van Maanen, J. M. S., Planque M. M. (1984). Metabolism of 4' modified of analogs of doxorubicin. Unique glucuronidation pathway for 4'-epidoxorubicin. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol* (20): 919-926.
110. Wu, J., Xia, X., Bin, Z., Wen, J., Hongmei, C., Rongmei, W., Deqing, S., Ruichen, G. (2016) The protective effects of paeonol against epirubicin-induced hepatotoxicity in 4T1-tumor bearing mice via inhibition of the PI3K/ Akt/NF-kB pathway. *Elsevier* (244): 1-8.
111. Wu, J., Xue, X., Zhang, B., Jiang, W., Cao, H., Wang, R., Sun, D., Guo, R. (2016). The protective effects of paeonol against epirubicin-induced hepatotoxicity in 4T1-tumor bearing mice via inhibition of the PI3K/Akt/NF-kB pathway. *Elsevier. Chemico-Biological Interactions* (244): 1-8.
112. Xu, B. H et Shi, M. Z. (2006). An invitro test of propolis against *Trichomonas vaginalis*. (24): 8-477.
113. Young, D. S. (1995). effect of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed : 573,589.