

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



Université de Jijel
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option : Toxicologie Moléculaire

Par
BENHAMADA Nabila

THEME

Contribution à l'évaluation histo-biochimique du stress oxydatif gastrique induit par le benzo(a)pyrène ou l'éthanol chez le rat. Mise en évidence de l'effet protecteur des extraits bruts de la propolis et de la plante *Petasites fragrans*

Présenté et soutenu devant le jury composé de :

Dr IDOUI Tayeb	MCA, Université de Jijel	Président
Dr RECHRECHE Hocine	MCA, Université de Jijel	Rapporteur
Dr LAHOUEL Mesbah	Pr, Université de Jijel	Examineur
Dr LEGHOUCHI Essaid	Pr, Université de Jijel	Examineur

Année universitaire 2011 - 2012

Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah; le Grand Miséricordieux et le tout Puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Je remercie mon directeur de thèse, Dr RECHRECHE Hocine, Maître de Conférences à l'Université de Jijel, pour son encadrement scientifique très formateur et de qualité, ainsi que pour les conseils et astuces qui ont permis de faciliter le travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr IDOUI Tayeb, Maître de Conférences à l'Université de Jijel et chef de Département de la Biologie Moléculaire et Cellulaire, d'avoir accepté de présider le jury.

Mes remerciements vont aussi aux professeurs LAHOUEL Mesbah ; Directeur du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire et LEGHOUCHI Essaid ; Doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et Sciences Exactes, pour l'honneur qu'ils nous ont fait pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à M^r SEBTI Mohamed Maître assistant chargé de cours à l'Université de Jijel pour sa contribution à l'identification de la plante Petasites fragrans.

Mes remerciements vont aussi à M^{me} BENHAMADA Ouahiba ; Maître assistant chargée de cours à l'Université de Jijel pour sa précieuse aide et ses conseils.

Une partie de ce travail de recherche a été réalisée au sein du Laboratoire d'Hygiène ; je tiens à remercier le Docteur CHIBOUT Imène.

La thèse n'est pas un long fleuve tranquille et je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à le traverser : M^{me} BOURAOUI Hadia, M^r IBECHHE Riad ; du laboratoire de Pharmacologie et Phytochimie, tous les ingénieurs et techniciens des laboratoires du Département de la Biologie Moléculaire et Cellulaire.

En fin, mes remerciements vont à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Liste des abréviations

$^{\circ}\text{OH}$: radical hydroxyl

8OHdG : 8-hydroxyl deoxyguanosine

BPDE : benzo(a)pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde

CAT : catalase

CYP 2E1 : cytochrome 2E1

CYP 450 : cytochrome P 450

dG-N2-BPDE : 10-(deoxyguanosin-N2-yl)-7, 8,9-trihydroxy- 7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene

DPPH: 2, 2-dihényl-1-picrylhydrazyle

EBM : extrait brut méthanolique

EEP : extrait éthanolique de la propolis

ETOH : éthanol

GCMS : gas chromatography mass spectrometry

GSH : glutathion

GST : glutathion-s-transférase

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

MDA : acide malonyl dialdéhyde

mg EAG/g EB : milligramme équivalent acide gallique par gramme d'extrait brut

mg EQ/g EB : milligramme équivalent quercétine par gramme d'extrait brut

O₂^{•-} : anion superoxyde

ROS : reactive oxygen species

UI/g : unités internationales par gramme

Liste des figures

Figure 1. Activation métabolique du B(a)P en BPDE et formation des adduits guanidiques.....	10
Figure 2. Voies métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres	13
Figure 3. Certains types des lésions de l'ADN induites par le stress oxydant.....	16
Figure 4. Implication des ROS dans les voies de signalisation cellulaire.....	17
Figure 5. Analyse par microscopie optique des estomacs de rats traités par le B(a)P	27
Figure 6. Evaluation des taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus gastriques de rats traités par le B(a)P	29
Figure 7. Evaluation des activités cytosoliques de CAT, de la GST et de GGT dans les tissus gastriques de rats traités par le B(a)P.....	31
Figure 8. Analyse par microscopie optique des estomacs de rats traités par l'ETOH	33
Figure 9. Evaluation des taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus gastriques de rats traités l'ETOH	34
Figure 10. Evaluation des activités cytosoliques de CAT, de la GST et de GGT dans les tissus gastriques provenant de rats traités par l'ETOH.....	35
Figure 11. Analyse de la composition chimique de l'EBE de la propolis par GCMS	37
Figure 12. Analyse de la composition chimique de l'EBM de la plante <i>P fragrans</i> GCMS	38
Figure 13. Activité antiradicalaire de l'EBM de la plante <i>P fragrans</i>	40
Figure 14. Analyse par microscopie optique des estomacs de rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EBE de la propolis.....	41
Figure 15. Evaluation des taux cytosoliques du MDA et de GSH dans les tissus gastriques de rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EBE de la propolis	42
Figure 16. Evaluation des activités cytosoliques de CAT, de la GST et de GGT dans les tissus gastriques de rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EBE de la propolis	43
Figure 17. Analyse par microscopie optique des estomacs de rats intoxiqués par l'ETOH et prétraités par l'EBM de la plante <i>P fragrans</i>	45
Figure 18. Evaluation des taux cytosoliques du MDA et de GSH dans les tissus gastriques de rats intoxiqués par l'ETOH et prétraités par l'EBM de la plante <i>P fragrans</i>	46
Figure 19. Evaluation des activités cytosoliques de CAT, de la GST et de GGT dans les tissus gastriques des rats intoxiqués par l'ETOH et prétraités par l'EBM de la plante <i>P fragrans</i>	47

Table des matières

I. Introduction.....	3
II. Revue bibliographique	
II.1. Quelques pathologies de l'estomac.....	5
II.1.1. Introduction.....	5
II.1.2. La gastrite.....	5
II.1.3. Cancers de l'estomac	6
II.2. Intoxications induites par le benzo(a)pyrène et l'éthanol.....	7
II.2.1. Intoxications induites par le benzo(a)pyrène	7
II.2.1.1. Métabolisation du benzo(a)pyrène.....	8
II.2.1.2. Mécanismes moléculaires de la toxicité induite par le benzo(a)pyrène	9
II.2.2. Intoxications induites par l'éthanol.....	11
II.2.2.1. Métabolisation de l'éthanol	11
II.2.2.3. Conséquences toxiques de l'oxydation de l'éthanol	11
II.3. Stress oxydatif.....	12
II.3.1. Mécanismes du stress oxydatif	12
II.3.1.1. Mécanismes pro-oxydants	13
II.3.1.2. Mécanismes antioxydants	14
II.3.2. Conséquences du stress oxydatif	15
II.4. Quelques sources de substances antioxydantes	17
II.4.1. La propolis	17
II.4.2. La plante <i>Petasites fragrans</i>	18
III. Matériel et méthodes	
III.1. Matériel végétal et produits chimiques.....	20
III.2. Animaux	20
III.3. Préparation de l'extrait brut méthanolique de la plante <i>Petasites fragrans</i>	20
III.4. Dosage des flavonoïdes et des polyphénols totaux de l'EBM de la plante <i>P. fragrans</i> .	20
III.5. Analyse par GC/MS des extraits bruts de la propolis et de la plante <i>P. fragrans</i>	21
III.6. Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'EM de la plante <i>P. fragrans</i>	21
III.7. Traitement des animaux traités par les différentes substances employées.....	22
III.8. Extraction et dosage des protéines cytosoliques totales	23
III.9. Mesure de l'activité enzymatique de CAT, de la GST et de GGT	23

III.10. Dosage des taux du GSH et du MDA.....	24
III.11. Analyse histologique par microscopie optique	25
III.12. Analyse statistique.....	26
IV. Résultats et discussion	
IV.1. Caractérisation de la toxicité gastrique induite par le benzo(a)pyrène	27
IV.1.1. Mise en évidence des altérations histologiques de l'estomac	27
IV.1.2. Etat du stress oxydatif gastrique induit par le B(a)P	28
IV.2. Caractérisation de la toxicité gastrique induite par l'éthanol	32
IV.2.1. Mise en évidence des altérations histologiques de l'estomac	32
IV.2.2. Etat du stress oxydatif gastrique induit par l'ETOH	33
IV.3. Caractérisation des extraits de la propolis et de la plante <i>P. fragrans</i>	36
VI.4. Effet gastroprotecteur de l'EEP contre la toxicité du B(a)P	40
VI.5. Effet gastropréventif de l'EBM de <i>P. fragrans</i> contre la toxicité de l'ETOH	44
V. Conclusion générale et perspectives.....	48
VI. Références bibliographiques	50

I. Introduction

Comme site d'entrée des xénobiotiques, le tractus gastro-intestinal dont la muqueuse de l'estomac, est exposé en continu aux divers produits chimiques exogènes qui sont largement distribués dans l'environnement [1]. L'atteinte de ces organes est d'origines multiples et dépend, par conséquent, du régime alimentaire et des intoxications environnementales. Les causes les plus retenues comme candidates fortes, impliquées dans le développement des troubles digestifs sont la fumée de cigarettes et la consommation d'alcool. Aujourd'hui, le tabagisme et l'alcoolisme constituent une préoccupation majeure de santé publique en Algérie.

La fumée de cigarettes contient de nombreux produits chimiques dont le benzo(a)pyrène [B(a)p], un hydrocarbure aromatique polycyclique, qui est métabolisé et activé dans le foie, il acquerrait ainsi, des propriétés mutogéniques et carcinogéniques [2]. Son rôle cancérigène est très bien documenté, il provoque des cancers de poumons, de l'œsophage et du pré-estomac [3, 4, 5 et 6]. Par ailleurs, la consommation excessive d'alcool provoque des dommages au niveau des tissus et des organes, conduisant à des maladies du cœur, du foie et d'autres manifestations incluant les troubles neurologiques. Ainsi, plusieurs études ont confirmé l'effet toxique de l'alcool sur la muqueuse gastrique, conduisant au développement de gastrites graves [7, 8, 9 et 10]. De plus, ces deux agents toxiques sont connus pour leur rôle dans la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [11]. À des concentrations modérées, ces dernières sont connues par leur rôle physiologique dans la signalisation et la régulation intracellulaire [12 et 13]. Cependant, au cours d'un stress oxydant, elles sont impliquées dans les altérations des principales macromolécules biologiques, en particulier, l'ADN et les protéines. De telles altérations, participent dans l'apparition de diverses pathologies gastriques inflammatoires ou cancéreuses [14 et 15].

Actuellement, l'étude de ce type de pathologies gastriques représente un axe de recherche très important dans le domaine gastro-entérologique. La production de modèles d'intoxications inflammatoires ou cancéreuses facilite plus ou moins la tâche. De telles procédures d'intoxications inflammatoires, ont été mises en place en utilisant divers produits chimiques comme l'éthanol (ETOH). De plus, le produit principal utilisé pour l'induction des cancers gastriques expérimentaux est le benzo(a)pyrène. L'étude des effets toxiques induits par l'éthanol dans le modèle inflammatoire, repose principalement sur l'évaluation de certaines enzymes impliquées dans sa métabolisation telles que l'aldéhyde déshydrogénase. Par ailleurs, les cancers gastriques

expérimentaux sont le plus souvent utilisés pour la recherche des effets anticancéreux potentiels de substances naturelles antioxydantes. Cependant, peu de recherches sont consacrées à l'étude de l'état oxydatif cellulaire dans ces deux modèles d'intoxications. Dans ce contexte, l'objectif du travail présenté ici, consiste à évaluer les toxicités provoquées par le B(a)P ou l'ETOH sur la muqueuse gastrique de rats. Cette évaluation, repose sur la caractérisation histologique des dommages tissulaires, ainsi que l'évaluation de l'état oxydatif cellulaire, en mesurant les activités de certaines enzymes antioxydantes et les taux du glutathion (GSH) et du malonyl dialdéhyde (MDA). De plus, dans le but d'examiner le rôle des antioxydants naturels dans la protection de certaines gastropathies, nous avons cherché à mettre en évidence la présence d'activités protectrices potentielles des extraits bruts alcooliques de la propolis et de la plante *Petasites fragrans*. En effet, nous avons évalué histologiquement et biochimiquement les bienfaits de ces extraits contre les effets toxiques induits par le B(a)P ou l'ETOH sur la muqueuse gastrique.

Notre stratégie, a reposé sur la construction de deux procédures d'intoxications chez le rat, l'une inflammatoire et l'autre cancéreuse, en utilisant l'ETOH et le B(a)P respectivement, et la caractérisation histologique et biochimique de l'état du stress oxydatif gastrique induit ainsi. Enfin, nous avons tenté de mettre en évidence les effets protecteurs des extraits bruts alcooliques de la plante *Petasites fragrans* et de la propolis contre ces deux xénobiotiques.

Notre manuscrit, commence par une introduction qui pose la problématique et l'objectif de notre travail, qui sont suivis par une deuxième partie relative à une revue bibliographique de l'essentiel sur quelques pathologies de l'estomac, les deux xénobiotiques (ETOH et B(a)P), le stress oxydant et quelques sources de substances antioxydantes. La troisième partie est consacrée à la description des méthodes et des techniques employées au cours de ce travail. Quant à la quatrième partie, elle présente et discute les résultats obtenus qui sont complétés par une cinquième partie dédiée à une conclusion générale et les perspectives envisagées. Enfin, le contenu de ce manuscrit est achevé par une sixième partie qui regroupe les principales références bibliographiques liées à ce travail.

II. Revue bibliographique

II.1. Quelques pathologies de l'estomac

II.1.1. Introduction

La paroi de l'estomac comprend quatre couches organisées de l'intérieur vers l'extérieur : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculaire et la séreuse. Sa vascularisation dépend du tronc cœliaque, celui-ci se divise en trois branches : l'artère splénique, l'artère gastrique gauche (ou coronaire stomachique) et l'artère hépatique commune, qui se déverse dans l'artère gastroduodénale et l'artère hépatique propre. Le drainage lymphatique de l'estomac suit habituellement la vascularisation artérielle [16 et 17].

Par ailleurs, la muqueuse de l'estomac comprend trois régions : la région cardiaque, voisine de l'œsophage ; la muqueuse du corps qui contient les glandes tubulaires, sécrétant l'acide gastrique et la muqueuse du pylore (antre) qui contient la majorité des cellules sécrétant la gastrine [18]. Chaque région de la muqueuse est la cible de pathologies différentes, en effet, les ulcères peuvent être originaires d'éléments caustiques, ce qui provoque une lésion de la muqueuse gastrique. Les gastrites, quant à elles représentent une inflammation de la muqueuse et de la sous-muqueuse. Les adénocarcinomes gastriques représentent aussi l'un des risques touchant l'estomac, ils sont généralement originaires d'un développement progressif des pathologies précitées [19, 20 et 21].

II.1.2. La gastrite

Le terme gastrite a été utilisé dans différents contextes pour décrire des symptômes des voies digestives supérieures, des signes macroscopiques d'inflammation ou de lésions gastriques visibles à l'endoscopie et des caractéristiques histologiques d'inflammation ou de lésions de la muqueuse gastrique observées au microscope optique. La gastrite se définit comme une inflammation de la muqueuse de l'estomac, ce terme devrait être strictement utilisé pour décrire les modifications caractérisées par un infiltrat muqueux de cellules inflammatoires [22].

On distingue deux types de gastrites : les gastrites aiguës et les gastrites chroniques. Les gastrites aiguës sont caractérisées par un infiltrat inflammatoire principalement à base de neutrophiles et qui sont habituellement de nature transitoire. L'inflammation peut s'accompagner d'une hémorragie ou d'une érosion de la muqueuse superficielle, mais en cas

de gastrite érosive aiguë sévère, un saignement gastro-intestinal peut être observé. Les gastrites aiguës peuvent être infectieuses, caustiques, médicamenteuses ou toxiques. Cependant, la notion de gastrites chroniques a évolué ces dernières années, elles sont caractérisées par un infiltrat de lymphocytes et/ou de plasmocytes qui peut également être associé à une métaplasie intestinale et à une atrophie de l'épithélium. Ces gastrites sont observées fréquemment à l'examen endoscopique, elles constituent un facteur de risque de cancérisation, de plus, elles peuvent être classées en gastrites superficielles, gastrites atrophiques ou gastrites hypertrophiques [23 et 24].

Les facteurs causant les gastrites sont multiples et variés, parmi eux, l'infection à *Helicobacter pylori* est la cause la plus fréquente. Dans ce contexte, la gastrite prédomine dans l'antrum et l'inflammation est lympho-plasmocytaire avec des polynucléaires. Elle évolue vers l'atrophie antrale, la métaplasie intestinale, et plus tardivement vers une atrophie fundique. D'autre part, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), certains médicaments et l'alcool sont les causes les plus fréquentes de gastropathies chimiques [25].

II.1.3. Cancers de l'estomac

Les cancers de l'estomac sont des pathologies multifactorielles. Ce sont des processus multi-étapes et lents, dans lesquels des facteurs environnementaux et génétiques semblent jouer un rôle certain [26]. Généralement, le cancer gastrique est une évolution progressive d'une gastrite chronique suivie par une atrophie, une métaplasie intestinale, une dysplasie et éventuellement un carcinome. Environ 90% des cancers gastriques sont des adénocarcinomes, les 10% restants représentent les tumeurs telles que les lymphomes, les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), et les tumeurs carcinoïdes [21 et 28].

Selon *Jarvi et Lauren* [28], les cancers de l'estomac sont classés histologiquement en deux formes : la forme intestinale et la forme diffuse. La forme intestinale est la plus fréquente, elle touche généralement les hommes âgés plus de 50 ans [28]. Ce type de cancer apparaît dans l'estomac atteint de gastrite atrophique et de métaplasie. La forme diffuse ne dépend pas de variation géographique, est fréquente chez les jeunes femmes dont l'histoire familiale est positive, elle n'est pas associée aux gastrites atrophiques ni aux métaplasies intestinales [29].

Les facteurs carcinogènes qui provoquent un cancer de l'estomac sont multiples et très variés, on peut citer : l'infection par *Helicobacter pylori* et par le virus *Epstein-Barr* et la consommation excessive de sel et des aliments fumés [30, 31 et 32]. Des facteurs classiquement considérés comme étant carcinogènes (le tabagisme, l'alcool et le thé vert) semblent avoir aussi un rôle dans le développement de la carcinogénèse gastrique [31]. De plus, les membres de familles ayant une histoire d'adénocarcinome gastrique, représentent une catégorie de population avec un risque de développement cancéreux qui est double ou triple [32]. En effet, le cancer gastrique familial semble être dû à une mutation au niveau du gène codant pour la protéine d'adhésion E-cadherine et globalement, l'implication de l'hérédité dans le développement de ce processus reste d'une intensité faible [28]. Dans des conditions précurseurs, un certain nombre de changements histologiques dans la muqueuse saine de l'estomac augmente significativement le risque d'adénocarcinome gastrique [26], on peut citer : la gastrite atrophique chronique, la maladie de ménétrier, les polypes adénomateux, l'ulcère gastrique et l'anémie pernicieuse [33, 34, 35 et 36]. D'autre part, la conversion des cellules gastriques normales en cellules tumorales est un processus très lent et graduel dans lequel des changements moléculaires multiples s'accumulent. Cette accumulation des altérations génétiques, inclut une mutation et/ou une amplification de l'expression des oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur [25].

Le traitement des cancers de l'estomac dépend, en premier lieu du stade de la maladie et des conditions des malades. Il peut être chirurgical, médicamenteux, basé sur la chimiothérapie et peut faire appel à une radiothérapie. Cependant, le traitement à visée curative du cancer gastrique repose sur la résection chirurgicale complète de la tumeur primitive et des territoires de drainage lymphatique [16 et 37].

II.2. Intoxications induites par le benzo(a)pyrène et l'éthanol

II.2.1. Intoxications induites par le benzo(a)pyrène

Le benzo(a)pyrène est un membre de la classe des hydrocarbures aromatiques polycycliques, dont la molécule comprend deux ou plusieurs noyaux aromatiques unis, et où des noyaux adjacents partagent deux ou plusieurs atomes de carbone, cette famille chimique compte plus d'une centaine de composés. Il est présent dans les produits complexes formés lors de la combustion incomplète ou la pyrolyse de matériaux organiques, dans les suies et les

fumées de toutes origines : les gaz d'échappement des moteurs à explosion et la fumée de cigarettes [38, 39 et 40]. A côté de l'inhalation de l'air pollué, la principale voie d'exposition au B(a)P est effectuée à travers la fumée de cigarettes et la nourriture [41]. Il a été démontré que ce produit provoque des effets cytotoxiques, teratogéniques, mutagéniques et carcinogéniques dans divers tissus et types cellulaires. L'exposition chronique des animaux de laboratoire à ce produit a été associée au développement de cancers primitifs dans la peau, l'estomac et les poumons [42 et 39].

II.2.1.1. Métabolisation du benzo(a)pyrene

Le métabolisme du B(a)P se déroule en deux étapes, la première, ou la phase I, comprend l'interaction du B(a)P avec des oxydases à fonctions mixtes et la formation de diolépoxydes, y compris le trans-9, 10-époxy-7, 8-dihydrodiol benzo(a)pyrène. La deuxième ou la phase II, comporte la conjugaison des intermédiaires métaboliques et du glutathion, des sulfates et de l'acide mercapturique ou glucuronique. Ces conjugués sont beaucoup plus hydrosolubles que les composés dont ils dérivent, ce qui permet leur excrétion rapide par le foie. Bien que le foie apparaisse comme l'organe principal de ce métabolisme, il existe des lieux secondaires : les tissus du poumon, l'appareil digestif, le placenta et la peau. En effet, l'endothélium est un site particulièrement actif de ce métabolisme [43].

L'induction des cytochromes P 450 (CYP 450) et des enzymes de phase II par le benzo(a)pyrène est régulée par le récepteur AhR (aryl hydrocarbon receptor) qui est normalement présent dans le cytosol sous la forme d'un hétérotétramère 9S en complexe avec deux protéines ; la protéine Heat shock 90 et la protéine XAP₂ (immunophilin-like protein hepatitis B virus X-associated Protein 2) [44]. Il existe trois principales voies de métabolisation du B(a)P, la plus importante implique la famille des cytochromes P 450 qui catalyse la mono-oxygénation de ce dernier en époxyde. La deuxième voie repose sur la formation d'un radical cationique, suite à l'oxydation à un électron, catalysée par les CYP 450 peroxydases. Enfin, une voie mise en évidence plus récemment implique la formation d'o-quinones à partir de catéchols, catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases [45].

Au cours de la première voie, les CYP P 450 et l'époxyde hydrolase sont les enzymes majeurs de l'oxydation du B(a)P en espèces capables d'interagir avec l'ADN. Ils l'oxydent pour former un époxyde qui se transforme en dihydrodiol par l'époxyde hydrolase [46]. Une

autre étape supplémentaire de la bio-activation catalysée par les CYP conduit à la formation des espèces réactives, benzo(a)pyrène-7, 8-dihydrodiol-9, 10-époxyde (BPDE) qui peut se lier à l'ADN, et former des adduits, préférentiellement au niveau des résidus guanine. Le 10-(deoxyguanosin-N2-yl)-7,8,9-trihydroxy- 7, 8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene (dG-N2-BPDE) est l'adduit à ADN majeur formé à partir de BPDE [47]. La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases a pour mécanisme l'oxydation à un électron du B(a)P par les peroxydases cellulaires et/ou potentiellement par les cytochromes P 450. Elle conduit à la formation de radicaux cationiques. Le radical cationique, contrairement au BPDE est instable chimiquement. Les métabolites générés par cette voie forment également des adduits avec les bases de l'ADN. De plus, la voie métabolique des quinones met en jeu des dihydrodiol déhydrogénases (DD), enzymes appartenant à la superfamille des aldo-céto réductases (AKR). La métabolisation du B(a)P diol par ces enzymes produit un catéchol. Ce catéchol subit deux oxydations à un électron avec la production concomitante d'espèces réactives de l'oxygène pour former des HAP o-quinones. La première oxydation produit un anion o-semiquinone et du peroxyde d'hydrogène suivie par une deuxième oxydation qui conduit à la formation d'o-quinone et d'un anion superoxyde. En présence d'équivalents réducteurs cellulaires (ex: NADPH), les HAP o-quinones peuvent aussi être réduits en catéchols, entraînant des cycles rédox supplémentaires qui amplifient la production d'espèces réactives de l'oxygène : H_2O_2 et O_2° [48].

Le système hépatobiliaire et le tractus gastro-intestinal sont les voies principales de l'élimination du B(a)P et de ses métabolites, quelle que soit la voie d'exposition [40]. L'excrétion se fait par l'urine sous forme de métabolites hydrosolubles, bien qu'il se produise un peu de réabsorption par la voie entérohépatique (excrétion biliaire suivie d'une réabsorption par la circulation sanguine) [49].

II.2.1.2. Mécanismes moléculaires de la toxicité induite par le B(a)P

L'activation métabolique du B(a)P provoque la formation d'adduits à ADN tels que le dG-N₂-BPDE, les dommages oxydatifs de l'ADN, la mutagénèse et la carcinogénèse. Les dommages de l'ADN associés au B(a)P proviennent principalement de la formation d'adduits stables du BPDE au niveau des groupes amino exocycliques des purines. Ces adduits stables du BPDE restent fixés à l'ADN à moins d'être pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN. D'autre part, des adduits dépurinants de la voie du BPDE ou de la voie du radical

cationique sont formés en position N₇ des purines, produisant des sites abasiques suite au relargage des adduits hors de l'ADN par déstabilisation de la liaison N-glycosidique (Figure 1) [50]. En plus, le B(a)P s'est révélé mutagène lors du dosage d'Ames [51 et 52]. Il possède une activité d'immunosuppresseur via l'inactivation des lymphocytes, son effet immunosuppresseur peut contribuer à sa carcinogénéité [53].

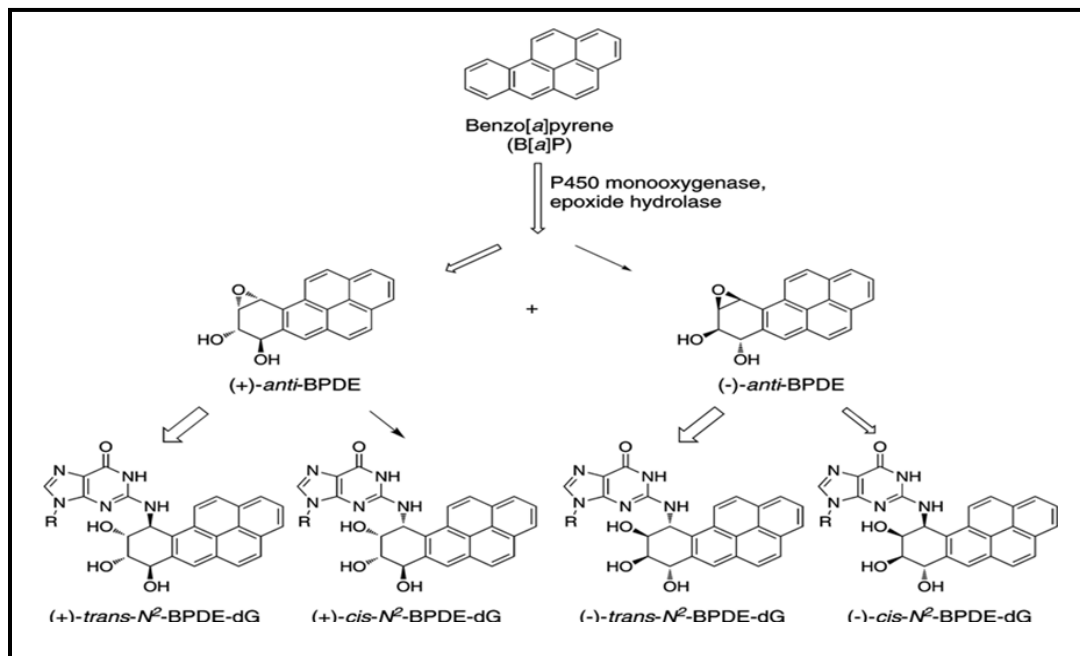


Figure 1. Activation métabolique du B(a)P en BPDE et formation des adduits guanidiques. L'activation métabolique du B(a)P la CYP 450 monooxygénase et l'époxyde hydrolase conduit à la formation du BPDE, celui-ci en réagissant avec la guanine donne l'adduit à ADN majeur qui est dG-N²-BPDE [54].

Les dommages oxydatifs de l'ADN jouent un rôle important dans le processus de la carcinogénèse induit par le B(a)P. En effet, sa transformation métabolique en dérivés de quinones via la voie des quinones génère facilement les ROS, ces dernières oxydent l'ADN [49]. Et comme résultat de l'interaction du radical hydroxyle avec l'ADN, il y a formation de plusieurs types de nucléosides oxydées, le 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) est l'une des modifications oxydatives de l'ADN qui est extrêmement utilisée pour l'étude de la mutagénéité [55]. Les ROS sont générées lors du cycle rédox des quinones, mais les CYP 1A1 peuvent également en produire au cours de leur activité catalytique [56]. Elles entraînent

des cassures simples et doubles brins, ainsi que des modifications au niveau des purines, des pyrimidines ou du désoxyribose [57].

II.2.2. Intoxications induites par l'éthanol

II.2.2.1. Métabolisation de l'éthanol

La voie principale d'absorption de l'éthanol est la voie digestive par diffusion lente au niveau gastrique. La majeure partie de l'ETOH (70 % à 80 %) est ensuite absorbée au niveau de l'intestin grêle (duodénum et jéjunum). Quand l'ETOH est ingéré à jeûne, la concentration maximale est atteinte rapidement, environ une demi-heure après l'ingestion [58].

La distribution de l'ETOH est très rapide (demi-vie de distribution de 7 à 8 minutes) aux organes très vascularisés comme le cerveau, les poumons et le foie [59]. Les concentrations dans ces différents organes sont très rapidement équilibrées avec les concentrations sanguines. Il est distribué dans l'eau libre sans liaison aux protéines plasmatiques, sa solubilité dans les graisses et les os est négligeable, son volume de distribution est donc celui de l'eau libre. La conséquence en est que des variations dans les proportions respectives de la masse grasse par rapport à la masse maigre influencent le volume de distribution de l'ETOH [60].

L'hépatocyte contient les trois principales voies métaboliques de l'alcool, la voie de l'alcool déshydrogénase dans le cytosol, le système d'oxydation microsomal situé dans le réticulum endoplasmique et la catalase située dans les peroxysomes. Chacune de ces voies métaboliques conduit à l'acétaldéhyde, un métabolite hautement toxique qui va être oxydé en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase. L'acétate est ensuite oxydé en dioxyde de carbone et en eau par les tissus périphériques [61]. L'élimination de l'ETOH se fait selon deux voies principales : l'oxydation enzymatique (métabolique) et l'excrétion sous forme inchangée, elle suit une cinétique michaélienne [62].

II.2.2.2. Conséquences toxiques de l'oxydation de l'éthanol

De très nombreuses études ont montré que les principaux facteurs responsables de désordres métaboliques et de la toxicité de l'ETOH étaient l'augmentation du NADH, la production d'acétaldéhyde, la génération de radicaux libres et l'induction du CYP 2E1 [63].

La principale conséquence métabolique de l'oxydation de l'ETOH dans le foie, est l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ (NAD⁺ étant le coenzyme des ADH et ALDH), ce qui entraîne une perturbation du métabolisme des glucides et des lipides. Cet événement, a lieu au niveau du cytoplasme et de la mitochondrie et est mesuré généralement par les rapports lactate/pyruvate et hydroxybutyrate β /acétoacétate respectivement [64]. De plus, l'acétaldéhyde, métabolite très toxique, car très réactif, est un intermédiaire obligatoire dans le métabolisme oxydatif de l'ETOH. Ce composé est capable de former des adduits aux molécules environnantes (protéines, enzymes, glutathion...). Ces adduits ont été retrouvés aussi bien au niveau du foie que du cerveau [65]. D'autre part, de nombreuses études ont mis en évidence la production de radicaux libres lors du métabolisme de l'ETOH. Ces radicaux libres sont à l'origine de la lipoperoxydation des membranes. Ils peuvent provenir de l'activité microsomale liée au CYP 2E1, de la chaîne respiratoire mitochondriale, source physiologique de radicaux libres ou de l'oxydation de l'acétaldéhyde par la xanthine oxydase [66]. Leur production est nettement liée à la présence de fer non lié à des protéines. Différents modèles expérimentaux ont montré un lien entre l'induction du CYP 2E1, la peroxydation lipidique et la toxicité hépatique [67]. L'oxydation de l'ETOH favorise l'induction de l'isoforme du cytochrome P 450 2E1, ce dernier peut catalyser la formation de ROS, comme il a été démontré qu'il générerait de quantités importantes de l'H₂O₂ [68].

II.3. Stress oxydatif

II.3.1. Mécanismes du stress oxydatif

Le métabolisme cellulaire produit à l'état physiologique une variété de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO). Par définition, ces radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent, sur leur orbitale la plus externe, au moins un électron non apparié, résultant soit d'un gain soit de la perte d'un électron [69], ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule [70]. Cependant, le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre les systèmes de défense antioxydants et la production d'espèces réactives oxygénées (ROS), en faveur de ces dernières. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents pro-oxydants, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool,

médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante et métaux toxiques) [71].

II.3.1.1. Mécanismes pro-oxydants

La respiration cellulaire au niveau de la mitochondrie constitue une des sources de radicaux libres oxygénés. Les espèces réactives de l'oxygène incluent le radical superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le radical hydroxyl (OH°) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sont produits lors du transfert des électrons et durant diverses voies métaboliques [72].

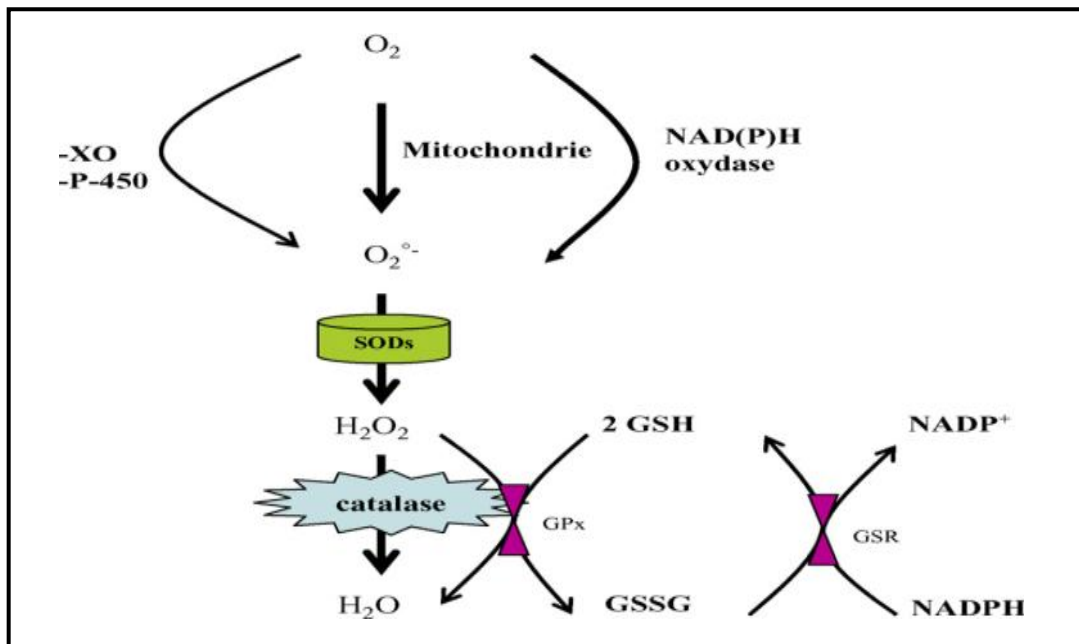


Figure 2. Voies métaboliques de production et d'élimination des radicaux libres. La dismutation de l'anion superoxyde par la superoxyde dismutase conduit à la formation du peroxyde d'hydrogène qui est transformé par la catalase en eau et en oxygène, ce dernier entraîne l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). GSR : glutathion réductase et XO: xantine oxydase [71].

L'addition d'un électron à l'oxygène conduit au $O_2^{\circ-}$, peu réactif par lui-même, mais représentant un précurseur d'espèces plus agressives. La dismutation du radical superoxyde catalysée par la superoxyde dismutase conduit, en effet, à la synthèse du H_2O_2 , qui peut participer à la biosynthèse du OH° via la réaction de Fenton Haber Weiss, ce dernier réagit avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant dans son voisinage immédiat. Le radical OH° apparaît ainsi comme l'espèce réactive ayant une responsabilité majeure dans la

cytotoxicité des radicaux libres [73]. L'anion superoxyde peut également réagir directement avec la forme réactive azotée NO (monoxyde d'azote) pour donner le peroxyde d'azote (ONOO⁻), puissant agent pro-oxydant [74]. De plus, les cellules phagocytaires peuvent produire, grâce à la myéloperoxydase (MPO), enzyme présente dans les granules azurophiles des neutrophiles, des oxydants chlorés du type acide hypochloreux (HOCl) à partir du peroxyde d'hydrogène, qui en présence de groupements amines, entraîne la formation de chloramines (R-NHCl) de durée de vie plus longue [75].

II.3.1.2. Mécanismes antioxydants

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression des oxydants grâce à divers mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques [76]. Le système de défense enzymatique est constitué principalement de trois enzymes, il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx).

La SOD est impliquée dans la neutralisation d'O₂^{o-} en le transformant en H₂O₂, selon une réaction dite de dismutation [70]. D'autre part, la CAT est localisée dans les peroxysomes, elle existe en forte concentration dans le foie et les globules rouges. Au niveau sub-cellulaire, elle se retrouve dans le cytosol et dans les peroxysomes. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire [77]. De plus, les glutathion peroxydases et réductases sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La GPx exerce sa fonction en réduisant d'une part le peroxyde d'hydrogène en molécule d'eau, et d'autre part les hydroperoxydes organiques (ROOH) en alcools et en oxydant simultanément le glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSH), alors que la glutathion réductase (GR), à son tour intervient dans la régénération de GSH à partir de GSSH, en présence d'un cofacteur, le NADPH [15].

S'agissant du système antioxydant non enzymatique, celui-ci regroupe plusieurs molécules endogènes comme le glutathion. Des composés comme les thiorédoxines, les glutarédoxines et les métallothionéines, joueraient sans doute un rôle protecteur, même si l'importance de leur action n'a pas été encore clairement établie [71]. D'autres composés, tels que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes apportés par les aliments, agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant les électrons non appariés,

les transformant ainsi en molécules ou ions stables. Les oligo-éléments comme le sélénium et le zinc semblent avoir aussi des propriétés antioxydantes [78 et 79].

II.3.2. Conséquences du stress oxydatif

Les dommages liés à un stress oxydant se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires, telles que l'oxydation de l'ADN et des protéines ou encore la peroxydation des lipides [80].

Les lipides sont la cible privilégiée de l'attaque par les radicaux libres. La peroxydation lipidique désigne l'attaque de ces lipides (principalement les acides gras polyinsaturés) par ces radicaux libres [71]. Elle comporte trois étapes : la phase d'initiation est le résultat de l'attaque de lipide par le radical HO° , qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical lipidique. La phase de propagation commence par la formation au contact de l'oxygène d'un lipoperhydroxyle qui réagit avec un autre acide gras pour former un hydroxyperoxyde lipidique et un autre radical lipidique, assurant ainsi la propagation du processus. La phase de terminaison correspond à diverses réactions de couplage entre deux radicaux hydroxyles qui se terminent par formation des produits non radicalaires [81 et 82].

Les radicaux libres entraînent également l'oxydation des protéines, qui sont particulièrement sensibles à leur action. Plusieurs mécanismes directs ou indirects de modifications sont connus. Les protéines les plus touchées, sont celles comportant un groupement sulfhydryle (-SH), comme c'est le cas pour de nombreuses enzymes et protéines de transport. Le peroxyde d'hydrogène, mais surtout le radical hydroxyle sont capables d'oxyder ces groupements, conduisant à l'inactivation de certaines enzymes. En particulier, la présence de radicaux hydroxyles est à l'origine de dégradations irréversibles des protéines, par la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés. Ainsi, l'histidine, l'arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées de ce processus d'altération oxydative [71 et 83].

D'autre par, les altérations oxydatives causées par les ROS sont considérées comme la source majeure de dommages spontanés de l'ADN. Le spectre des dégâts causés par ces dernières est large avec plus d'une centaine de lésions différentes [84]. Ces dégâts sont

regroupés en quatre grandes catégories : les coupures simples et doubles brins, la modification de bases, la formation de sites abasiques et les pontages ADN-protéines : catégories auxquelles se rajoutent les adduits de dérivés oxydés. Ainsi, les bases qui composent la molécule d'ADN, et particulièrement la guanine, sont très sensibles à l'oxydation [71 et 85].

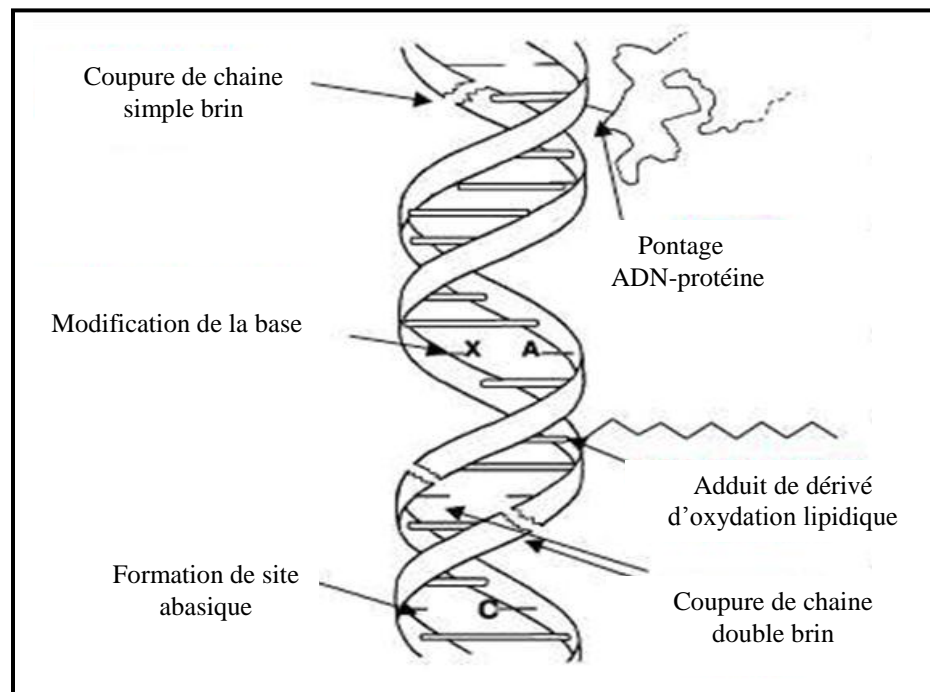


Figure 3. Certains types des lésions de l'ADN induites par le stress oxydant. Les ROS sont responsables d'un certain nombre de dégâts de l'ADN, notamment : les coupures simples et doubles brins, la modification de bases, la formation de sites abasiques, les pontages ADN-protéines et les adduits de dérivés oxydés [71].

Les dommages liés au stress oxydant touchent en parallèle les voies de transduction et de signalisation cellulaire, les ROS peuvent activer directement quelques processus de phosphorylation serine/thréonine. De plus, elles sont impliquées dans les événements mutationnels au niveau du gène *ras* et l'activation des facteurs de transcription nucléaires. Des expérimentations ont conclu que l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont capables d'induire l'activation du facteur de transcription l'*AP-1* par phosphorylation des protéines *Jun* [86]. D'autres parts, l'activation de *p53* et de *NF-Kappa B* dépend aussi du stress oxydatif. Il a été rapporté que l'activation de *NFAT* (nuclear factor of activated *T* cell) peut se faire à travers la génération du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [15].

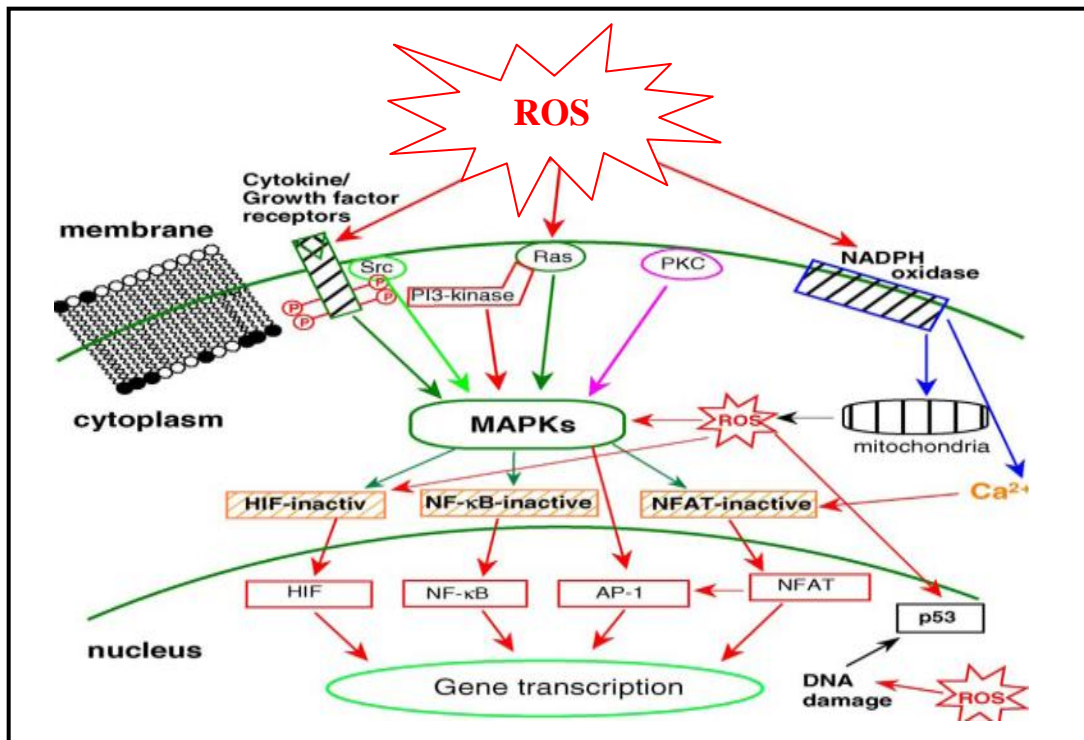


Figure 4. Implication des ROS dans les voies de signalisation cellulaire. Les ROS activent la voie signalétique des MAPKs ce qui conduit par la suite à l'activation des facteurs de transcription nucléaires [15].

II.4. Quelques sources de substances antioxydantes

Les produits naturels représentent un réservoir de diverses substances douées de propriétés antioxydantes, dans ce contexte, les flavonoïdes, les polyphénols et les terpènes connus comme métabolites secondaires des plantes représentent une source exogène de ces substances [87 et 88]. Nous aborderons dans la partie suivante une brève note sur la propolis et la plante *Petasites fragrans* : leurs compositions et leurs utilisations biologiques.

II.4.1. La propolis

La propolis est un produit naturel formé par les abeilles et est largement utilisé pour traiter diverses maladies. Les abeilles collectent à partir de certaines plantes des substances résineuses et balsamiques, ces dernières sont transportées vers les ruches, et sont utilisées pour fermer les ouvertures et protéger la ruche contre la contamination bactérienne et fongique. Cette substance résineuse est ré-collectée, nettoyée, triée et filtrée dans des conditions standards. L'extrait de la propolis est utilisé par la suite pour la préparation de diverses formulations pharmaceutiques : capsules et crèmes. La composition chimique de la

propolis est variable, elle est en relation avec la région où les abeilles collectent la résine. La composition chimique générale inclue : 55% de résines et blasâmes, 30% de cires, 10% de pollen, et des métabolites secondaires incluant : acides phénoliques et leurs esters, flavonoïdes, terpènes, beta-stéroïdes, acides aromatiques et sesquiterpènes [89 et 90].

La propolis possède un large spectre d'activités biologiques, elle est reconnue par sa capacité d'améliorer les activités du système immunitaire, et ses activités antioxydante, antitumorale et antibactérienne. Ainsi, la composition chimique de la propolis en acides phénoliques et flavonoïdes confère aux membranes cellulaires son activité antioxydante en minimisant les dommages oxydatifs induits par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Sa capacité à piéger les radicaux libres est largement documentée [90 et 91]. De plus, la propolis réduit la viabilité des cellules cancéreuses via l'inhibition du Cytochrome C réductase. Sa cytotoxicité peut être liée à la fragmentation de l'ADN. Elle peut inhiber la croissance cellulaire en arrêtant G0/G1. Ces événements impliquent une diminution de l'activité kinase du complexe Cycline D/Cycline dépendant Kinase 4 [92, 93 et 94]. Comme elle peut réduire la production des prostaglandines et des leucocytes au cours de l'inflammation. En effet, la propolis régule la synthèse de l'ADN et la production des cytokines inflammatoires [89].

II.4.2. La plante *Petasites fragrans*

L'homme, depuis l'antiquité, utilise des plantes pour se soigner sans qu'il ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissaient [95]. Environ 250 000 à 500 000 espèces de plantes ont été répertoriées dans le monde, un pourcentage faible (1 et 10 %) est utilisé comme nourriture pour l'homme et les autres espèces animales alors qu'un taux plus élevé est utilisé pour des besoins médicaux [96].

La famille des *Asteraceae* ou *Compositae* est une importante famille qui comprend près de 15 000 à 25 000 espèces réparties en 1 000 à 1 100 genres. Ce sont essentiellement des plantes herbacées même s'il peut exister des arbres, des arbustes ou des lianes dans cette famille. Les fleurs sont alternes ou opposées, parfois en rosettes basale (ou terminales chez les arbustes monocaules), simples, entières ou découpées, parfois composées, et ne présentent pas de stipules [96]. Le genre *Petasites* est une plante herbacée vivace qui appartient à la famille des *Asteraceae* (*Compositae*). Il a été reporté d'être une source riche de sesquiterpène lactones, en particulier eremophilane et bakkenane, certains sesquiterpènes avec un squelette

eremophilane et ceux de type bakkenolide montrent des propriétés antitumorales potentielles [97, 89 et 99].

La plante *Petasites fragrans* (*P fragrans*) est un arbre perpétuel rhizomateux, de croissance qui peut atteindre 0.5 m de hauteur dans les régions Méditerranéennes. La reproduction de cette espèce se fait végétativement et par les graines. Les feuilles présentent un aspect de cuire avec une surface inférieure pubescente, les fleurs sont vertes, à expansion tubulaire, et fortement fragrant, se disposant dans des petits groupes [100 et 101]. La systématique de cette plante est la suivante [102]:

Règne : *Plantae*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous classe : *Asteridae*

Ordre : *Asterales*

Famille : *Asteraceae*

Genre : *Petasites*

Espèce : *Petasites fragrans*

La plante *P fragrans* contient plusieurs constituants les principaux sont les sesquiterpènes, comme le *petasol*, *l'isopetasol*, *le s-petasin*, *le neo s-petasin* et les phytostérols. Les racines sont utilisées dans le traitement des douleurs aiguës du tractus urinaire, alors que les feuilles ne sont pas recommandées pour traiter les douleurs et les coliques. Actuellement, l'effet antispasmodique a été démontré expérimentalement par l'extrait méthanolique des racines fraîches [103 et 104].

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel végétal et produits chimiques

La propolis utilisée dans ce travail a été fournie auprès du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire (Université de *Jijel*), sous forme d'extrait éthanolique (EEP). Par ailleurs, la plante utilisée (*Petasites fragrans*) a été récoltée pendant le mois de Mai 2010 de la région de *Djimla* située au Nord Est de la wilaya de *Jijel*. Les racines sont récupérées, bien lavées à l'eau courante, puis mises au séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 3 mois. De plus, le benzo(a)pyrène a été obtenu de *Sigma*, Aldrich, France.

III.2. Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats femelles de la souche *Wistar*. Ils ont été fournis par l'Institut *Pasteur*, Algérie, et ont été élevés dans des cages en plastiques, et mis en quarantaine pendant trois semaines, avec accès libre à la nourriture et à l'eau. L'animalerie a été maintenue à des conditions contrôlées pendant toute la période de l'étude.

III.3. Préparation de l'extrait brut méthanolique de la plante *Petasites fragrans*

L'extrait méthanolique de la plante *P. fragrans* a été préparé en utilisant le protocole décrit par *Bruneton* [105]. Une quantité de la poudre obtenue après broyage des racines bien séchées de la plante, a été additionnée de trois volumes de son poids (360 ml) de méthanol à 70 %, puis laissée à macérer pendant 48 heures. Le mélange a été ensuite filtré et le filtrat a été évaporé, en utilisant un évaporateur rotatif à une température de 45 °C. Après évaporation, le produit résiduel a été lyophilisé pendant 16 heures, et l'extrait brut méthanolique (EBM) a été récupéré et conservé à l'abri de la chaleur et de la lumière.

III.4. Dosage des flavonoïdes et des polyphénols totaux de l'EBM de la plante *P. fragrans*

La teneur en flavonoïdes totaux a été estimée, selon la méthode de *Djeridane et al* [106]. Le principe de dosage des flavonoïdes totaux repose sur la propriété de ces composés à chélater les ions aluminium. La couleur jaune obtenue est le résultat de formation du complexe flavonoïdes-Al. En bref : 1.5 ml de l'extrait à 2 mg/ml ont été additionnés de 1.5 ml de chlorure d'aluminium (AlCl₃) à 2 %, puis incubés pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité. La concentration en flavonoïdes de l'EBM de la plante a été déterminée en mesurant l'absorption optique à 430 nm et en se référant à une courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (2 mg/ml) comme standard. La teneur moyenne en flavonoïdes a été exprimée en milligrammes équivalent quercétine par gramme d'extrait brut (mg EQ/g EB).

D'autre part, le taux des composés phénoliques totaux de l'EBM de la plante a été estimé selon la procédure d'*Othman et al* [107]. La méthode de Folin-Ciocalteu est considérée comme étant la meilleure méthode pour la quantification des polyphénols totaux. En effet, elle repose sur la capacité d'un phénol à réduire le réactif Folin-Ciocalteu de couleur jaune constitué de l'acide phosphotungstique et l'acide phosphomolibdique en milieu alcalin, en un mélange de tungstène et de molybdène de couleur bleue, dont l'absorbance maximale est comprise entre 700-760 nm. Pour ce faire, 0.2 ml de l'EBM de la plante à 250 µg/ml a été additionné de 1.5 ml de réactif Folin Ciocalteu dilué à 1/10, le mélange a été ensuite incubé pendant 5 min, à température ambiante et à l'obscurité. 1.5 ml de Na₂CO₃ à 7.5 %, ont été ajoutés au mélange précédent, puis réincubés pendant 90 min à température ambiante et à l'obscurité. La concentration en composés phénoliques de l'EBM de la plante a été déterminée en mesurant l'absorption optique à 750 nm, en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique (250 µg/ml). La teneur moyenne en flavonoïdes a été exprimée, en milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait brut (mg EAG/g EB).

III.5. Analyse par GC/MS des extraits bruts de la propolis et de la plante *P. fragrans*

L'analyse fine de la composition chimique des extraits bruts alcooliques de la propolis et de la plante *P. fragrans* a été réalisée selon le protocole décrit par *Bankova et al* [108], en utilisant le chromatographe QP 210 de shimadzu équipé d'un injecteur Split, et d'une colonne capillaire SE30 (25 m X 0.25 mm). La séparation chromatographique a été réalisée, en utilisant l'hélium N55 comme gaz vecteur à un débit de 0.7 ml/min. La température était programmée entre 100 et 310 °C à une vitesse de 5 °C/min. Les extraits bruts de la propolis et de la plante *P. fragrans* ont été repris dans le méthanol, puis filtrés, et 1 µl de la solution obtenue a été injecté dans le chromatographe, selon, le mode Split pendant 1 min. L'identification des pics a été obtenue, en utilisant la bibliothèque des spectres de masse NIST (*the National Institute of Standards and Thechnology*).

III.6. Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'EBM de la plante *P. fragrans*

Nous avons testé la capacité de l'EBM de la plante *P. fragrans* à piéger le radical DPPH° (2, 2-dihényl-1-picrylhydrazyle), selon la méthode préconisée par *Brand-Williams et al* [109]. Pour ce faire, 100 µl de concentrations différentes de l'EBM de la plante *P. fragrans* ont été incubés, en présence de 3 ml d'une solution éthanolique de DPPH à 0.025 g/l pendant 30 min, à l'obscurité et à température ambiante, et la densité optique a été mesurée à 517 nm.

Le pourcentage de réduction du radical DPPH° a été déterminé, en calculant le rapport entre le différentiel de l'absorbance témoin/échantillon et l'absorbance de l'échantillon seul.

III.7. Traitement des animaux par les différentes substances employées

Nous avons utilisé des rats femelles de souche *Wistar*, dont le poids est compris entre 150 et 200 g. Deux modèles d'intoxications ont été développés, en utilisant soit le B(a)P, un produit cancérigène, selon la procédure décrite par *Gunning et al* [110], soit l'ETOH, un produit gastrotoxique selon la procédure préconisée par Hernandez-Munoz et Montiel-Ruiz [111]. Nous avons aussi cherché à tester la présence d'effets protecteurs potentiels des extraits bruts de la propolis et de la plante *P. fragrans* contre, respectivement, les méfaits du B(a)P et l'ETOH.

Quatre lots d'animaux de 3 rats chacun ont été utilisés pour l'induction de la toxicité du B(a)P. Le premier lot a reçu 1 ml de l'huile d'olive et représentait le lot témoin, le deuxième a reçu une dose unique de B(a)P dissous dans l'huile d'olive à 100 mg/Kg du poids animal par voie intra-péritonéale. Le troisième lot, a reçu une dose unique de B(a)P dissous dans l'huile d'olive à 100 mg/Kg du poids animal par voie intra-péritonéale, suivi par une dose quotidienne de l'extrait brut éthanolique de la propolis à 100 mg/Kg du poids animal, et ceci, à partir de la 15^{ème} semaine et pendant 3 jours. Enfin, les animaux du quatrième lot ont reçu une dose quotidienne de l'extrait brut de la propolis à 100 mg/Kg du poids animal, et ceci, à partir de la 15^{ème} semaine et pendant 3 jours. Les animaux ont été ensuite laissés au repos avec accès libre à la nourriture et à l'eau pendant 1 jour.

S'agissant de l'induction de la gastrite par l'éthanol, nous avons constitué quatre lots d'animaux de 3 membres chacun. Le premier, n'a reçu aucun traitement et a servi de témoin, alors que le deuxième lot a été traité par 1 ml de l'ETOH 50% par gavage après une nuit de soumission au jeun, puis les animaux ont eu accès libre à l'eau de boisson contenant 5 % de l'ETOH pendant 5 jours. Les animaux du troisième lot ont été soumis au jeun pendant une nuit, puis traités par l'EBM de la plante *P fragrans* à 100 mg/Kg du poids animal, ils s'en suivaient, 5 minutes plus tard, un traitement par une dose unique de l'ETOH 50% qui était finalisé par un accès libre des animaux à l'eau de boisson contenant 5 % de l'ETOH pendant une période de 5 jours dans laquelle les rats ont parallèlement reçu une dose quotidienne de l'EBM de la plante à 100 mg/Kg du poids animal. Enfin, le dernier lot a reçu une dose

quotidienne de l'EBM de la plante à 100 mg/Kg du poids animal pendant 5 jours. Les animaux ont été ensuite laissés au repos avec accès libre à la nourriture et à l'eau pendant 1 jour.

III.8. Extraction et dosage des protéines cytosoliques totales

Après sacrifice des animaux par anesthésie en utilisant l'éther de pétrole dans un dessiccateur en verre, les estomacs ont été prélevés, vidés et lavés par l'eau physiologique puis congelés à -20°C en attendant leur utilisation dans les dosages biochimiques. Les fractions cytosoliques ont été préparées, selon, la méthode de *Cadirci et al* [112]. Pour ce faire, les tissus gastriques ont été découpés en petits fragments, puis homogénéisés dans une solution de NaCl 0.9 %, en utilisant l'homogénéisateur de Dounce (*Kontes, Glass company an ISO-9001 steered firm New Jersey USA*). La suspension ainsi obtenue, a été centrifugée à 18000 g pendant 15 min et le surnageant obtenu a été employé pour mesurer les activités de CAT et de la GST.

Le taux des protéines dans le cytosol a été déterminé par la méthode de *Lowry* [113]. Pour ce faire, 1 ml de la fraction cytosolique a été ajouté de 1 ml du réactif de *Lowry* et le mélange obtenu a été incubé pendant 15 min à température ambiante. Ensuite 3 ml de Folin Ciocalteux 10 % ont été ajoutés et laissés reposer pendant 45 min à température ambiante à l'abri de la lumière. En fin, la concentration en protéines a été déterminée en mesurant l'absorption optique à 750 nm et en utilisant une gamme 'étalon' préparée par la BSA (serum albumin bovin), et les concentrations des protéines ont été exprimées en milligrammes par gramme de tissu.

III.9. Mesure de l'activité de CAT, la GST et GGT

L'activité de CAT a été déterminée par la méthode de *Clairborne* [114]. En bref, un mélange réactionnel a été formé de 1 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.2), 0.95 ml de peroxyde d'hydrogène (0.019 M) et 0.025 ml de l'extrait cytosolique et l'activité enzymatique a été obtenue en mesurant les densités optiques à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. Le calcul de l'activité enzymatique a été déterminé selon la relation suivante :

$$\text{CAT en UI/g de protéines} = [2.303/\Delta T \log (A_1/A_2)] / \text{g de protéines} \quad (A_1 : \text{absorbance au temps } 0 \text{ min} ; A_2 : \text{absorbance au temps } 1 \text{ min et } \Delta T : \text{intervalle de temps en min}).$$

De plus, l'activité cytosolique de la GST a été déterminée par la méthode de *Habig et al* [115]. Pour ce faire : 890 µl du tampon phosphate (0.1 M et pH 6.5) ont été ajoutés de 50 µl du CDNB (1-Chloro-2,4-dinitrobenzene) (20 mM) et ensuite incubés pendant 10 minutes à 37 °C. Puis, 50 µl de glutathion (20 mM) ont été mélangés avec 50 µl d'homogénat. L'activité de la GST a été obtenue en mesurant les densités optiques à 430 nm pendant 5 minutes d'intervalle d'une minute. L'activité de la GST a été exprimée en utilisant le coefficient d'extinction de CDNB de 9.6 mM/cm et selon l'équation suivante :

$$\text{GST en UI/g de protéines} = [(\text{DO}_{\text{éch}} - \text{DO}_{\text{blanc}}) \times 100 / (9.6 \times 0.05)]/\text{g de protéines} \quad (\text{DO}_{\text{éch}} : \text{absorbance de l'échantillon à 340 nm et } \text{DO}_{\text{blanc}} : \text{absorbance du blanc à 340 nm})$$

S'agissant de l'activité de GGT, elle a été déterminée selon la méthode de *Meister et al* [116]. En bref : la fraction cytosolique a été préparée en homogénéisant 1g du tissu avec 3 ml du tampon Tris MgCl₂ (tris 0.1 M, MgCl₂ 20 mM, pH 9), l'homogénat obtenu ainsi, a été centrifugé à 4000 rpm/min pendant 15 min en utilisant la centrifugeuse *BIOBLOCK SCIENTIFIC 55702*, puis, 50 µl du surnageant ont été incubés pendant 30 min à 25 °C, en présence de 200 µl de substrat (L-gamma-glutamyl paranitroanilide, 1 mM), de 100 µl de tampon (tris-MgCl₂) et de 650 µl d'eau distillée. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide acétique (1N). Enfin, l'activité de GGT a été obtenue en mesurant la densité optique à 405 nm et selon l'équation suivante :

$$\text{GGT en UI/g de protéines} = [(\text{DO}_{\text{éch}} - \text{DO}_{\text{blanc}}) \times 0.0602 \times V_{\text{éch}}]/\text{g de protéines} \quad (\text{DO}_{\text{éch}} : \text{absorbance de l'échantillon à 405 nm ; } \text{DO}_{\text{blanc}} : \text{absorbance du blanc à 405 nm et } V : \text{volume de l'échantillon}).$$

III.10. Dosage des taux du GSH et du MDA

Nous avons quantifié les taux du GSH en utilisant la méthode colorimétrique d'*Ellman* [117], son principe est basé sur la scission de la molécule d'acide 5,5, dithiodis 2-nitrobenzoïque (DTNB) par le glutathion, qui permet de libérer l'acide thionitrobenzoïque (TNB), lequel, est capable d'absorber à 412 nm à pH alcalin (8-9). Le protocole expérimental a été établi comme suit : 1 g de l'estomac a été homogénéisé avec 3 volumes d'acide trichloroacétique (TCA) 5 % à l'aide d'un broyeur de Dounce, puis centrifugé à 2000 tours pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse *BIOBLOCK SCIENTIFIC 55702* . Ensuite, 50 µl

du surnageant ont été dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 8) et 3 ml du mélange dilué obtenu ainsi, ont été additionnés de 20 μ l du DTNB (0.01 M). Après 15 minutes d'incubation, la densité optique à 412 nm a été effectuée contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Le taux de GSH a été déduit à partir d'une gamme 'étalon' de glutathion préparé dans les mêmes conditions que précédemment et les concentrations ont été exprimées en millimoles de glutathion par gramme de l'estomac.

S'agissant du dosage du MDA, nous avons utilisé la méthode d'*Ohkawa et al* [118]. Pour ce faire : 1 g de l'estomac a été additionné de 3 ml de solution de KCL 1.15 % puis broyé par un homogénéisateur de Dounce. A 0.5 ml de l'homogénat, nous avons rajouté 0.5 ml d'acide trichloroacétique 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique 0.67 %. Le mélange a été ensuite chauffé pendant 15 minutes à 100 °C et refroidi et puis additionné de 4 ml de n-butanol. Ensuite, le mélange obtenu a été centrifugé à 3000 rpm pendant 15 minutes à l'aide de la centrifugeuse *BIOBLOCK SCIENTIFIC 55702* et la densité du surnageant a été mesurée à 530 nm. Les concentrations du MDA ont été déterminées en utilisant les valeurs de la densité optique et une gamme 'étalon' de 1,1,3,3-tétraméthoxypropane et exprimées en nanomoles par gramme de tissu.

III.11. Analyse histologique par microscopie optique

Lors du sacrifice des animaux, leurs estomacs ont été prélevés, coupés longitudinalement, vidés et lavés par une solution de NaCl 9 ‰, puis fixés dans le formol 10 % pendant 48 heures. Après fixation, les organes ont été déshydratés dans des bains successifs de 20 min chacun dans l'éthanol 70°, l'éthanol 90° et l'éthanol absolu, puis deux bains de xylène et ensuite, inclus dans la paraffine. Après le découpage des blocs histologiques d'une épaisseur de 5 μ m à l'aide d'un microtome, les coupes histologiques ainsi obtenues ont été étalées sur des lames avec un gel de gélatine 2 %, puis séchées pendant 1 heure à une température d'environ 60 °C. Les coupes ont été ensuite déparaffinées dans du xylène et de l'éthanol puis réhydratées dans des concentrations décroissantes de l'éthanol et dans l'eau distillée puis colorées par l'hématoxyline et l'éosine. Après un rinçage, les lames ont été trempées dans trois bains successifs d'éthanol 100 % (décoloration) puis passées rapidement dans un bain de toluène. Elles ont été ensuite scellées avec une lamelle à l'aide d'une colle EUKITT et conservées dans des boîtes à températures ambiante jusqu'à l'analyse sous microscopes [119].

III.12. Analyse statistique

Les données numériques et graphiques ont été représentées sous forme de moyennes et écart-types. Ces dernières ont été calculées en utilisant *Microsoft Office Excel 2007*. Les résultats des groupes traités par le benzo(a)pyrène et par l'éthanol et ceux témoins ont été comparés en utilisant le test *t-student*, alors que ceux de l'étude de l'effet protecteur des extraits bruts de la propolis et de la plante *Petasites fragrans* ont été comparés par une analyse de la variance (*ANOVA*) en utilisant le logiciel *SPSS 13.0*.

Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée statistiquement significative et on admet que :

Résultat significatif : $p < 0.05$: (*) ;

Résultat très significatif : $p < 0.01$: (**) ;

Résultat hautement significatif : $p < 0.001$: (***) ;

NS : représente un résultat non significatif.

IV. Résultats et discussion

IV.1. Caractérisation de la toxicité gastrique induite par le benzo(a)pyrène

Nous avons examiné la toxicité gastrique induite par le B(a)P chez le rat à travers, d'une part, l'évaluation d'altérations histologiques des tissus gastriques, et d'autre part, en quantifiant un certain nombre des paramètres du stress oxydatif (activités de CAT, la GST et la GGT et taux du MDA et de GSH).

IV.1.1. Mise en évidence des altérations histologiques de l'estomac

Les coupes histologiques des organes provenant des rats témoins et ceux traités par le benzo(a)pyrène, qui sont préparées précédemment et colorées par l'hématoxyline et l'éosine ont été examinées par microscopie optique (Gx100). Nous avons observé la présence de dommages gastriques chez le groupe de rats traités par le B(a)P comparativement avec le groupe de rats témoins qui présentait une muqueuse tout à fait normal. En effet, nous avons constaté la présence d'altérations comprenant une atrophie de la muqueuse gastrique caractérisée par des érosions et accompagnée d'une perte des cellules glandulaires qui étaient remplacées par des cellules musculaires (figure 6A, T).

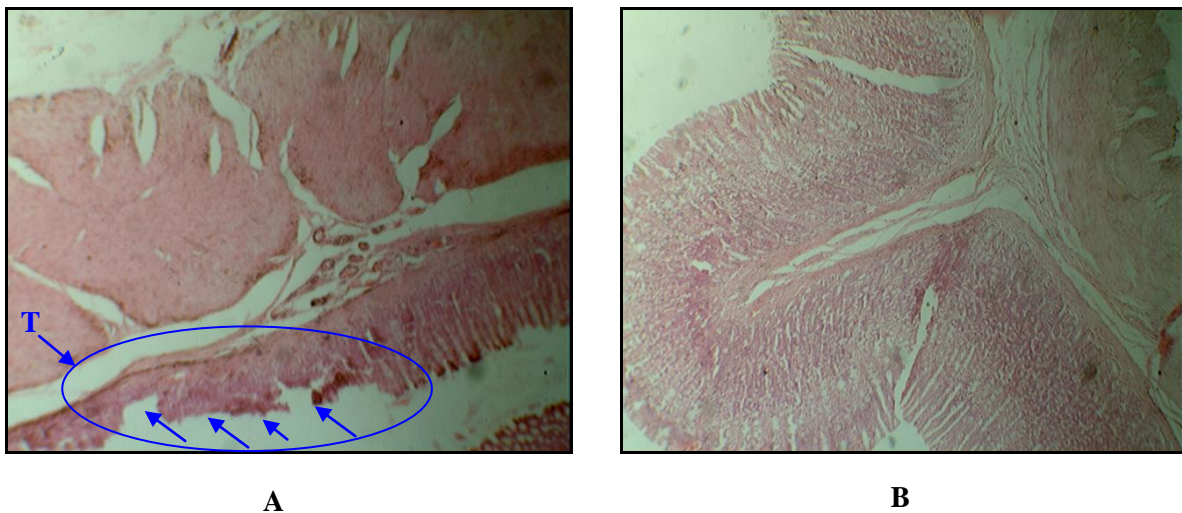


Figure 5. Analyse par microscopie optique des estomacs de rats traités par le B(a)P. Des coupes histologiques ont été préparées à partir des estomacs de rats traités ou non par le B(a)P et observées par microscopie optique (Gx100), après coloration à l'hématoxyline et l'éosine, selon le protocole de Martoja et Martoja [119]. A : animaux traités par 100 mg/Kg du B(a)P par voie intra-péritonéale montrant une atrophie de la muqueuse désignée par le cercle T ; B : animaux non traités montrant un aspect normal de la muqueuse.

Le B(a)P est un carcinogène puissant, capable d'induire des néoplasies gastriques chez le rat [87, 120 et 6]. Au cours de notre travail, nous n'avons pas pu obtenir une intoxication qui s'apparentait à l'état cancéreux gastrique après traitement par le B(a)P. Cet état de fait peut être expliqué de deux manières différentes, la première s'explique par l'inefficacité de la procédure d'administration du B(a)P (voie intra-péritonéale), en effet, il aurait été préférable d'utiliser la procédure de *Wattenberg et al* qui consiste à l'administration par gavage du B(a)P [121]. La deuxième cause de notre échec à produire le modèle expérimental cancéreux induit par le B(a)P, pourrait être liée à l'interférence du véhicule utilisé (huile d'olive) avec l'action du B(a)P. En effet, *Kasi* et ses collaborateurs, ont démontré que l'huile d'olive pourrait supprimer l'efficacité de l'effet nocif du B(a)P [122].

Etant donné, que l'atrophie de la muqueuse représente généralement une étape importante qui précède la carcinogénèse gastrique [123], et qu'elle a été due à une intoxication chronique de l'estomac induite par le B(a)P, nous pouvons suggérer que l'apparition de l'atrophie de la muqueuse de l'estomac était un début d'une carcinogénèse gastrique.

IV.1.2. Etat du stress oxydatif gastrique induit par le B(a)P

Le statu oxydatif au niveau de l'estomac a été évalué, après traitement des rats par le B(a)P à raison d'une dose intra-péritonéale unique de 100 mg/Kg, par caractérisation des activités enzymatiques de CAT, la GST et GGT ainsi que des taux de GSH et du MDA.

Pour étudier l'état oxydatif induit par les ROS au niveau cellulaire, la quantification du MDA et de GSH représente l'une des approches les plus pertinentes. L'acide malonique dialdéhyde est produit au cours du stress oxydatif. L'augmentation de sa concentration dans les membranes extra- et intra-cellulaires résulte des dommages occasionnés au niveau cellulaire, tissulaire ou des organes. L'altération de sa concentration est un indicateur qui reflète le niveau de la peroxydation lipidique dans n'importe quel organe [10]. Selon la figure 7, l'administration du B(a)P à raison de 100 mg/Kg par voie intra-péritonéale aux rats, en une seule dose, a conduit à une augmentation très significative ($p < 0.01$) des taux du MDA par un facteur de dix fois, comparativement avec ceux enregistrés chez les rats témoins. Il a été démontré que l'administration du B(a)P à raison de 50 mg/Kg pendant 28 jours, en utilisant le protocole de *Wattenberg*, dont le but de produire un modèle expérimental d'un cancer du pré-estomac chez les souris provoquait une augmentation de la peroxydation lipidique caractérisée

par la présence d'un taux élevé du MDA gastrique chez les animaux traités [121 et 87]. Cette augmentation peut être le résultat d'une production importante de radicaux libres ou d'une accumulation de ces derniers dans les tissus [11 et 124].

Par ailleurs, le glutathion est un antioxydant cellulaire majeur. Il possède des fonctions physiologiques vitales, incluant la protection des cellules contre les ROS, la détoxification des composés exogènes et le transport des acides aminés [125, 126 et 127]. Il est abondamment distribué dans les cellules du tractus gastro-intestinal des humains et des animaux. De nombreuses pathologies sont associées à la diminution de sa concentration intracellulaire [128, 129, 130, 131 et 132]. Ainsi, de telle concentration est importante pour la survie des cellules. Dans cette étude, nous avons observé des changements significatifs au niveau des concentrations de GSH dans les tissus gastriques du groupe d'animaux traités par le B(a)P. Le taux cytosolique de ce thiol chez les rats traités a été diminué significativement ($p < 0.05$) par un facteur de cinq fois si on le compare avec celui chez les rats non traités. Il a été rapporté que, chez l'homme, l'exposition au B(a)P provoquait une réduction de GSH gastrique et des dommages au niveau de cet organe [10].

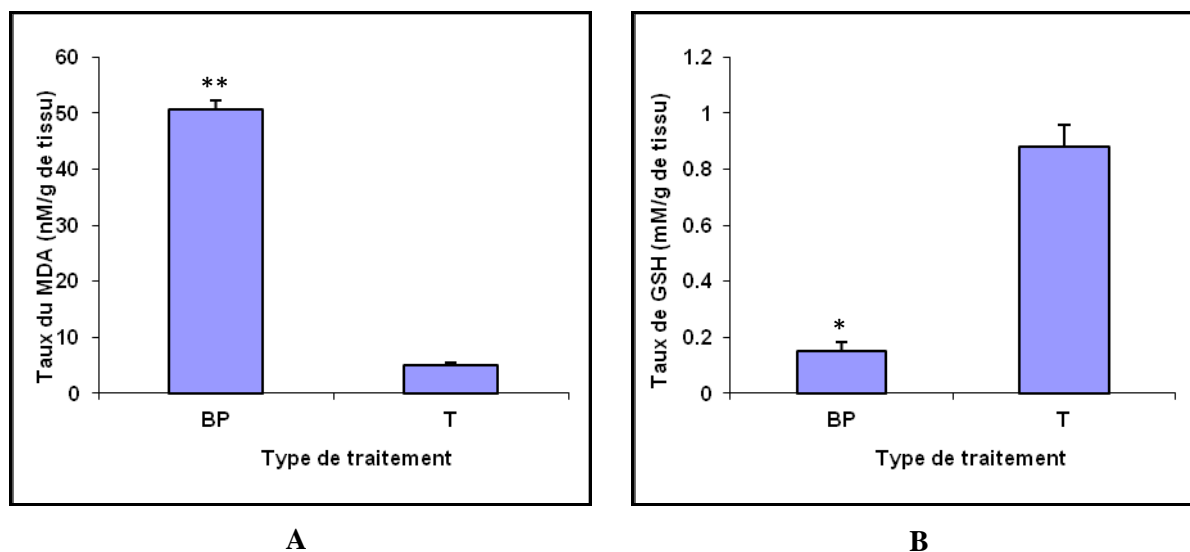


Figure 6. Evaluation des taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus gastriques de rats traités par le B(a)P. Les taux du MDA (A) et du GSH (B) ont été évalués à partir des tissus gastriques provenant d'animaux traités ou non par le B(a)P, respectivement et ceci, selon le protocole d'Ellman et d'Ohkawa et al [117 et 118]. BP : animaux traités par 100 mg/Kg du B(a)P par voie intra-péritonéale ; T : animaux non traités ; (*) : résultat significatif ; (**): résultat très significatif.

La diminution de la concentration en GSH pourrait être le résultat d'un épuisement de ce dernier dans les cellules gastriques ou la diminution de la γ -glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase, toutes les deux servent pour sa synthèse [127]. En effet, l'augmentation du taux du MDA et la diminution de celui du GSH chez les rats traités par le B(a)P est la preuve d'une perturbation dans l'état oxydatif cellulaire, ce produit toxique est donc la source d'un stress oxydant.

En plus de l'évaluation des taux du MDA et de GSH, les activités de CAT, de la GST et de GGT au niveau des tissus gastriques ont été quantifiées. Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus, ce sont les enzymes antioxydantes les plus efficaces dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène en molécules d'eau prévenant ainsi, la formation de radicaux hydroxyles [133]. D'autre part, les glutathion-s-transférases catalysent la réduction des produits chimiques et des espèces électrophiles par le glutathion, elles participent alors, à la protection des tissus contre la peroxydation lipidique [134 et 135]. Quant aux γ -glutamyl transpeptidases, elles catalysent le transfert des groupes γ -glutamyl et interviennent donc dans la régulation des taux de glutathion, le transport des acides aminés, le stockage des peptides nitrogènes et la synthèse des protéines [136].

L'exposition des rats aux B(a)P est à l'origine de changements significatifs des activités de ces enzymes dans les tissus gastriques. Nous avons observé une diminution significative ($p < 0.05$) des activités de CAT et de la GST chez les rats traités (308.33 ± 53.75 UI/g de protéines et 395 ± 71.54 UI/g de protéines respectivement) par rapport à celles des rats non traités (1671.96 ± 94.42 UI/g de protéines et 599.99 ± 28.93 UI/g de protéines respectivement). Ce résultat, est en accord avec celui obtenu par *Amresh* et ses collaborateurs qui ont utilisé la procédure de *Wattenberg* pour l'administration du B(a)P [87 et 121]. Par ailleurs, nous avons noté une élévation significative ($p < 0.05$) des taux de la GGT chez les rats traités (147.5 ± 2.5 UI/g de protéines) par rapport à ceux obtenus chez les rats témoins (49.1 ± 4.34 UI/g de protéines). Ainsi, nous suggérons que l'augmentation de l'activité de cette enzyme pourrait être liée à une déplétion des taux du GSH gastrique (résultat déjà démontré).

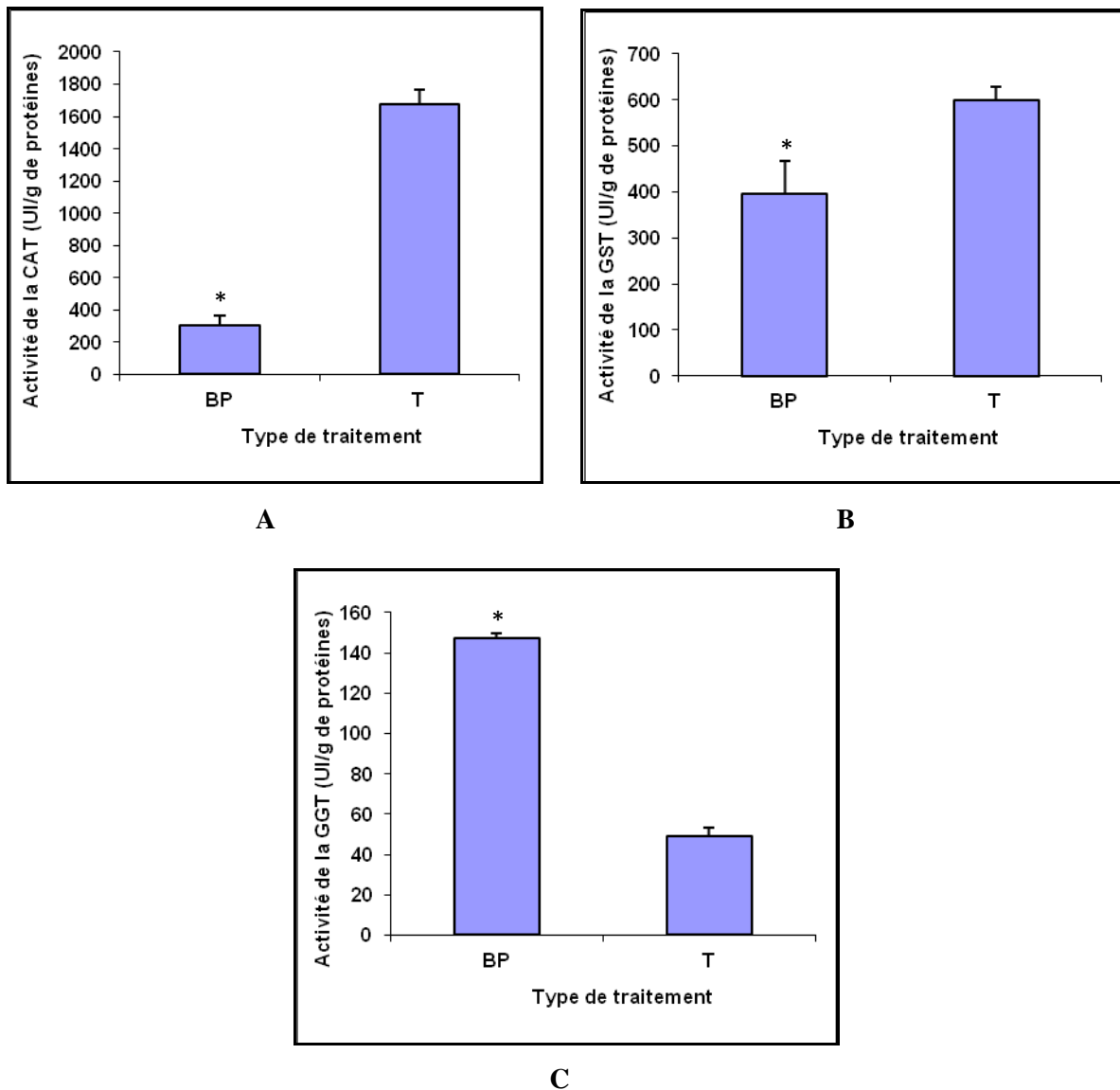


Figure 7. Evaluation des activités cytosoliques de CAT, de la GST et de GGT dans les tissus gastriques de rats traités par le B(a)P. Les activités de ces trois enzymes (A, B et C) ont été quantifiées dans la fraction cytosolique des tissus gastriques d'animaux traités ou non par le B(a)P, respectivement et ceci, selon, Clairborne et al, Habig, et Meister et al [114, 115 et 116]. BP : animaux traités par 100 mg/Kg du B(a)P par voie intra-péritonéale ; T : animaux non traités ; (*) : résultat significatif.

Enfin, il est très remarquable de penser que l'administration du B(a)P aux rats a entraîné une altération du statu oxydatif gastrique par la production excessive des ROS à travers une baisse des activités de CAT et de la GST, notamment. De telle perte de l'activité de ces deux enzymes pourrait être induite par l'inhibition de la transcription des ARNm codant des protéines impliquées dans le stress oxydant régulée par le facteur de transcription Nrf2. Ce dernier est séquestré dans le cytoplasme par la protéine Keap1 dans les conditions

physiologiques, mais, et qu'est transloqué dans le noyau au cours d'un stress oxydant, ce qui entraîne la transcription des gènes antioxydants [137]. Ainsi, la diminution des activités de ces enzymes peut être résultante de leur altération oxydative par les ROS [138]. De plus, une augmentation assez importante de l'activité de GGT induite par l'administration du B(a)P, représentait un point clé de sa toxicité, des données expérimentales ont indiqué que la surexpression de GGT est liée à des processus cancérogéniques, ce qui renforce les résultats, précédemment, obtenus et discutés (IV.1.1) [139 et 140].

IV.2. Caractérisation de la toxicité gastrique induite par l'éthanol

Le modèle animal de la gastrite a été utilisé pour caractériser la toxicité gastrique de l'éthanol, à travers, l'analyse des altérations induites par l'ETOH au niveau histologique et aussi du point de vue de l'état du stress tissulaire oxydatif (évaluation des activités de CAT, la GST, la GGT et les taux du MDA et du GSH).

IV.2.1. Mise en évidence des altérations histologiques de l'estomac

La caractérisation histologique de la toxicité induite par l'éthanol dans les tissus gastriques de rats, a été réalisée après préparation et coloration des tissus d'intérêt par l'hématoxyline et l'éosine, les lames obtenues ont été examinées par microscopie optique (Gx100). En effet, l'observation microscopique de la structure tissulaire des estomacs des rats traités par l'ETOH, a montré la présence de dommages plus ou moins graves.

Nous avons noté la présence de signes d'une gastrite caractérisée par une infiltration d'éléments inflammatoires à base de neutrophiles et de zones hémorragiques (figure 9A, I). Par contre, l'histologie des estomacs des rats témoins a montré un aspect normal de la muqueuse. Les dommages gastriques induits par l'éthanol sont généralement caractérisés par des œdèmes de la muqueuse, des hémorragies subépithéliales et une infiltration des cellules inflammatoires. Il a été démontré que l'éthanol induisait ces dommages au niveau de la muqueuse, via, l'activation des médiateurs inflammatoires qui induisent une vasoconstriction/ischémie et puis la mort cellulaire [141]. Ainsi, nous avons pu établir l'induction de la gastrite par l'ETOH chez le rat, nos résultats étaient en accord avec ceux obtenus par *Hernandez-Munoz et Montiel Ruiz et Vázquez-Ramírez* [111 et 8].

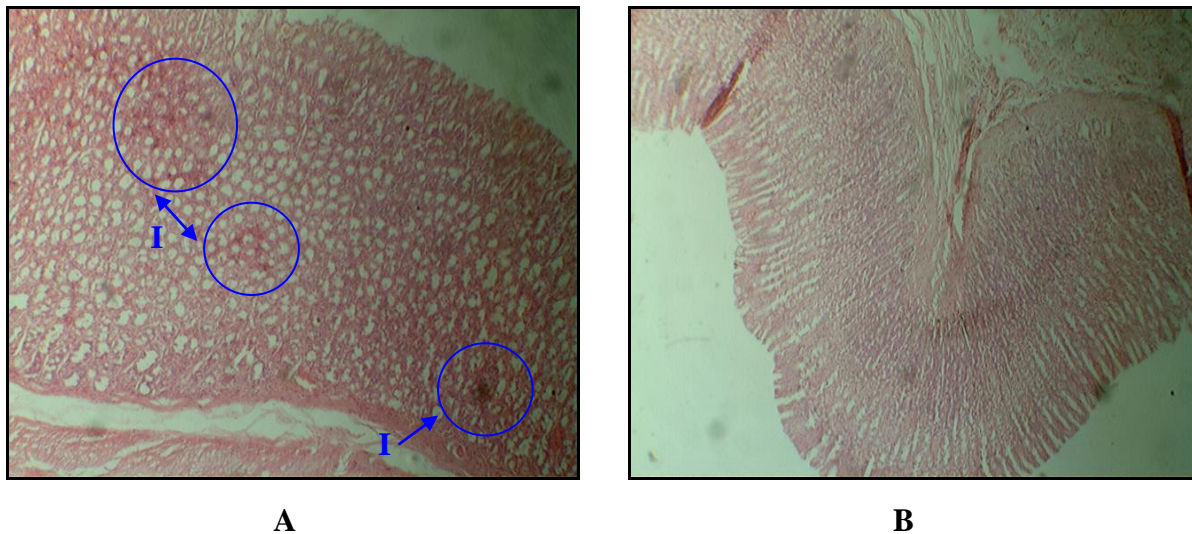


Figure 8. Analyse par microscopie optique des estomacs de rats traités par l'ETOH. Des coupes histologiques ont été préparées à partir des estomacs de rats traités ou non par l'ETOH et observés par microscopie optique (Gx100), après coloration à l'hématoxyline et l'éosine, selon le protocole de Martoja et Martoja [119]. A : animaux traités par 50 % d'éthanol montrant une inflammation avec des zones hémorragiques désignées par les cercles I ; B : animaux témoins montrant un aspect normal de la muqueuse.

IV.2.2. Etat du stress oxydatif gastrique induit par l'ETOH

Comme il a été mentionné précédemment, le modèle animal de la gastrite a été conduit, en administrant de l'éthanol 50 % aux rats pendant 5 jours, et après le sacrifice des animaux, les organes d'intérêt ont été prélevés, et l'état du stress oxydatif a été évalué par le dosage de certains paramètres oxydatifs au niveau cytosolique.

L'administration de l'ETOH a permis de provoquer une augmentation significative ($p < 0.05$) de la peroxydation lipidique, exprimée par une élévation des taux du MDA dans les tissus gastriques provenant de rats traités par l'ETOH. En effet, le taux du MDA a atteint une valeur de 11.59 ± 1.24 nM/g de tissus traités contre 3.56 ± 0.39 nM/g de tissus témoins, c'est à dire une augmentation d'environ 76.5 % (figure 10A). Ces résultats sont supportés par des travaux récents concernant l'effet de l'éthanol sur la peroxydation lipidique dans les tissus gastriques chez le rat [120, 142 et 143]. De telle peroxydation pourrait être le résultat d'une modification importante du statut redox cellulaire dans l'estomac en faveur des pro-oxydants, car l'ETOH s'est avéré générateur de radicaux libres, ou d'une production importante ensuite une accumulation de ces derniers dans les tissus [11 et 124].

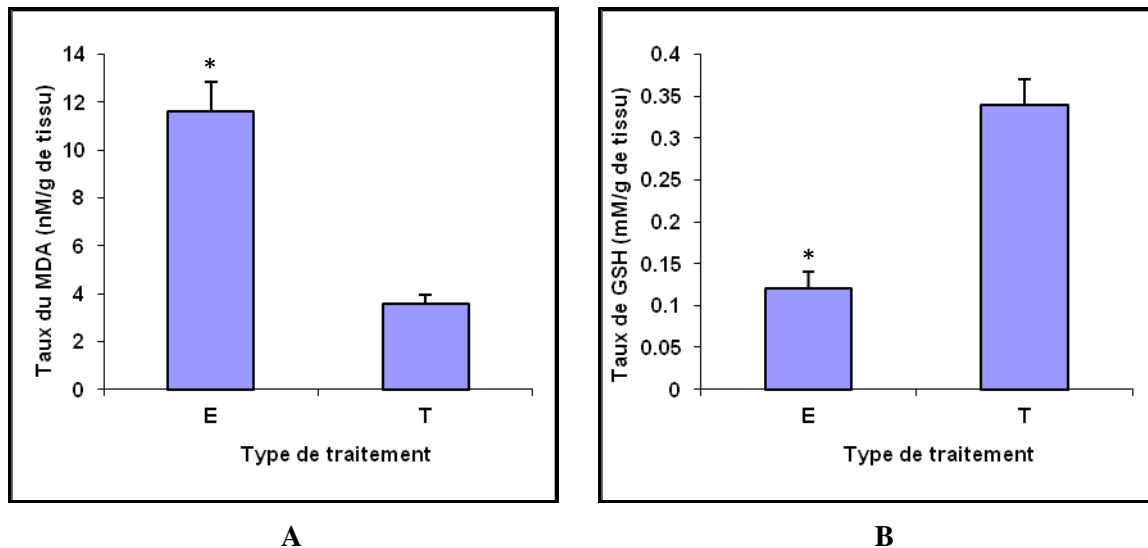


Figure 9. Evaluation des taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus gastriques de rats traités par l'ETOH. Les taux du MDA (A) et du GSH (B) ont été évalués à partir des tissus gastriques provenant d'animaux traités ou non par l'ETOH, respectivement et ceci, selon, le protocole d'Ellman et d'Ohkawa et al [117 et 118]. E : animaux traités par 50 % de l'ETOH par voie orale pendant 5 jours ; T : animaux témoins ; (*) : résultat significatif.

De plus, l'exposition des animaux à l'ETOH pendant une durée de cinq jours a provoqué une diminution significative ($p < 0.05$) de la concentration du GSH [une valeur de 0.12 ± 0.02 mM/g de l'estomac contre une valeur de 0.34 ± 0.03 mM/g de l'estomac chez les rats non traités], c'est-à-dire une diminution qui représente 26.08 % (figure 10B). Loguercio et ses collaborateurs ont montré que l'ETOH provoquait une augmentation du stress oxydatif par une baisse du GSH gastrique [144]. Cette chute du taux de GSH pourrait être expliquée par une baisse des activités enzymatiques de la γ -glutamylcystéine synthétase et la glutathion synthétase [127], cependant elle pourrait être liée encore, à une détoxification cellulaire massive, consommatrice de quantités importantes du GSH. En effet, il a été démontré que l'induction du stress oxydatif gastrique par l'ETOH est due à une oxydation du GSH par l'accumulation massive des ROS qui inhibait le système de détoxification [145, 146 et 147].

Les activités de CAT, de la GST et de GGT au niveau des tissus gastriques de rats traités par l'ETOH ont été évaluées et les résultats obtenus sont représentés dans la figure 11. Le traitement par l'ETOH semblait avoir le même effet sur l'activité gastrique de la catalase que le benzo(a)pyrène. En effet, nous avons constaté une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité gastrique de la CAT [une valeur de 339.53 ± 26.82 UI/g de protéines dans le lot traité par l'ETOH contre une valeur de 1471.27 ± 91.82 UI/g de protéines dans le lot non

traité]. Ce résultat concordait parfaitement avec des études précédentes, selon, lesquelles l'induction d'un ulcère expérimental chez le rat par l'ETOH 80% provoquait une baisse de l'activité de la CAT [148 et 142].

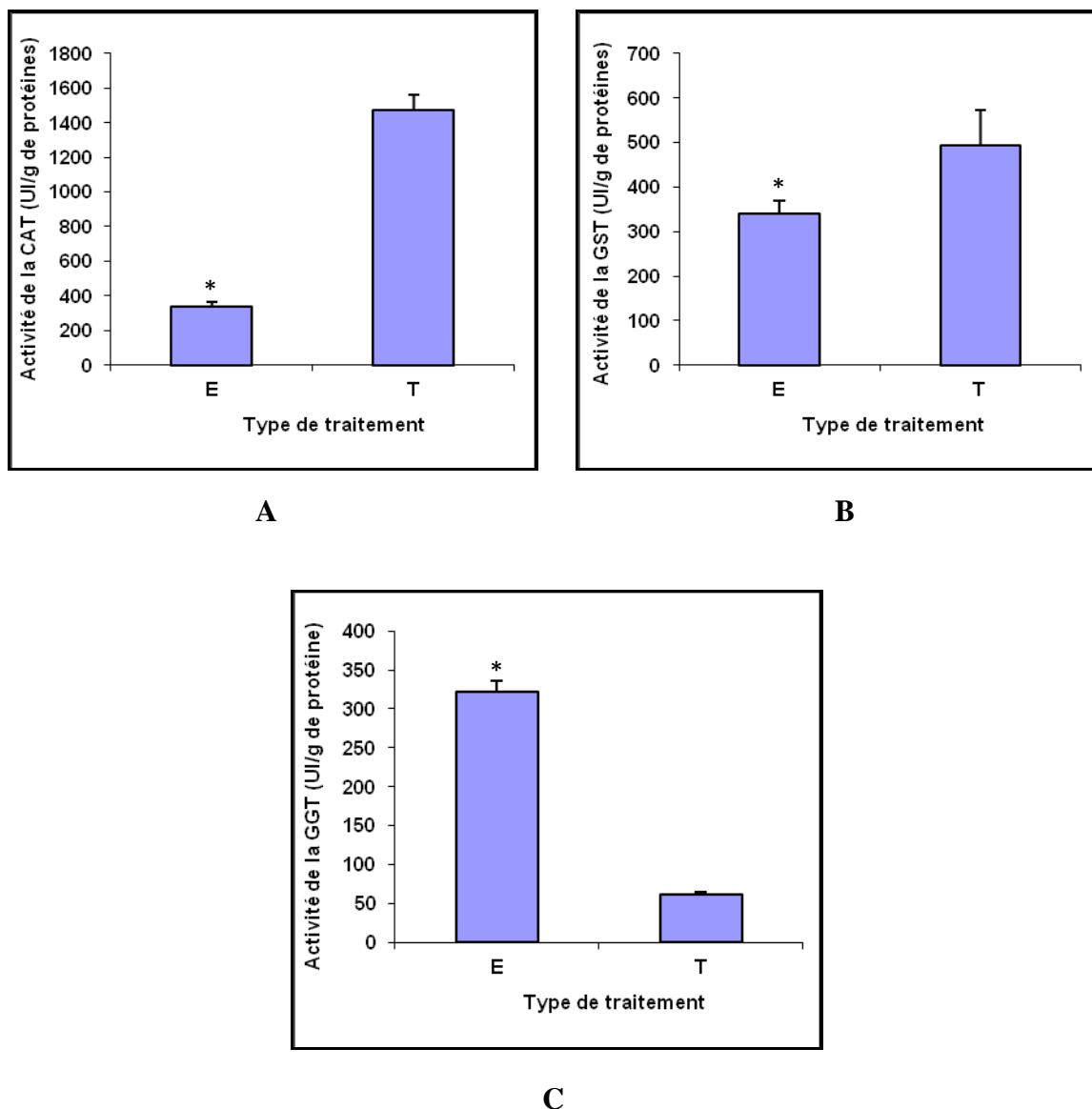


Figure 10. Evaluation des activités cytosoliques de CAT, de la GST et de GGT dans les tissus gastriques provenant de rats traités par l'ETOH. Les activités de ces trois enzymes (A, B et C) ont été quantifiées dans la fraction cytosolique des tissus gastriques d'animaux traités et ou non par l'ETOH, respectivement et ceci, selon, les protocoles préconisés par Clairborne et al, Habig, et Meister et al [114, 115 et 116] ; E : animaux traités par l'ETOH 50 % par voie orale pendant 5 jours ; T : animaux non traités ; (*) : résultat significatif.

De la même manière, nous avons remarqué que l'activité de la GST a diminué significativement ($p < 0.05$) dans le lot des rats traités par l'ETOH [une valeur de $339.53 \pm$

29.69 UI/g de protéines contre une valeur de 492.47 ± 91.82 UI/g de protéines dans le lot des rats non traités] et que cela confirme les conclusions proposées par les travaux récents de *Cadirci* et ses collaborateurs [112].

En revanche, nous avons démontré que l'ETOH induisait une augmentation significative ($p < 0.05$) de l'activité gastrique de la GGT [une valeur 322.25 ± 14.14 UI/g de protéines contre une valeur de 60.92 ± 3.28 UI/g de protéines chez les rats non traités]. Une telle augmentation pourrait être discutée par son rôle dans la maintenance intra cellulaire des taux du GSH, qui protège les cellules contre les dommages dus aux radicaux libres. Des données expérimentales ont démontré l'augmentation tissulaire, sérique et urinaire de la GGT suite à une intoxication par l'éthanol [149].

L'ensemble des résultats concernant l'analyse biochimique des paramètres oxydatifs gastriques nous permet de dire que l'éthanol engendrait un stress oxydatif gastrique en participant à l'augmentation de la peroxydation lipidique et la déplétion du GSH cellulaire et une altération des activités enzymatiques antioxydantes (stimulation de GGT et diminution de CAT et la GST). En effet, les radicaux libres engendrés par l'action de l'éthanol sont susceptibles d'épuiser l'activité des systèmes antioxydants de la cellule, aboutissant à terme à un déséquilibre du système redox cellulaire en faveur des pro-oxydants.

IV.3. Caractérisation des extraits de la propolis et de la plante *P. fragrans*

Nous avons cherché à caractériser les extraits de la propolis et de la plante *P. fragrans* à travers l'analyse de leurs compositions chimiques fines, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS). Nous avons également évalué la teneur en flavonoïdes et en polyphénols totaux ainsi que l'activité antiradicalaire de l'EBM de la plante *P. fragrans*.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'EEP. Comme le montre la figure 12, nous avons pu détecter plusieurs types de composés chimiques, qui apparaissaient dans le chromatogramme selon leur temps de rétention.

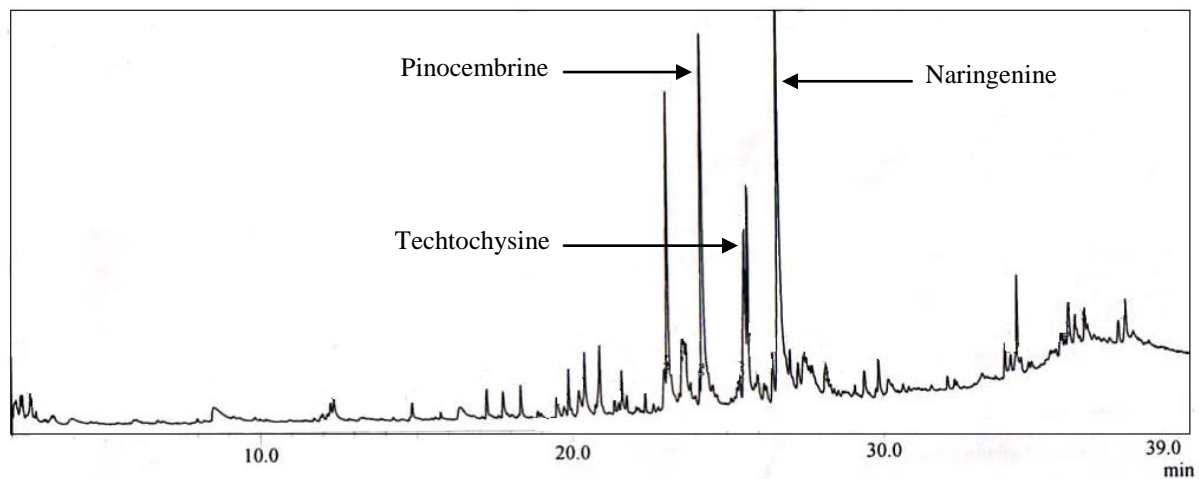


Figure 11. Analyse de la composition chimique de l'EEP par GCMS. $1\mu\text{l}$ de l'EEP a été injecté dans l'appareil et soumis à une température progressive de 100 à 310 °C selon Bankova et al [108], les pics obtenus sont identifiés en se référant à la bibliothèque NIST et les plus importants sont indiqués dans la figure par des flèches.

L'analyse des pics du chromatogramme a permis d'identifier une présence majoritaire de composés appartenant à la famille des flavonoïdes dans laquelle la naringénine, la pinocembrine et le techtochysine représentaient les principaux flavonoïdes, ce résultat concordait avec un travail de *Lahouel* et ses collaborateurs [150], qui ont pu détecter une présence de la pinocembrine comme flavonoïde majoritaire dans l'EEP et le techtochysine, par contre, une absence de la naringénine. La naringénine appartient à une classe de flavonoïdes appelée 'flavanones' qui jouaient un rôle préventif et curatif pour le traitement de pathologies cancéreuses et antiathérogéniques [151, 152 et 153]. D'autre part, la pinocembrine est l'un des flavonoïdes qui représente la plus grande concentration des flavonoïdes dans la propolis [154]. Dès l'année 1980, de nombreuses activités biologiques de la pinocembrine ont été rapportées, incluant ; les effets antimicrobiens, antioxydants et anti-inflammatoires [155, 156, 157 et 158].

En effet, la propolis contient une variété de flavonoïdes, phénols, alcools, terpènes, stérols, vitamines et acides aminés [159]. Les flavonoïdes se caractérisent par la diversité de leurs structures polyphénoliques qui permet leur classification à des groupes majeurs, incluant ; les flavonols, les flavones, les flavonones, les catechines, les anthocyanidines, les isoflavones, les dihydroflavonols et les chalcones [160].

Nous avons aussi analysé l'EBM de la plante *P. fragrans* par GCM. Comme le montre le chromatogramme de la figure 13, la majorité des composés identifiés sont des terpènes. En particulier, nous avons détecté la présence du limonène, un terpène et la solavetivone, un sesquiterpène ainsi que des dérivés terpéniques (produits issus de l'oxydation de la β -carotène). Des composés aromatiques, des huiles essentielles, quelques acides gras tels que l'acide palmitique, l'acide linoléique et l'acide oléique ont été aussi identifiés. Selon des données disponibles, l'espèce *P. fragrans* est très riche en terpènes représentés par les sesquiterpènes lactones et principalement eremophilane et bakkenane. Certains sesquiterpènes avec squelette eremophilane isolés de ce genre montrent des activités antitumorales potentielles [97, 98, 99 et 103]. Ainsi, les composés que nous avons pu identifier semblaient être à l'origine des activités biologiques de cette plante.

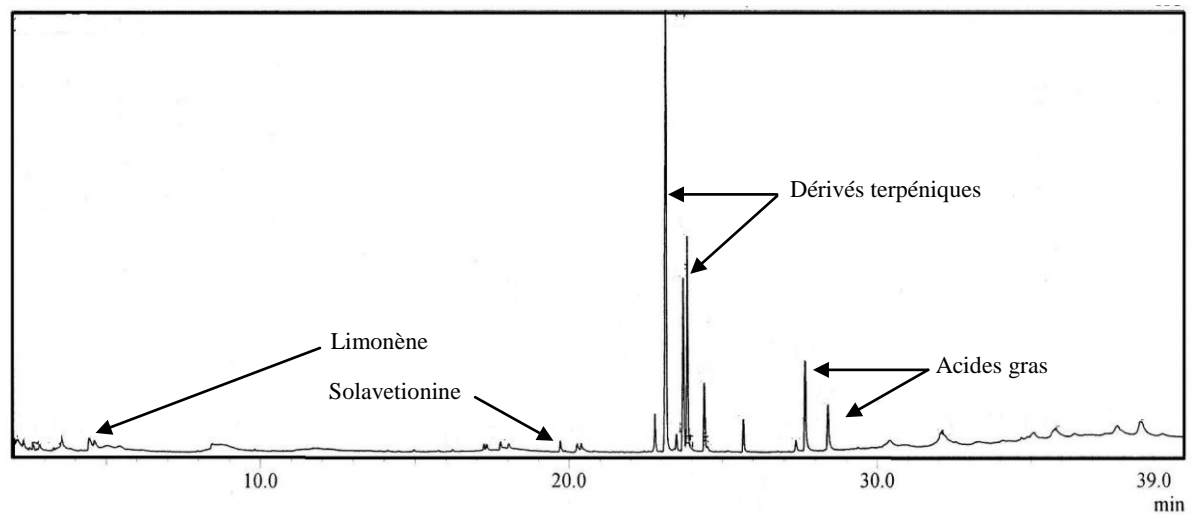


Figure 12. Analyse de la composition chimique de l'EBM de la plante *P. fragrans* GCMS. $1\mu\text{l}$ de l'EBM de la plante a été injecté dans l'appareil et soumis à une température progressive de 100 à 310 °C, selon, le protocole de Bankova et al [108], les pics obtenus sont identifiés en se référant à la bibliothèque NIST et les plus importants sont indiqués dans la figure par des flèches.

Les dosages des flavonoïdes et des polyphénols totaux de l'EBM de la plante *P. fragrans* ont été, respectivement, réalisés par les méthodes de Djeridane et ses collaborateurs et d'Othman et ses collaborateurs [106 et 107]. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en milligrammes équivalent quercétine par gramme de l'extrait brut (mg EQ/g EB), alors que celle des polyphénols était exprimée en milligrammes équivalent acide gallique par gramme de l'extrait brut (mg EAG/g EB).

La teneur en polyphénols totaux de l'EBM de la plante *P. fragrans* a été de 96.75 ± 0.35 mg EQ/g EB, alors que la teneur en flavonoïdes totaux était de 48.75 ± 0.35 mg EAG/g EB (tableau1). Nous avons constaté que la quantité des flavonoïdes de l'extrait méthanolique de la plante représentait près de la moitié de la teneur en polyphénols. Cela nous autorise à penser que les flavonoïdes pourraient jouer un rôle important dans l'activité biologique de la plante *P. fragrans*.

Tableau 1. Teneurs moyennes en polyphénols et flavonoïdes de l'EBM de la plante *P. fragrans*. Les taux de flavonoïdes et de polyphénols totaux de l'extrait brut ont été déterminés respectivement, selon, les protocoles de Djeridane et al et Othman et al [106 et 107]. Les résultats ont été représentés sous forme de moyennes \pm écart-type ; (1) : milligrammes équivalent acide gallique par gramme d'extrait brut ; (2) : milligrammes équivalent quercétine par gramme d'extrait brut.

	Taux des polyphénols ⁽¹⁾	Taux des flavonoïdes ⁽²⁾
EBM de la plante <i>P. fragrans</i>	96.75 ± 0.35	48.75 ± 0.35

Afin d'évaluer l'activité antioxydante, il est important d'employer une méthode stable et rapide. Ainsi, nous avons fait appel à une approche basée sur la mesure de l'activité antiradicalaire de DPPH° (2, 2-dihenyl-1-picrylhydrazyle), un radical libre, stable et capable de capter un proton ou un électron. L'activité 'scavenger' du DPPH° a été déterminée en calculant la diminution de l'absorbance à 517 nm liée à la réduction du radical en présence d'un antioxydant ou d'une espèce radicalaire [161 et 162]. Les activités antiradicalaires de l'EBM de la plante *P. fragrans* et de la vitamine C ont été exprimées en pourcentages (figure 14). Elles varient de 60.4 à 94.1 % pour la vitamine C et de 50.6 à 81.7 % pour l'EBM de *P. fragrans*. Ces résultats révèlent clairement que la plante *P. fragrans* possédait une activité antiradicalaire remarquable si on le comparait avec la vitamine C. Par conséquent, les composants chimiques de cette plante pourraient être impliqués dans la diminution de l'absorbance de la solution éthanolique du DPPH°.

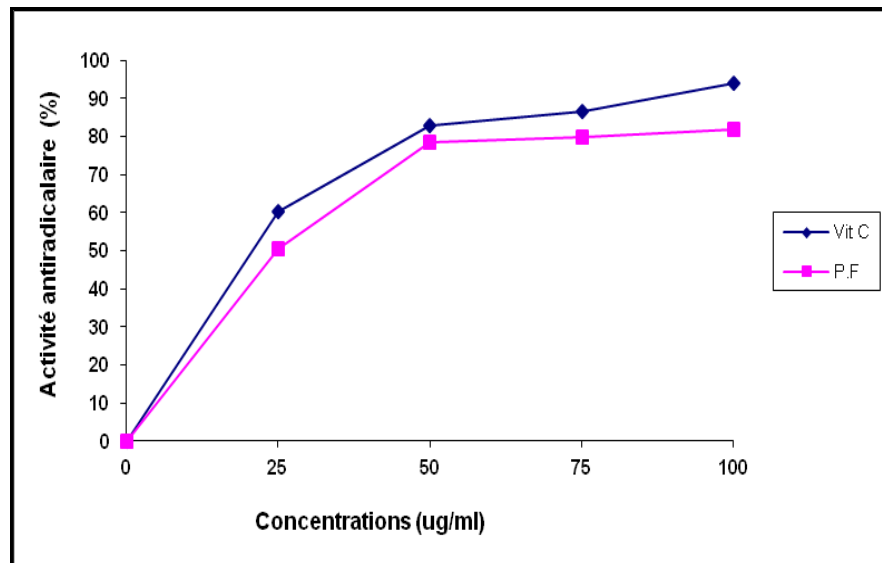


Figure 13. Activité antiradicalaire de l'EBM de la plante *P. fragrans*. Les activités antiradicalaires en fonction des concentrations de l'EBM de la plante (P.F) ou de la vitamine C (Vit C) ont été mesurées selon le protocole de Brand-Williams et al [109], dans lequel le DPPH a été utilisé comme radical libre et la vitamine C comme témoin.

IV.4. Effet gastroprotecteur de l'EEP contre la toxicité du B(a)P

Nous avons évalué l'effet protecteur de l'EEP contre la toxicité gastrique induite par le B(a)P chez le rat. D'une part, nous avons évalué les dommages histologiques occasionnés au niveau des tissus gastriques, et d'autre part, mesuré un certain nombre de paramètres biochimiques du stress oxydatif. Après sacrifice des animaux, les estomacs ont été prélevés et des coupes histologiques ont été préparées, colorées par l'hématoxyline et l'éosine et observées par microscopie optique (Gx100). Comme le montre la figure 15, nous avons constaté une diminution, voir même une disparition, des altérations de la muqueuse gastrique induites par le B(a)P chez les rats traités par l'EEP ; celle-ci semblait présenter des aspects ultra-structuraux quasi-intacts, comparativement avec la situation qui prévalait chez les animaux traités par le B(a)P seul.

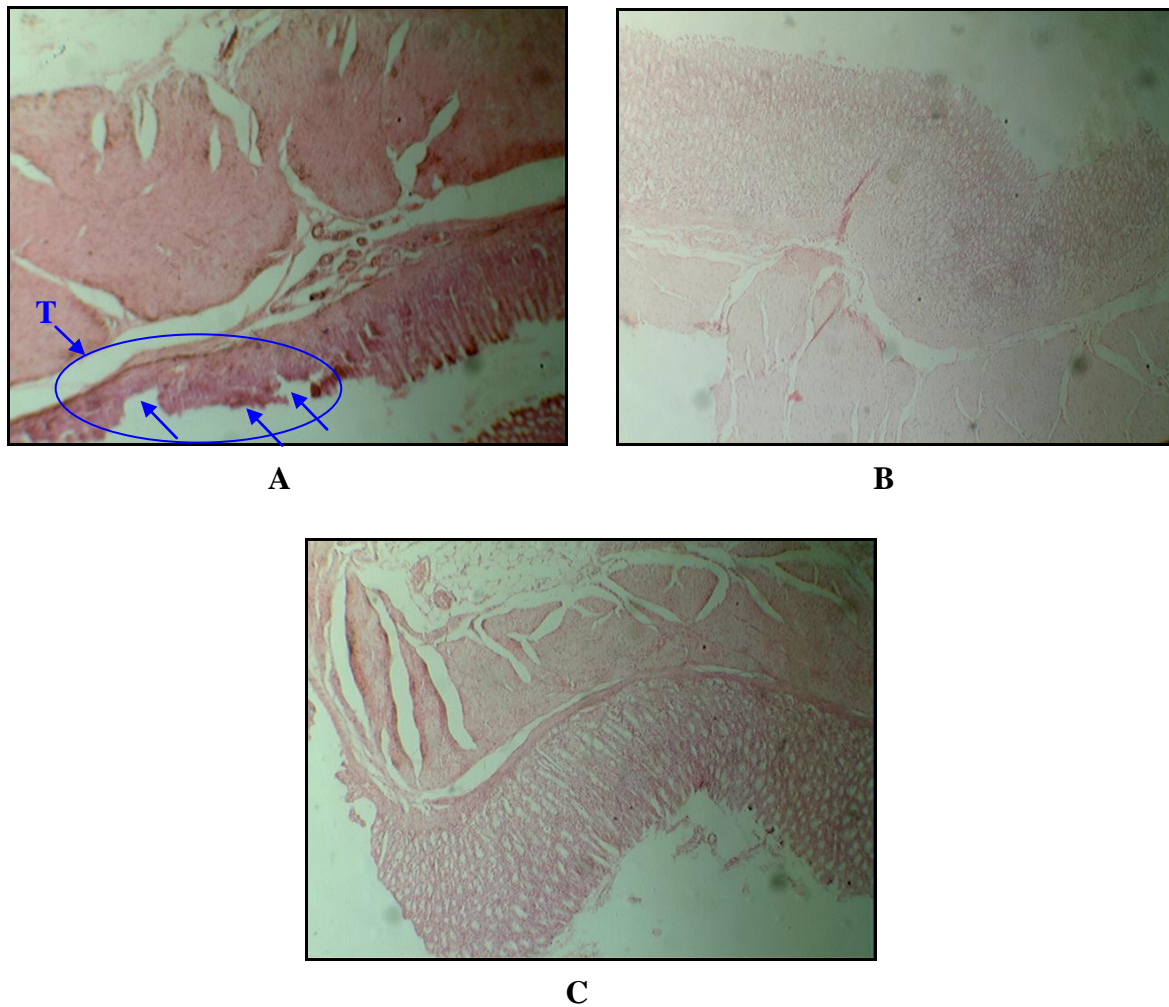


Figure 14. Analyse par microscopie optique des estomacs de rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EEP. Des coupes histologiques ont été préparées à partir des estomacs de rats intoxiqués par le B(a)P et/ou traités par l'EEP et observées par microscope optique (Gx100), après coloration à l'hématoxyline et l'éosine, selon, le protocole de Martoja et Martoja [119]. A : animaux traités par 100 mg/Kg du B(a)P par voie intra-péritonéale montrant une atrophie de la muqueuse désignée par le cercle T; B : animaux traités par l'association du B(a)P et de l'EEP montrant un aspect normal de la muqueuse ; C : animaux traités par l'EEP par voie orale montrant un aspect normal de la muqueuse.

S'agissant de l'étude de l'effet de l'EEP sur l'état du stress oxydatif induit par le B(a)P, nous avons dosé un certain nombre d'indicateurs antioxydants : les activités enzymatiques (CAT, GST et GGT) et les taux du MDA et du GSH.

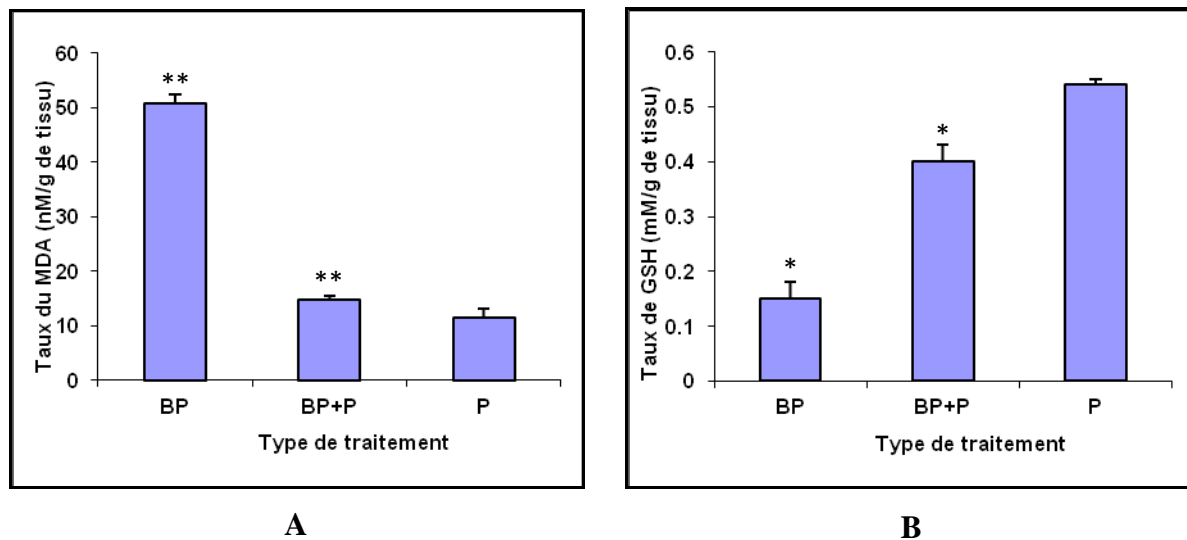


Figure 15. Evaluation des taux cytosoliques du MDA et de GSH dans les tissus gastriques de rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EEP. Les taux du MDA (A) et de GSH (B) ont été évalués à partir des tissus gastriques provenant d'animaux intoxiqués par le B(a)P et/ou traités par l'EEP, respectivement et ceci, selon, le protocole d'Ellman et d'Ohkawa et al [117 et 118]. BP : animaux traités par 100 mg/Kg du B(a)P par voie intra-péritonéale; BP+P : animaux traités par une association du B(a)P et de l'EEP ; P : animaux traités par 100 mg/Kg de l'EEP par voie orale ; (*) : résultat significatif, (**) : résultat très significatif.

D'une part, nous avons observé une baisse très significative ($p < 0.01$) des taux du MDA gastrique chez les rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EEP (14.81 ± 0.62 nM/g de tissu), comparativement avec les rats intoxiqués par le B(a)P (50.72 ± 1.65 nM/g de tissu) (figure 16A). Inversement, une augmentation significative ($p < 0.05$) des taux du GSH gastrique a été constaté chez les rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EEP (0.4 ± 0.03 mM/g de tissu) comparativement avec les rats intoxiqués par le B(a)P (0.15 ± 0.03 nM/g de tissu) (figure 16B). La diminution des taux du MDA et l'augmentation de ceux du GSH représentaient une forme idéale de la protection cellulaire contre les dégâts oxydatifs, ces changements des taux du MDA et du GSH pourraient être liés à la composition chimique de l'EEP qui semblait avoir donc, une activité gastro-protectrice importante.

D'autre part, nous avons remarqué une augmentation des activités de CAT et de la GST chez les rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'extrait de la propolis (793.90 ± 100.52 et 573 ± 25.54 UI/g de protéines), comparativement avec ceux traités par le B(a)P seul (308.33 ± 53.75 et 395.00 ± 71.54 UI/g de protéines), voir la figure 17A et B. Par contraste, nous avons constaté une diminution très significative ($p < 0.01$) des activités de la GGT chez les rats

intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EEP (134.84 ± 9.18 UI/g de protéines), comparativement avec les rats traités par le B(a)P seul (147.5 ± 2.5 UI/g de protéines).

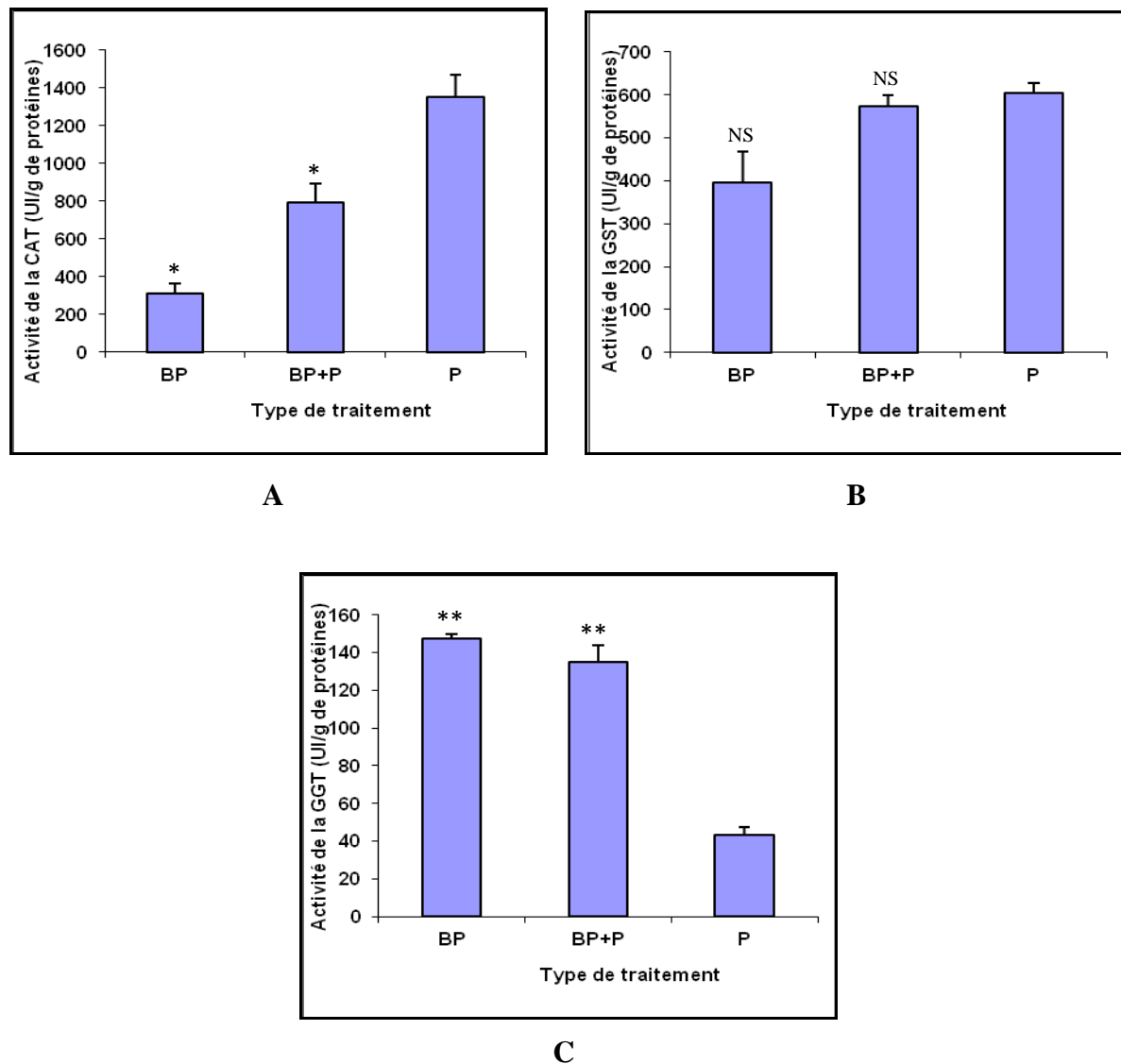


Figure 16. Evaluation des activités cytosoliques de CAT, de la GST et de GGT dans les tissus gastriques de rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EEP. Les activités de ces trois enzymes (A, B et C) ont été quantifiées dans la fraction cytosolique des tissus gastriques d'animaux intoxiqués par le B(a)P et/ou traités par l'EEP, respectivement et ceci, selon, Clairborne et al, Habig, et Meister et al [114, 115 et 116] ; BP : animaux traités par 100 mg/Kg du B(a)P par voie intra-péritonéale ; BP+P : animaux traités par une association du B(a)P et de l'EEP ; P : animaux traités par 100 mg/Kg de l'EEP par voie orale ; (*) : résultat significatif ; (**): résultat très significatif ; (NS) : résultat non significatif.

L'ensemble des résultats obtenus concernant ces paramètres à la fois enzymatiques et non enzymatiques, suggère que l'extrait EEP était capable de maintenir l'équilibre de la balance

antioxydants/pro-oxydants dans les tissus gastriques. Cet équilibre est vraisemblablement assuré par l'action antioxydante des composés phénoliques de l'EEP et, en particulier les flavonoïdes, dirigée contre les ROS générées par le B(a)P. En effet, l'administration de l'EEP aux rats intoxiqués par le B(a)P a permis de préserver les activités des enzymes antioxydantes, les taux du GSH et, à moindre degré les taux du MDA, à leurs niveaux normaux, ceci est soutenu par les travaux d'*El-sayed* et ses collaborateurs [91].

IV.5. Effet gastropréventif de l'EBM de *P. fragrans* contre la toxicité de l'ETOH

Afin d'examiner la présence d'un effet préventif potentiel de l'EBM de la plante *P. fragrans* contre la toxicité induite par l'ETOH, nous avons employé la même approche histobiochimique que nous avons appliqué lors de l'étude de l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité du B(a)P.

S'agissant de l'étude histologique, l'observation par microscopie optique (Gx100) des estomacs des rats prétraités par l'EBM de la plante *P. fragrans* et intoxiqués par l'ETOH a montré une réduction très importante de l'inflammation gastrique, nous avons notamment observé une muqueuse gastrique quasi-normale caractérisée par une inflammation très modérée (Figure 18B). Cette remarque peut être justifiée par l'action des substances antioxydantes présentes dans l'EBM de la plante *P. fragrans* qui protégeraient la muqueuse gastrique contre les méfaits de l'ETOH, en stabilisant l'intégrité de la muqueuse [146].

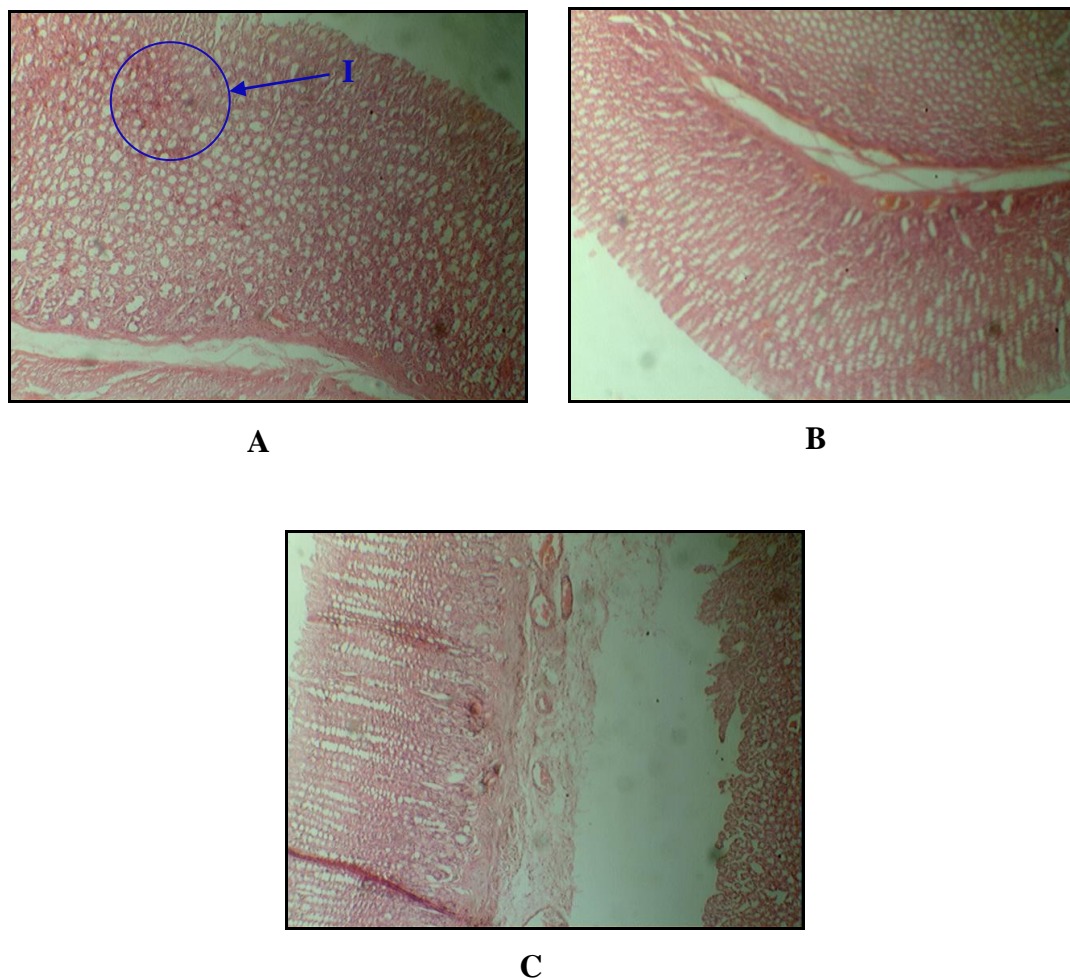


Figure 17. Analyse par microscopie optique des estomacs de rats intoxiqués par l'ETOH et prétraités par l'EBM de la plante *P. fragrans*. Les coupes histologiques ont été préparées à partir des estomacs de rats intoxiqués par l'ETOH et/ou prétraités par l'EBM de la plante et observés par microscopie optique (Gx100), après coloration à l'hématoxyline et l'éosine selon le protocole de Martoja et Martoja [119]. A : animaux traités par 50 % d'ETOH montrant une inflammation avec des zones hémorragiques désignées par le cercle I ; B : animaux traités par l'association de l'ETOH et de l'EBM de la plante *P. fragrans* montrant une inflammation modérée ; C : animaux traités par l'extrait brut de la plante montrant un aspect normal de la muqueuse.

Le rôle de l'EBM de la plante *P. fragrans* dans la régression de la toxicité gastrique induite par l'ETOH chez le rat, a été également confirmé par l'étude d'un certain nombre de paramètres du stress oxydatif (figure 19). En effet, les taux du MDA et du GSH ont été modifiés. Nous avons constaté une diminution hautement significative ($p < 0.001$) des taux du MDA chez le lot des rats doublement traités par l'association de l'EBM de la plante *P. fragrans* et de l'ETOH, comparativement avec le lot de rats traités par l'ETOH seulement (figure 19A). A contrario de la chute de la concentration du MDA, nous avons observé une situation inverse concernant le GSH. L'EBM de la plante *P. fragrans* a induit une

augmentation significative ($p < 0.05$) des taux du GSH chez les rats intoxiqués par l'ETOH (Figure 19B). Cette relation inversement proportionnelle entre la l'augmentation des taux de GSH et la diminution des taux du MDA que nous avons mis en évidence concordait parfaitement avec les résultats des travaux publiés par *Pushpakiran et al*, et *Rouach et al* qui ont expliqué le rôle des antioxydants naturels contre la toxicité de l'ETOH [163 et 131].

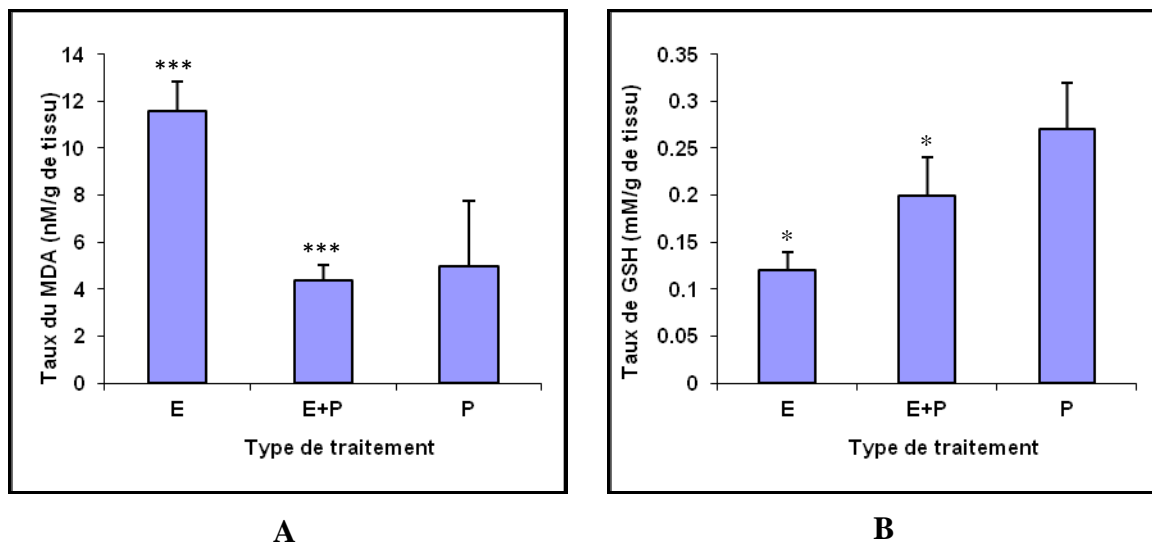


Figure 18. Evaluation des taux cytosoliques du MDA et de GSH dans les tissus gastriques de rats intoxiqués par l'ETOH et prétraités par l'EBM de la plante *P. fragrans*. Les taux du MDA (A) et de GSH (B) ont été évalués à partir des tissus gastriques provenant d'animaux intoxiqués par l'ETOH et/ou prétraités par l'EBM de la plante, respectivement et ceci, selon, le protocole d'Ellman et d'Ohkawa et al [117 et 118]. E : animaux traités par 50 % de l'ETOH par voie orale pendant 5 jours ; E+P : animaux traités par une association de l'ETOH et de l'EBM de la plante *P. fragrans* ; P : animaux traités par 100 mg/Kg de l'EBM de la plante pendant 5 jours ; (*) : résultat significatif, (***) : résultat hautement significatif.

Enfin, l'étude de l'effet de l'EBM de la plante *P. fragrans* sur l'état du stress oxydatif gastrique induit par l'ETOH a été également complétée par le dosage des activités enzymatiques antioxydantes (CAT, GST et GGT). Comme le montre la figure 20, nous avons pu observer une augmentation très significative de l'activité de la CAT, et non significative de la GST, et ceci, chez les rats traités par l'association de l'EBM de la plante *P. fragrans* et de l'ETOH (figure 20A et B). En contre partie, l'activité de la GGT a diminué significativement ($p < 0.05$) dans ces mêmes conditions (figure 20C). Ces différentes constations, nous ont permis de confirmer l'effet préventif important de l'EBM de la plante *P.*

fragrans contre la toxicité gastrique induite par l'ETOH. De telle activité biologique devrait être due, du moins partiellement, à la diminution du stress oxydatif occasionné par l'ETOH, à travers la neutralisation des méfaits engendrés par les ROS. En effet, *Valenzuela* et ses collaborateurs, ont montré que le traitement des troubles gastriques provoqués par l'ETOH chez le rat par les antioxydants naturels pourrait réduire la production du MDA dans cet organe. De plus, la richesse de l'EBM de la plante *P. fragrans* en terpènes semblait être à l'origine de son effet protecteur contre la toxicité gastrique induite par l'éthanol [164 et 103].

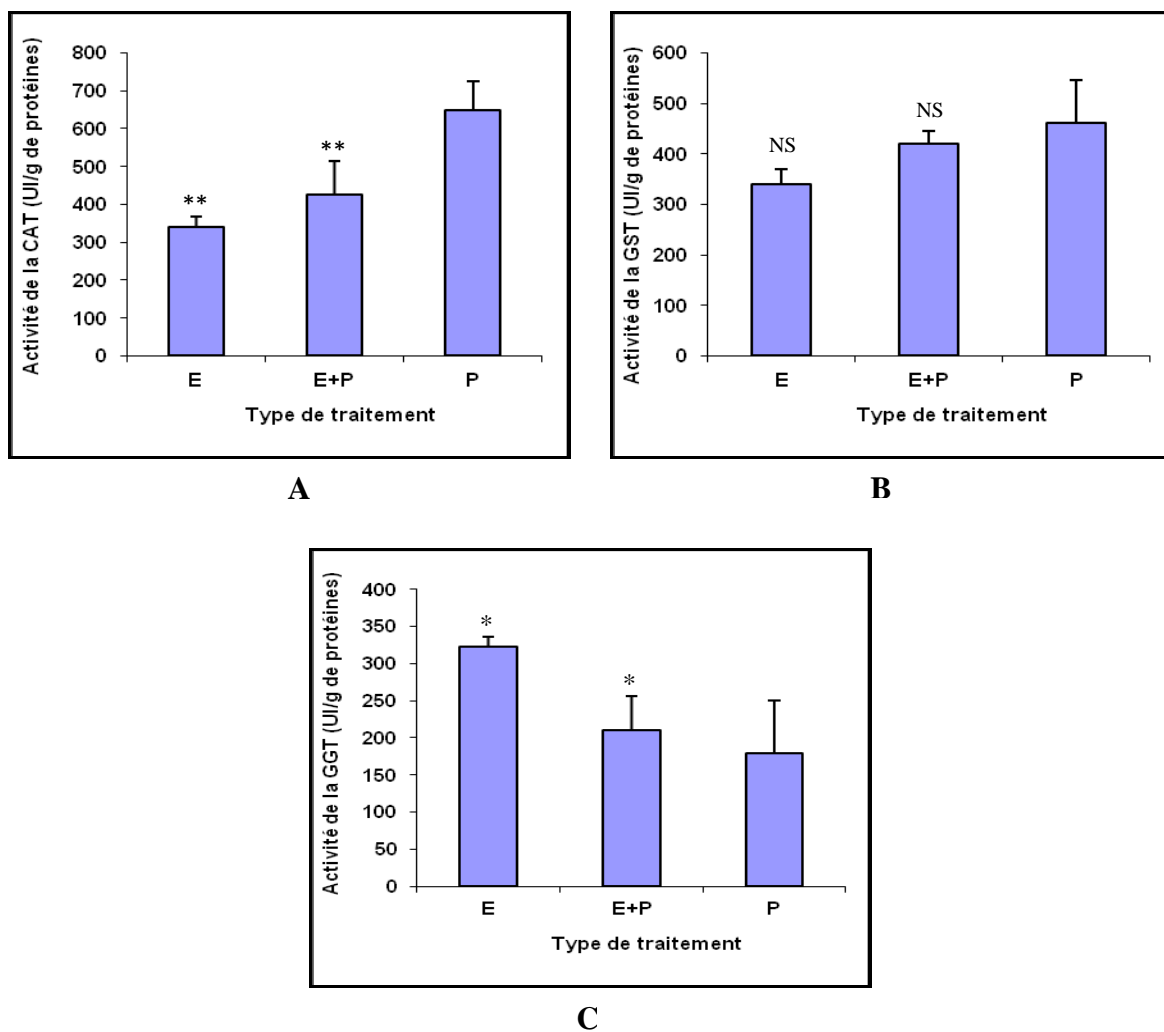


Figure 19. Evaluation des activités cytosoliques de CAT, de la GST et de GGT dans les tissus gastriques des rats intoxiqués par l'ETOH et prétraités par l'EBM de la plante *P. fragrans*. Les activités de ces trois enzymes (A, B et C) ont été quantifiées dans la fraction cytosolique des tissus gastriques d'animaux intoxiqués par l'ETOH et/ou prétraités par l'EBM de la plante, respectivement et ceci, selon, *Clairborne et al*, *Habig*, et *Meister et al* [114, 115 et 116]. E : animaux traités par l'ETOH à raison de 50 % par voie orale pendant 5 jours ; E+P : animaux traités par une association de l'ETOH et de l'EBM de la plante *P. fragrans* ; P : animaux traités par 100 mg/Kg de l'EBM de la plante pendant 5 jours; (*) : résultat significatif ; (**): résultat très significatif ; (NS) : résultat non significatif.

V. Conclusion générale et perspectives

Dans la présente étude, nous avons démontré l'évidence de la présence de deux types de gastro-toxicités, l'une chronique et l'autre subaigüe, induites respectivement par le benzo(a)pyrène et l'éthanol, en utilisant deux modèles animaux chez le rat. De tels modèles animaux ont été construits en administrant 100 mg/Kg du benzo(a)pyrène par voie intrapéritonéale et 50 % de l'éthanol par gavage. La caractérisation des toxicités induites ainsi, a été obtenue par une analyse histologique des organes altérés (estomacs) et une évaluation biochimique de certains paramètres du stress oxydatif.

Il en ressort de l'analyse de la structure tissulaire des estomacs, que le benzo(a)pyrène peut induire une atrophie de la muqueuse gastrique avec des érosions, tandis que l'éthanol peut provoquer l'inflammation de la muqueuse et l'infiltration des éléments inflammatoires avec des signes hémorragiques. De plus, il a été constaté d'après l'étude du stress oxydatif que les deux produits sont capables d'entraîner une diminution significative des activités des enzymes antioxydantes (catalase et glutathion-s-transférase) et des taux du glutathion, et une augmentation de l'activité de la γ -glutamyl transpeptidase et des taux du malonyl dialdéhyde. Nos résultats sont en accord avec les travaux d'*Amresh et al (2007)* et ceux d'*Emre et al (2007)*, qui suggèrent que l'administration du benzo(a)pyrène ou de l'éthanol bloquerait les systèmes antioxydants des cellules gastriques, permettant ainsi une formation des espèces réactives de l'oxygène et un déséquilibre dans la balance antioxydants/pro-oxydants, et que l'augmentation de la concentration des ROS était due à l'épuisement des molécules du système de la défense antioxydante.

L'application d'une phytothérapie aux rats intoxiqués par le benzo(a)pyrène ou l'éthanol, à base de 100 mg/Kg d'extraits bruts de la propolis ou de la plante *Petasites fragrans* a permis de réduire de façon significative leurs toxicités gastriques. En effet, sous les conditions expérimentales présentes, les extraits bruts de la propolis et de la plante peuvent fournir une protection suffisante contre les dommages induits par les pro-oxydants. Ainsi, nous pouvons suggérer que leurs rôles protecteurs sont liés à leurs activités antioxydantes.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail préliminaire ont permis d'ouvrir des perspectives tout à fait intéressantes. Il serait nécessaire d'étudier l'implication des ROS dans la pathogénèse gastrique, notamment inflammatoire et cancéreuse. Pour ce faire, nous allons mesurer la production des ROS dans des cellules en culture, en quantifiant le courant

électrique engendré (signal électrochimique), suite à l'oxydation d'un bio-senseur tel que le cytochrome C par les ROS liées au stress oxydatif. De plus, nous pouvons analyser la présence des altérations de l'ADN dues à l'action des ROS. Par exemple, il sera question de détecter la formation du 8-hydroxy-2'deoxyguanosine, un marqueur du stress oxydatif, en utilisant la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC/MS). Par ailleurs, la cyclo-oxygénase-2, est une enzyme régulatrice de la production des prostaglandines qui jouent un rôle important dans l'inflammation et la stimulation de la prolifération cellulaire. Cette enzyme est normalement exprimée au cours du processus inflammatoire de la muqueuse gastrique et il serait donc très pertinent d'analyser son expression. La quantification des taux de la protéine et de l'ARNm correspondant est réalisable, notamment, par des techniques de Biologie Moléculaire et Cellulaire telles que le Western blot, l'immunohistologie, le Northern blot et l'hybridation in situ.

S'agissant de l'extrait brut méthanolique de la plante *Petasites fragrans*, nous n'avons pas pu examiner son effet protecteur potentiel contre l'intoxication par le benzo(a)pyrène pour des raisons de limites expérimentales, il serait donc nécessaire de reprendre ces expériences. Enfin, nous envisagerons d'isoler et caractériser les constituants de l'extrait brut de cette plante, notamment des sesquiterpènes qui sont connus pour leur effet anticancéreux.

En terme général, nous disons que notre travail supporte l'idée, selon laquelle, le principal mécanisme d'action des xénobiotiques est de perturber plus ou moins l'homéostasie cellulaire, en modifiant l'état du stress oxydatif, c'est une situation où la cellule est incapable de contrôler la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques. De nombreux chercheurs sont de plus en plus impliqués dans des travaux de recherches liés au stress oxydatif cellulaire. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été testées sur les animaux et les humains pour prévenir l'occurrence de pathologies associées à des processus oxydatifs. Par conséquent, de nouvelles voies de recherches peuvent être explorées pour concevoir des molécules plus spécifiquement ciblées à un tissu donné, capables de réguler l'expression des gènes codant pour des protéines antioxydantes au niveau de l'ADN, et non pas seulement détruire les radicaux oxygénés.

VI. Références bibliographiques

1. Aleksumes LM and Manautou JE. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. (2007) *Toxicologic Pathology* (35); 4:459-473.
2. Long DJ, Waikel RL, Wang XJ, Perlaky L, Roop DR and Jaiswl AK. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 Deficiency Increases Susceptibility to Benzo(a)pyrene-induced Mouse Skin Carcinogenesis. (2000) *Cancer Research*; 60:5913–5915.
3. Bae JS, Jang KH, Yim H, Park SC and Jin HK. Inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* on benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice. (2005) *World Journal of Gastroenterology* (4); 11:577-579.
4. Deshpande SS, Ingle AD and Maru GB. Inhibitory effect of curcumin-free aqueous turmeric extract on benzo(a)pyrene-induced forestomach papillomas in mice. (1997) *Cancer Letters*; 11879-85.
5. Jagetia GC, Baliga S and Venkatesh P. Effect of Saphaparna (*Alstonia scholaris* Linn) in modulating the benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice. (2003) *Toxicology letters*; 144:183-193.
6. Padmavathi B, Rath PC, Rao AR and Singh RP. Roots of *Withania Somnifera* inhibit forestomach and skin carcinogenesis in mice. (2005) *Evidence Based Complement and Alternative Medicine*; 2:99-105.
7. Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho OA, Cara DC and Faria AMC. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. (2006) *Clinical and Experimental Immunology*; 146: 312–322.
8. Damodara Reddy V, Padmavathi P, Paramahansa M and Varadacharyulu NC. Amelioration of alcohol-induced oxidative stress by *Embllica officinalis* (Amla) in rats. (2010) *Biochemistry and Biophysics*; 47:20-25.
9. Hernandez Rinçon I, Olguin Martinez M and Hernandez Munoz R. Enhanced Intracellular Calcium Promotes Metabolic and Secretory Disturbances in Rat Gastric Mucosa during Ethanol-Induced Gastritis. (2003) *Experimental Biology and Medicine*; 315-324.
10. Vázquez-Ramírez R, Olguín-Martínez M, Kubli-Garfias C and Hernández-Muñoz R. Reversing gastric mucosal alterations during ethanol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica mucilage*. (2006) *World Journal of Gastroenterology*; 21;12(27):4318-4324
11. Emre MH, Aktay G, Polat A and Vardi N. Effects of Benzo(a)pyrene and Ethanol on Oxidative Stress of Brain, Lung Tissues and Lung Morphology in Rats. (2007) *Chinese Journal of Physiology*; (3); 50: 143-148.
12. Palmer HJ and Paulson KE. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. (1997) *Nutrition Reviews*; 55:353-361.
13. Thanninkal VJ and Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. (2000) *American Journal of Physiology-Lung cellular and Molecular physiology*; 279: 1005-1028.
14. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M. Free radicals, metals, and antioxidants in oxidative stress induced cancer. (2006) *Chemico-Biological Interactions*; 160: 1-40.
15. Vaananen PM, Meddings JB and Wallace JL. Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. (1991) *American Journal of Physiology*; 261: 470-475.

16. Broccard PN. Le cancer de l'estomac. (2007) *Ligue Suisse Contre le Cancer*; 1-31.
17. Hennequin C, Quero L and Mineur L. Gastric cancer: doses and target volumes. (2008) *Cancer Radiotherapy*; 12:659-662.
18. El-Zimaity HMT. Recent advances in the histopathology of gastritis. (2007) *Current Diagnostic Pathology*; 13: 340–348.
19. Alimia Hb, Hfaiedha N, Bouonia Z, Hfaiedha M, Saklyb M, Zourguia L and BenRhoumab K. Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica f.inermis* root extract in rats. (2010) *Phytomedicine*; 50875:1-7.
20. Aziz K and Bonnet D. Hépatogastro-entérologie. (2008) *Elsevier Masson*; 1-476.
21. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. (1992) *Cancer Research*; 52:6735-6740.
22. Molinier A. Pathologie médicale en pratique infirmière. (2007) *Lamarre*; 1-537.
23. Bureau C, Péron JM and Vinel JP. Hépatogastro-entérologie. (2008) *Elsevier Masson*; 1-108.
24. Frexinos J and Buscail L. Hépatogastro-entérologie proctologie: pour le praticien. (2004) *Elsevier Masson*; 1-713.
25. Carbonnel F, Pariente A, Grimadi A et Cosserat J. (1998) *Encyclopedia of Medicine and Chiropractic*; 4-0480
26. De la riva S, Munoz-Navas M et Sola JJ. Gastric carcinogenesis. (2004) *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*; (96); 4:265-276.
27. Smith MG, Hold GL, Tahara E and El-Omar EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. (2006) *World Journal of Gastroenterology*; 12: 2979-2990.
28. Jarvi O and Lauren P. On the role of heterotopias of the intestinal epithelium in the pathogenesis of gastric cancer. (1951) *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*; 29: 26-44.
29. El-Omar EM and Lochhead P. Gastric cancer. (2008) *British Medical Bulletin*; 85: 87-100.
30. Hemminki K and Jiang Y. Familial and second esophageal cancers: a nation-wide epidemiologic study from Sweden. (2002) *International Journal of Cancer*; 98:106-109.
31. Kabat G, Ng S and Wynder E. Tobacco, alcohol intake and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. (1993) *Cancer Causes Control*; 4:1-123.
32. Nomura A, Yamakawa H, Ishidate T, Kamiyama S, Masuda H, Stemmermann GN and *al.* Intestinal metaplasia in Japan: association with diet. (1982) *Journal of Natural Cancer Institute*; 68: 401-405.
33. Gordon L. Tumors of the Stomach. *Gastrointestinal and Liver Disease*. (2002) *Philadelphia*; 733-49.

34. Hsu CT, Ito M, Kawase Y, Sekine I, Ohmagari T and Hashimoto S. Early gastric cancer arising from localized Menetrier's disease. (1991) *Japanese Journal of Gastroenterology*; 26: 213-7.
35. Stolte M. Clinical consequences of the endoscopic diagnosis of gastric polyps. (1995) *Endoscopy*; 27: 32-7.
36. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Change Y, Vogelman JH, Orentreich N and *al.* Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. (1991) *New England Journal of Medicine*; 325: 1127-1131.
37. Michel P. Gastric cancer, treatment in 2008. (2008) *Cancer/Radiothérapie*; 12:649–652
38. Lee ML, Novotny M and Bartle KD. Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates. (1976) *Analytical Chemistry*; (11); 48:1566-72.
39. Moserova M, Kotrbova V, Aimova D, Sulc M, Frei E and Stiborova M. Analysis of benzo(a)pyrene metabolites formed by rat hepatic microsomes using high pressure liquid chromatography, optimization of the method. (2009) *Interdisciplinary Toxicology*; (2); 4: 239-244.
40. Bonnard N, Brondeau MT, Clavel T, Falcy M, Jargot D, Lafontaine M, Reynier M and Oshneider O. Benzo(a)pyrene. (2007) *Institut national de recherche scientifique* ; 1-8.
41. Phillips DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. (1999) *Mutation Research*; 443: 139-147.
42. Ellard S, Mohammed Y, Dogra S, Wolfel C, Doehmer J and Parry JM. Use of genetically engineered V79 Chinese hamster cultures expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assays. (1991) *Mutagenesis*; 6: 461-470.
43. Bakhe YS and Vane JR. Metabolic function of the lung. (1997) *Marcel Dekker, New York, NY*.
44. Delescluse C, Lemaire G, De Sousa G and Rahmani R. Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? (2000) *Toxicology*; (16); 153:73-82.
45. Xue W and Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. (2005) *Toxicology and Applied Pharmacologie*; 206(1):73-93.
46. Baird WM, Hooven LA and Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. (2005) *Environmental and Molecular Mutagenesis*; 45:106-114.
47. Philips DH. Macromolecular adducts as biomarkers of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, the carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons. (2005) *Imperial College Press*; 137-169.
48. Penning TM, Ohnishi ST, Ohnishi T and Harvey RG. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. (1996) *Chemical Research in Toxicology*; (1); 9:84-92.
49. Tomatis L. Transplacental carcinogenesis, in: Modern trends in oncology, Part I. (1973) *Research Progress, Butterworths*; 1-99.

50. Cavalieri EL and Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation. (1992) *Pharmacology and Therapeutics*; (2)55:183-99.
51. Raszinsky K, Basler A and Rohrborn G. Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons.V. Induction of sister chromatid exchanges *in vivo*. (1979) *Mutation Research*; 66: 65.
52. Teranishi K, Hamada K and Watanabe H. Quantitative relationship between carcinogenicity of polyaromatic hydrocarbons in *Salmonella typhimurium* mutants. (1975) *Mutation Research*; 31: 97.
53. Rosemarie A and Faust PhD. Toxicity summary for benzo(a)pyrene, Chemical hazard Evaluation Group. (1994) *Biomedical and environmental information analysis section*; 1-10.
54. Guza R, Kotandeniya D, Murphy K, Dissanayake T, Lin C, Giambasu GM, Lad RR, Wojciechowski F, Amin S, Sturla SJ, Hudson R, York DM, Jankowiak R, Jones R and Tretyakova NY. Influence of C-5 substituted cytosine and related nucleoside analogs on the formation of benzo[a]pyrene diol epoxide-dG adducts at CG base pairs of DNA. (2011) *Nucleic Acids Research*; 39(9): 3988-4006.
55. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S and Loeb LA. 8hydroxy-guanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. (1992) *Journal of Biological Chemistry*; 267:166-172.
56. Baulig A, Garlatti M, Bonvallet V, Marchand A, Barouki R, Marano F and *al*. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. (2003) *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* ; (285) ; 3:671-9.
57. Klaunig JE and Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. (2004) *Annual Review Pharmacology and Toxicology*; 44:239-267.
58. Jones AW and Jonsson KA. Food-induced lowering of blood ethanol profiles and increased rate of elimination immediately after a meal. (1994) *Journal of Forensic Sciences*; 39 :1084-1093
59. Jones AW, Hahn R and Stalberg HP. Distribution of ethanol and water between plasma and whole blood; inter and intra individual variations after administration of ethanol by intravenous infusion. (1990) *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*; 50 : 775-780
60. Jones AW, Hahn R and Stalberg HP. Pharmacokinetics of ethanol in plasma and whole blood; estimation of total body water by the dilution principle. (1992) *European Journal Clinical Pharmacology*; 42 : 445-448.
61. Lands WEM. A review of alcohol clearance in humans. (1998) *Alcohol*; 15: 147-160.
62. Silvain C and Chagneau-Derrode C. Métabolisme d'éthanol. (2006) *Elsevier Masson* ; 1155-1976(06)31589-6.
63. Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968- 1998)-a review. (1999) *Alcohol Clinical and Experimental Research*; 23: 991-1007.
64. Cunningham CC and Bailey SM. Ethanol consumption and liver mitochondria function. (2001) *Biological Signals and Receptors*; (3-4); 10:271-282.

65. Rintala J, Jaatinen P, Parkilla S, Sarvihararju M, Kilanmaa K and *al.* Evidence of acetaldehyde adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. (2000) *Alcohol*; 35 : 458-463
66. Nordmann R. Alcohol and antioxidant systems. (1994) *Alcohol*; 29: 513-522.
67. Hoek JB and Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress and cytokine induced liver cell injury. (2002) *Alcohol*; (1); 27:63-68.
68. Das SK and Vasudevan DM. Alcohol induced oxidative stress. (2007) *Life Sciences*; 81: 177-187.
69. Twedt DC. Antioxidants and liver disease 19th ACVIM. (2001) *Denver CO*; 1-12
70. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P and Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases; role in joint disease. (2007) *Joint Bone Spine*; 74:636-643.
71. Favier A. Le stress oxydant. (2003) *L'actualité chimique*; 108-115.
72. Shah K, Kumar RG, Verma S and Dubey RS. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. (2001) *Plant Sciences*; 161: 1135-1144.
73. Halliwell B and Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. (1989) *Oxford, Clarendon Press*; 188-275.
74. Beckman J and Koppenol W. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. (1996) *American Journal of Physiology*; 271:1424-37.
75. Podrez EA, Abu-soud HM and Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. (2000) *Free radical Biology and Medicine*; 28:1717-1725.
76. Morena M, Martin-Mateo M, Cristol JP and Canaud B. Stress oxydant, h mo-imcompatibilit  et complications de la dialyse au long cours. (2002) *Nephrologie*; (23) 5: 201-208.
77. Formigari A, Irato P and Sauton A. Zinc antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. (2007) *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C; 146:443-459.
78. Krinsky NI. Antioxidants function of carotenoids. (1989) *Free Radical Biology and Medicine*; (6); 7:617-635.
79. Trueba GP, Sanchez GM and Giuliani A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. (2004) *Frontiers in Bioscience*; 9: 2029-2044.
80. Bokov A, Chaudhuri A and Richardson A. The role of oxidative damage and stress in aging. (2004) *Mechanisms of Aging and Development*; 125:811-826.
81. Esterbauer H, Gebicki J, Pulchl H and Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. (1992) *Free Radical Biology and Medicine*; (4) ; 13: 341-390.
82. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. (1992) *Journal of Neurochemistry*; (5); 59:1609-1623.

83. Stadtman ER and Levine RL. Protein oxidation. (2000) *Annals of New York Academy of science*; (1) 899: 191-208.
84. Beckman KB and Ames BN. oxidative decay of DNA. (1997) *Journal of Biological Chemistry*; (32); 272:19633-19636.
85. Cadet J, Bellon S, Berger M, Boudat AG, Douki T, Duarte V and *al.* Recent aspects of oxidative DNA damage; guanodine lesions, measurements and substrate specificity of DNA repair glycosylases. (2002) *Journal of Biological Chemistry*; (6); 383:1-93.
86. Leonard SS, Harris GK and Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. (2004) *Free Radical Biology and Medicine*; (12); 37:1921-1942.
87. Amresh G, Kant R, Rao ChV and Singh PN. Chemomodulatory Influence of *Cissampelos pareira* (L.) Hirsuta on Gastric Cancer and Antioxidant System in Experimental Animal. (2007) *Acta Pharmaceutica Scientia*; 49: 71-83.
88. Repetto MG and Llesy SF. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. (2002) *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 35 (5): 523-534.
89. Paulino N, Abreu SRL, Machado G and Silveira E. Scientific evidences to pharmacological anticancer action of *Baccharis dracunculifolia* Brazilian propolis. (2009) *Reviews Pesq Inov Farm*; (1); 1:15-26.
90. Ahn MR, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F and Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. (2007) *Food Chemistry* (101); 4:1383-1392.
91. El-sayed EM, Abo-salam OM, Ali HA and Mansour AM. Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. (2009) *Pakistan Journal of Pharmacological Sciences*; (22); 2:168-174
92. Scheller S, Krol W, Swiacik J, Owczarek S, Gabrys J and Shani J. Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin. (1989) *Z.Naturforsch*; (11-12) 44: 1063-1065.
93. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ, Kurimoto M and Mito K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. (1998) *Cancer Detection and Prevention*; (6); 22:506-15.
94. Shimizu K, Das SK, Hashimoto T, Sowa Y, Yoshida T, Sakai T, Matsuura Y and Kanazawa K. Artepillin C in Brazilian propolis induces G(0)/G(1) arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. (2005) *Molecular Carcinogenesis*; (4) 44: 293-299.
95. Schauenbeg P and Paris F. Guide des plantes médicinales, analyse, description et utilisation de 400 Plantes. (1977) *ISBN: 2-603-00001-2*, 1-330.
96. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. (1999) *Clinical microbiology reviews*; 564-582.
97. Yaoita Y, and Kikuchi M. Triterpenoids from buds of *Tussilago farfara* L. (1998) *Nature Medicine*; 52:273-275.

98. Wu LS, Kao MS, Wu PL, Lin FW, Shi LS, Liou MJ and Li CY. The bakkenolides from the root of *Petasites formosanus* and their cytotoxicity. (1999) *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; 47:375–382.
99. Lin YL, Mei CH, Huang SL and Kuo YH. Four new sesquiterpenes from *Petasites formosanus*. (1998) *Journal of Natural Products*; 61:887-890.
100. Carr GW, Yugovic JV and Robinson KE. Environmental weed invasions in Victoria-conservation and management implications. (1992) *Department of conservation and environnement and ecological horticulture, Victoria*.
101. Csurhes S and Edwards R. Potential environmental weeds in Australia. (1998) *Queensland Department of Natural Resources*; 1-202.
102. Brune K, Bickel D and Peskar BA. Gastro-protective effects by extracts of *Petasites hybridus*: the role of inhibition of peptido-leukotriene synthesis. (1993) *Planta Medica*; 59 :494- 496.
103. Sugama K, Hayashi K, Nakagawa T, Mitsunashi H and Yoshida N. Sesquiterpenoids from *Petasites fragrans*. (2001) *Phytochemistry* ; 22 (7) :1619-1622.
104. Agosti R, Duke RK, Chrubasik JE and Chrubasik S. Effectiveness of *Petasites hybridus* preparation in the prophylaxis of migraine: Asystematic review. (2006) *Phytotherapy*; 13: 743-746.
105. Brunton J. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. (1993) *Lavoisier TEC et DOC*, 2: 268-277.
106. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P and Vidal N. Antioxydant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. (2006) *Food Chemistry*; 97: 654-660.
107. Othman A, Ismail A, Abdul Ghani N and Adenan I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. (2007) *Food Chemistry*; 100:1523-1530.
108. Bankova V, Popova M, Bogdanov S and Sabatini AG. Chemical composition of European propolis. (2002) *Z Naturforsch*; 57: 530-533.
109. Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. (1995) *Lebensm Wiss Technology*; 28: 25-30.
110. Gunning WT, Kramer PR, Lubet RA, Steele VE, End DW, Wouters W and Pereira MA. Chemoprevention of benzo(a)pyrene-induced lung tumors in mice by the farnesyltransferase inhibitor R115777. (2003) *Clinical Cancer Research*; 9:1927-1930.
111. Hernandez-Munoz R and Montiel-Ruiz. Reversion by histamine H2-receptor antagonists of plasma membrane alterations in ethanol-induced gastritis. (1996) *Digestive Diseases and Sciences*; 41: 2156-2165.
112. Cadirci E, Suleyma H, Aksoy H, Halici Z, Ozgen U, Koc A and Ozturk N. Effects of *Onosma armeniacum* root extract on ethanol-induced oxidative stress in stomach tissue of rats. (2007) *Chemio-Biological Interaction*; (170); 40-48.

113. Lowry OH, Rosenbraugh NJ, Farr AL and Rondall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. (1951) *Journal of Biological Chemistry*; 193: 265-275.
114. Clairborne A. Catalase activity. In: CRC handbook of methods for oxygen radical research. (1985) *Boca Raton: Greenwald RA; CRC press*; 283-284.
115. Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. (1974) *Journal of Biological Chemistry*; 49:7130-9.
116. Meister A, Tate SS and Griffith OW. γ -glutamyl trans. (1981) *Methods in Enzymology*; 77: 273-253.
117. Ellman GL. Plasma antioxydants. (1959) *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 82: 70-77.
118. Ohkawa H, Ohisi N and Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. (1979) *Analytical Biochemistry*; 95:351-8.
119. Martoja R and Martoja MP. Initiation aux techniques de l'histologie animale. (1967) *Masson & Cie* :345.
120. Gangar SC, Sandhir R and Koul A. Anti-clastogenic activity of *AZADIRACHTA INDICA* against benzo(a)pyrene in murine forestomach tumorigenesis bioassay. (2010) *Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research*; (67); 4:381-390.
121. Wattenberg LW, Coccia JB and Lam LKT. Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. (1980) *Cancer research*; 40, 2820-2823.
122. Kasi PV, Perumal VK, Shanmugiahthervar KP, Govin darajn A and Solayan A. Olive oil protects rat liver microsomes against benzo(a)pyrene-induced oxidative damages: an in vitro study. (2008) *Molecular Nutrition and Food Research*; 52:95-120.
123. Dai YC, Tang ZP and Zhang YL. How assess the severity of atrophic gastritis. (2011) *World Journal of Gastroenterol*; 17 (13): 1690-1693.
124. Ligha AE and Fawehinmi HB. Protection by liquorice in alcohol induced gastric mucosa damage. (2009) *Pakistan Journal of Nutrition*; (10); 8:1532-1536.
125. Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. (1983) *Science*; 220:472-7.
126. Kojima-Yuasa A, Umeda K, Ohkita T, Opare Kennedy D, Nishiguchi S and Matsui-Yuasa I. Role of reactive oxygen species in zinc deficiency-induced hepatic stellate cell activation. (2005) *Free Radical Biology and Medicine*; 39: 631-640.
127. Mendoza-Cozatl D, Loza-Tavera H, Hernandez-Navarro A and Moreno-Sanchez R. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. (2005) *FEMS Microbiological Reviews*; 29: 653-671.
128. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR and Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. (2004) *Journal of Nutrition*; 134:489-92.
129. Loguercio C, Blanco FD, De Girolamo V, Disalvo D, Nardi G, Parente A and *al.* Ethanol consumption, amino acid and glutathione blood levels in patients with and without chronic liver disease. (1999) *Alcohol Clinical Experimentation and Research*; 23:1780-4.

130. Szabo S. Mechanisms of gastric mucosal injury and protection. (1991) *Journal of Clinical Gastroenterology*; 13:S21–34.
131. Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M and Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. (1997) *Hepatology*; 25: 351-355.
132. Hayes JD and McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a coordinately regulated defence against oxidative stress. (1999) *Free Radical Research*; 31:273–300.
133. Matés JM, Perez-Gomez C and Nunez De Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. (1999) *Clinical Biochemistry*; (8); 32:595-603.
134. Tesfai Y, Davis D and Reinhold D. Chromium can reduce the mutagenic effects of benzo(a)pyrene diolepoxide in normal human fibroblasts *via* an oxidative stress mechanism. (1998) *Mutation Research*; 416: 159- 168.
135. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? (1994) *Lancet*; 344:721-724.
136. Bodansky O and Latner AL. Advances in clinical chemistry. (1975) *Academic Press Inc*; (17).
137. Lesuisse E, Bulteau AL, Rustin P and Hibert M. Ataxie de friedreich: effets du stress oxydant et recherche de nouveaux agents thérapeutiques. (2006) *Agence Nationale de la Recherche* :144.
138. Barouhi R. Stress oxydant et vieillissement. (2006) *Medecine/Sciences*; 22:266-272.
139. Tsuboya T, Kuriyama S, Nagai M, Hozawa A and Sugawara Y. Gamma-Glutamyltransferase and cancer incidence: the ohsaki cohort study. (2012) *Journal of Epidemiology*; 22(2): 144-150.
140. Yao DF, Dong ZZ, Yao DB, Wu XH, Wu H, Qiu LW, Wang HM and Meng XY. Abnormal expression of hepatoma-derived GGT subtyping and its early alteration for carcinogenesis of hepatocytes. (2004) *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*; 3(4): 564-570.
141. Szabo S, Trier J, Brown A and Schnoor J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. (1985) *Gastro-enterology*; 88, 228-236.
142. Li CY, Xu HD, Zhao BT, Changa HI and Rheec HI. Gastroprotective effect of cyanidin 3-glucoside on ethanol-induced gastric lesions in rats. (2008) *Alcohol*; 42:683-687.
143. Nordmann R, Ribiere C and Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. (1990) *Oxford Journals Medicine Alcohol and Alcoholism*; 25:3231-237.
144. Loguercio C, Taranto D, Beneduce F, del Vecchio Blanco C, de Vincentiis A, Nardi G, and Romano M. Glutathione prevents ethanol induced gastric mucosal damage and depletion of sulfhydryl compounds in humans. (1993) *Gut*; 34:161–165.
145. Millet TA, Kuo YJ, Schmidt KL and Shanbour LL. Nonprotein sulfhydryl compounds in canine gastric mucosa: effect of PGE2 and ethanol. (1985) *American Journal of Physiology*; 249:137-44.

146. La Casa C, Villegas I, Alarcon de la Lastra C, Motilva V and Martin Calero MJ. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol- induced gastric lesions. (2000) *Journal of Ethnopharmacology*; 71:45–53.
147. AlMoutaerya M, AlRayesb H, AlSwailamb R, Elfaki I, AhmadKhand H, Arshaduddinc M. and Tariq M. Protective effect of a cysteine prodrug and antioxidant, L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate, against ethanol-induced gastric lesions in rats. (2010) *Experimental and Toxicologic Pathology*; 50533:1-5.
148. Bafna PA and Balaraman R. Anti-ulcer and antioxidant activity of DHC-1, a herbal formulation. (2004) *Journal of Ethnopharmacology*; 90:123-127.
149. Zhang H, Dickinson DA, Liu RM and Forman HJ. 4-Hydroxynonenal increases γ -glutamyl transpeptidase gene expression through mitogen-activated proteine kinase pathway. (2005) *Free Radical Biology and Medicine*; 15;38(4): 463-471.
150. Lahouel M, Boutabet K, Kebsa W and Alyane M. Fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced renal oxidative stress. (2010) *African Journal of Pharmacology*; 4(10): 712-720.
151. Montanari A, Chen J and Widmer W. Citrus flavonoids: A review of past biological activity against disease. (1998) *Flavonoids in the Living System*. New York: Plenum Press; 103–113.
152. Guthrie N and Carroll KK. Inhibition of mammary cancer by citrus flavonoids. (1998) *Flavonoids in the Living System*. New York: Plenum Press; 227–236.
153. Samman S, Wall PML and Cook NC. Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. (1999) *Flavonoids in the Living System*. New York: Plenum Press; 469–481.
154. Liu R, Gao M, Yang ZH and Du GH. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia–reperfusion both in vivo and in vitro. (2008) *Brain Research (1216)*; 104-115.
155. Pepeljnjak S, Jalsenjajk I and Maysinger D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. (1985) *Pharmazie*; 40:122–123.
156. Del Rayo Camacho M, Sanchez B, Quiroz H, Contreras JL and Mata R. Pinocembrine: a bioactive flavanone from *Teloxys graveolens*. (1991) *Journal of Ethnopharmacol*; 31:383–389.
157. Santos AC, Uyemura SA, Lopes JL, Bazon JN, Mingatto FE and Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. (1998) *Free Radical Biology and Medicine*; 24, 1455–1461
158. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Manez S, Giner RM, Cerda-Nicolas M and Rosi JL. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. (2003) *European Journal of Pharmacology*; 461, 53–61.
159. Silici S and Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. (2005) *Journal of Ethnopharmacology*; 99: 69-73
160. Wilcox LJ, Borradaile NM and Huff MW. Antiatherogenic properties of naringenin, a citrus flavonoid. (1999) *Cardiovascular Drug Reviews*; Vol. 17, No. 2, pp. 160–178

-
- 161.** Gordon MH. Measuring antioxidant activity-antioxidants and food stability-. In “*antioxidants in food*”. (2001) **Woodhead Publishing** Ltd; 71-84.
- 162.** Vallano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso A and García-Parrilla MC. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. (2007) **Talanta**; 71, pp: 230-235.
- 163.** Pushpakiran G, Mahalakshmi K and Anuradha CV. Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues. (2004) **Amino Acids**; 27: 91-96.
- 164.** Valenzuela A, Lagos C, Schmidt K and Videla LA. Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in rat. (1985) **Biochemical Pharmacology**; 340, 2209-2212.

Résumé

La muqueuse de l'estomac est exposée en continu à divers produits chimiques exogènes toxiques, tels que l'éthanol et le benzo(a)pyrène qui sont respectivement fournis par l'alimentation ou l'environnement. Après leur ingestion ou inhalation, ils sont absorbés par la muqueuse et deviennent par la suite responsables de l'altération de son intégrité. A présent, l'étude des gastropathies retient l'attention de nombreux chercheurs qui ont mis en évidence l'altération de la muqueuse gastrique induite expérimentalement par ces deux produits chez le rat. Cependant, peu de recherches ont été consacrées à l'étude de l'état du stress oxydatif gastrique au cours de ces toxicités. Dans ce contexte, notre travail a consisté à la caractérisation histologique et biochimique de deux toxicités gastriques induites expérimentalement, par le benzo(a)pyrène ou l'éthanol chez le rat. L'étude histologique a reposé sur la caractérisation des lésions par microscopie optique, tandis que l'analyse biochimique a consisté à l'évaluation des activités de la catalase (CAT), la glutathion-s-transférase (GST), et la γ -glutamyl transpeptidase (GGT), et des taux du malonyl dialdéhyde (MDA) et du glutathion (GSH). En parallèle, la recherche d'éventuels effets protecteurs des extraits bruts de la propolis et de la plante *Petasites fragrans* a été réalisée. Il en ressort de l'analyse des tissus gastriques des rats traités, que le benzo(a)pyrène est capable d'induire une atrophie de la muqueuse caractérisée par la présence d'érosions, alors que l'éthanol provoquait une inflammation et une infiltration des éléments inflammatoires avec des signes hémorragiques. De plus, nous avons constaté un changement dans l'état oxydatif cellulaire caractérisé par une diminution significative du taux de GSH et des activités de la CAT et la GST, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la GGT et du taux du MDA. En fin, nous avons démontré la présence d'effets gastroprotecteurs certains des extraits bruts de la propolis et de la plante *Petasites fragrans* contre les intoxications induites par le benzo(a)pyrène et l'éthanol respectivement.

Mots clé : Estomac, benzo(a)pyrène, éthanol, caractérisation histologique, caractérisation biochimique, propolis, *Petasites fragrans*.

Abstract

Gastric mucosa is continuously exposed to diverse toxic exogenous chemicals, such as ethanol and benzo(a)pyrene which are respectively supplied by food or environment. After their ingestion or inhalation, they are absorbed by the mucous membrane and become afterward responsible for the change of its integrity. At the moment, the study of gastropathies holds attention of numerous researchers who brought to light the change of the gastric mucous membrane led experimentally by these two products to the rat. However, few researches were dedicated to the study of the state of gastric oxidative stress during these toxicities. In this context, our work consisted in the histological and biochemical characterization of two gastric toxicities led experimentally, by the benzo(a)pyrene or the ethanol to the rat. The histological study is rested on the characterization of the hurts by optical microscopy, whereas the biochemical analysis consisted in the evaluation of the activities of the catalase (CAT), the glutathion-s-transférase (GST), and γ -glutamyl transpeptidase (GGT), and levels of the malonyl dialdehyde (MDA) and the glutathion (GSH). In parallel, the research for possible protective effects of the raw extracts of the propolis and the plant *Petasites fragrans* was realized. It emerges from the analysis of gastric tissues of the treated rats, that the benzo(a)pyrene is capable of leading an atrophy of the mucous membrane characterized by the presence of erosions, while the ethanol provoked an inflammation and an infiltration of the inflammatory elements with hemorrhagic signs. Furthermore, we noticed a change in the cellular oxidative state characterized by a significant decrease of the level of GSH and the activities of CAT and GST, as well as an increase of the activity of GGT and the level of the MDA. At the end, we demonstrated the presence of gastroprotector effects of raw extracts of propolis and *Petasites fragrans* against the toxicities led by benzo(a)pyrene and ethanol respectively.

Key Words: Stomach, benzo(a)pyrene, ethanol, histological characterization, biochemical characterization, propolis, *Petasites fragrans*.

ملخص

تعرض مخاطية المعدة باستمرار لتأثير عدة مواد كيميائية سامة مثل الايثانول والبنزوبيران (1) ، والتي تمول عادة من التغذية أو من المحيط. بعد تناولها أو استنشاقها يتم امتصاصهما من طرف المخاطية و بالتالي يصبحان مسؤولين عن المساس بسلامتها. في الوقت الحالي ، تشير الدراسات حول أمراض المعدة انتباه عدد من الباحثين اللذين كشفوا عن الفساد التجريبي لمخاطية المعدة المتسبب من طرف هاتين المادتين عند الجرذان. و لكن قليل من البحوث تم اعتمادها من اجل دراسة الفلق التاكسدي في المعدة خلال هذه التسممات. و في هذا السياق يتمثل بحثنا في الوصف النسيجي و البيوكيميائي خلال التسمم المسبب تجريبيا عند الجرذان بواسطة الايثانول و البنزوبيران (1). تعتمد الدراسة النسيجية على وصف الأضرار بواسطة المجهر الضوئي، بينما تعتمد الدراسة البيوكيميائية على تقييم النشاط الإنزيمي لكل من الكاتالاز، الغلوتاثيون-س-ثرونسفيراز و الغاماغلوتاميل ثرونسبيبتيداز و معدل كل من المالونيل ديالدهيد و الغلوتاثيون. بموازاة ذلك تم البحث عن آثار الحماية المحتملة للمستخلص الخام لكل من البروبوليس و النبتة بيتاسيتاس فراغرونس. يتبين من تحليل أنسجة معدة الجرذان المعالجة أن البنزوبيران (1) بمقدوره أن يسبب ضمورا في المخاطية اما الايثانول فيسبب التهابا و انسلا للأنسجة الالتهابية مع النزيف. كما لاحظنا تغيرات في الفلق التاكسدي تمثلت في انخفاض في نسبة الغلوتاثيون و في نشاط كل من الكاتالاز و الغلوتاثيون-س-ثرونسفيراز و ارتفاع في نشاط الغاما غلوتاميل ثرونسبيبتيداز و نسبة المالونيل ديالدهيد. وأخيرا أظهرت النتائج أيضا وجود آثار الحماية للمستخلص الخام لكل من البروبوليس و بيتاسيتاس فراغرونس خلال التسممات المتسببة من طرف البنزوبيران (1) و الايثانول بالترتيب.

الكلمات المفتاحية: المعدة، البنزوبيران (1)، الايثانول، وصف نسيجي، وصف بيوكيميائي، بروبوليس، بيتاسيتاس فراغرونس.