

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

En vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Toxicologie Moléculaire

Par
KRIBECHE Aicha

THEME

Contribution à la caractérisation histo-biochimique du stress oxydatif hépatopulmonaire induit par le benzo(a)pyrène ou le chlorpyrifos chez le rat. Recherche de l'effet protecteur des extraits bruts de la propolis et des graines de la plante *Lepidium sativum*.

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 SIFOUR Mohamed	MCA, Université de Jijel	Examineur

Année universitaire 2011-2012

Remerciements

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance au Dr RECHRECHE Hocine, Maître de Conférences à la Faculté de Sciences, Université de Jijel pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'il m'accordé m'ont permet de réaliser ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr IDOUI Tayeb, Maître de Conférences à l'Université de Jijel d'avoir accepté de présider le jury.

J'exprime mes vifs remerciements au Dr LAHOUEL Mesbah, Professeur à l'Université de Jijel pour ses précieux aides et ses conseils, et pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements au Dr SIFOUR Mohamed, Maître de Conférences à l'Université de Jijel Pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.

Je remercie Dr LAGHOUCI Essaid, Professeur à l'Université de Jijel qui m'a accueilli au sein de son laboratoire de pharmacologie et de phytochimie qu'il trouve ici mon respect et reconnaissance.

Une partie de ce travail a été réalisée au sein du laboratoire d'hygiène, je tiens à remercier vivement le Medecin CHIBOUT Imène.

Merci aux ingénieurs de laboratoire qui ont contribué à ce travail, Mme Bouraoui Hadya et Mr Aibeche Riyad qui m'ont aidé durant ces années et sans qui je n'aurais pas pu avancer autant sur ce sujet.

Je tiens à adresser un énorme merci à mon super frère Haroun pour tout le soutien qu'il m'a apporté. Je le remercie pour son aide dans la mise en forme de ce manuscrit.

Je souhaite adresser un gros merci à Ines, Sarah et Zineb pour leur formidable amitié, et dont l'angoisse permanente n'ont d'égal que leurs gentilleses.

Merci a tous mes amis (e) et mes collègues du laboratoire qui se reconnaîtront ici. Qui m'ont apporté leur aide et leur sympathie, je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite bonne continuation.

Mes plus grands remerciements s'adressent à mes parents pour tout ce qui m'ont apporté et leur soutien indéfectible. Merci de m'avoir toujours épaulé dans mes choix et de m'avoir toujours soutenu et poussé à me destiner vers un travail qui me passionne.

Merci à vous tous

Liste des abréviations

- B(a)p** : benzo(a)pyrène
- BPDE** : B(a)p-diol-époxyde
- CAT** : catalase
- CG/MS** : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
- CPF** : chlorpyrifos
- CPO** : chlorpyrifos-oxon
- Cyp 450** : cytochrome p 450
- DPPH** : diphényl picryl-hydrazyl
- EEP** : extrait éthanolique de la propolis
- EBM** : extrait brut méthanolique
- GGT** : gamma glutamyl transpéptidase
- GPx** : glutathion peroxydase
- GSH** : glutathion réduit
- GST** : glutathion-S-transférase
- H₂O₂** : peroxyde d'hydrogène
- HAP** : hydrocarbures aromatiques polycycliques
- L. sativum*** : la plante *Lepidium sativum*
- MDA** : malondialdéhyde
- mg EAG/g** : milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait
- mg EQ/g d'extrait** : milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait
- O₂[°]** : anion superoxyde
- OH[°]** : radical hydroxyle
- ROS** : reactive oxygen species
- SOD** : superoxyde dismutase

Liste des figures

Figure 1. Voies de bioactivation du benzo(a)pyrène	7
Figure 2. Activation métabolique du BPD par les AKR et formation des ROS.....	10
Figure 3. Schéma de la métabolisation du CPF	11
Figure 4. Voies de signalisation cellulaires modifiées par les ROS	17
Figure 5. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus hépatiques traités par le B(a)P.....	31
Figure 6. Effets du B(a)P sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatiques	33
Figure 7. Effet du B(a)P sur l'activité cytosolique de GGT dans les tissus hépatiques	35
Figure 8. Effets du B(a)P sur les activités cytosoliques de la GST et de CAT dans les tissus hépatiques	37
Figure 9. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus hépatiques traités par le CPF.....	39
Figure 10. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus pulmonaires traités par le CPF	40
Figure 11. Effets du CPF sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatopulmonaires traités par le CPF.....	41
Figure 12. Effet du CPF sur l'activité cytosolique de GGT dans les tissus hépatopulmonaires traités par le CPF.....	43
Figure 13. Effets du CPF sur les activités cytosoliques de la GST et de CAT dans les tissus hépatopulmonaires traités par le CPF	44
Figure 14. Résultats d'analyse de l'EEP par CG/MS	46
Figure 15. Résultats d'analyse de l'EBM des graines de la plante <i>L. sativum</i> par CG/MS ...	47
Figure 16. Activité anti-radicalaire de l'EBM des graines de la plante <i>L. sativum</i>	49
Figure 17. Analyse par microscope optique des tissus hépatiques des rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EEP.....	50
Figure 18. Effets de L'EEP sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatiques intoxiqués par le B(a)P	52
Figure 19. Effets de L'EEP sur les activités cytosoliques de GGT, de la GST et de CAT dans les tissus hépatiques intoxiqués par le B(a)P	53

Figure 20. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus hépatiques prétraités par l'EBM des graines de la palme <i>L. sativum</i> et intoxiqués par le CPF.....	54
Figure 21. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus pulmonaires prétraités par l'EBM des graines de la plante <i>L. sativum</i> et intoxiqués par le CPF	55
Figure 22. Effets de L'EBM des graines de la plante <i>L. sativum</i> sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatopulmonaires intoxiqués par le CPF	56
Figure 23. Effets de L'EBM des graines de la plante <i>L. sativum</i> sur les activités cytosoliques de la GGT, de la GST et de CAT dans les tissus hépatopulmonaires intoxiqués par le CPF	58

Table des matières

I. Introduction générale	3
II. Revue bibliographique	
II.1. Intoxications induites par le benzo(a)pyrène et le chlorpyrifos.....	5
II.1.1. Introduction.....	5
II.1.2. Intoxications induites par le benzo(a)pyrène	5
II.1.2.1. Introduction.....	5
II.1.2.2. Métabolisation du benzo(a)pyrène.....	5
II.1.2.3. Mécanismes des toxicités induites par le benzo(a)pyrène	8
II.1.3. Intoxications induites par le chlorpyrifos	10
II.1.3.1. Introduction.....	10
II.1.3.2. Métabolisation du chlorpyrifos	10
II.1.3.3. Mécanismes des toxicités induites par le chlorpyrifos	11
II.2. Le stress oxydant	13
II.2.1. Introduction.....	13
II.2.2. Conséquences du stress oxydatif	14
II.2.2.1. Atteintes des macromolécules biologiques.....	14
II.2.2.2. Effet des ROS sur la signalisation cellulaire.....	16
II.2.3. Systèmes antioxydants	17
II.2.3.1. Introduction.....	17
II.2.3.2. Systèmes antioxydants enzymatiques	18
II.2.3.3. Systèmes antioxydants non enzymatiques	18
II.3. Quelques sources naturelles de substances antioxydantes.....	20
II.3.1. Introduction.....	20
II.3.2. La propolis	20
II.3.3. La plante <i>Lepidium sativum</i>	21
III. Matériel et méthodes	
III.1. Matériel végétal et produits chimiques.....	23
III.2. Animaux	23
III.3. Préparation de l'extrait brut méthanolique des graines de la plante <i>L. sativum</i>	23
III.4. Analyse par CG/MS des extraits bruts de la propolis et de la plante <i>L. sativum</i>	24
III.5. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de l'EBM des graines de la plante <i>L. sativum</i>	24
III.6. Estimation de l'activité anti-radicalaire de l'EBM de la plante <i>L. sativum</i>	25
III.7. Animaux traités par les différentes substances employées.....	25

III.8. Préparation des fractions cytosoliques et dosage des protéines totales	27
III.9. Dosage des taux cytosoliques du MDA et du GSH.....	27
III.10. Mesure des activités cytosoliques de GGT, de la GST et de CAT.....	28
III.11. Etude histologique	29
III.12. Analyse statistique.....	29
Partie IV. Résultats et discussion	
IV.1. Caractérisation de la toxicité hépatique induite par le benzo(a)pyrène.....	31
IV.1.1. Mise en évidence des altérations histologiques hépatiques.....	31
IV.1.2. Evaluation du stress oxydatif hépatique.....	32
IV.2. Caractérisation des toxicités hépatopulmonaires induites par le chlorpyrifos	39
IV.2.1. Mise en évidence des altérations histologiques hépatopulmonaires	39
IV.2.2. Evaluation du stress oxydatif hépatopulmonaire	40
IV.3. Caractérisation des extraits bruts de la propolis et de la plante <i>L. sativum</i>	45
IV.4. Mise en évidence de l'effet hépatoprotecteur de l'EEP contre l'intoxication induite par le B(a)P.....	49
IV.5. Mise en évidence de l'effet protecteur hépatopulmonaire de l'EBM des graines de la plante <i>L. sativum</i> contre l'intoxication induite par le CPF	53
V. Conclusion générale et perspectives.....	59
VI. Références bibliographiques	61

I. Introduction générale

L'environnement représente un facteur clé de la santé humaine. Il apparaît de plus en plus largement que la santé humaine est affectée par les problématiques écologiques, notamment, liées à la pollution par les produits chimiques [1]. Parmi ces derniers, on trouve les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les pesticides. Les HAP sont généralement produits lors de la combustion incomplète des matières organiques. Ils peuvent être d'origine naturelle et sont notamment produits par les feux de forêts et des éruptions volcaniques. Mais, les principales sources de pollution par les HAP sont anthropiques (combustion des matières fossiles, certaines activités industrielles, fumée de cigarettes, produits alimentaires fumés) [2]. L'HAP le plus étudié présent dans l'environnement, est le Benzo(a)pyrène (B(a)P). Il est identifié comme étant cancérigène pour l'homme par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer. L'activation métabolique du B(a)P par le cytochrome p 450 (cyp 450) mène à la formation du B(a)P-7, 8-diol-9, 10-époxyde (BPDE) ; un métabolite très réactif avec l'ADN et possédant des capacités mutagéniques et cancérogéniques [3]. Le B(a)P provoque aussi le stress oxydatif, mais il est regrettable de constater qu'une majeure partie des études traitant le stress oxydatif induit par le B(a)P a été réalisée seulement dans le poumon [4, 5].

S'agissant des pesticides, ils sont intentionnellement ajoutés dans l'environnement pour contrôler les parasites. L'Algérie est classée parmi les pays qui consomment de grandes quantités de pesticides. Les analyses des niveaux de contamination des milieux naturels par les pesticides résiduels ne sont pas mises en œuvre de manière systématique. Toutefois, il a été démontré que la concentration de certaines molécules organophosphorées dans plus de 30 % des échantillons dépassait les valeurs préconisées par l'Organisation Mondiale de la Santé [6]. Il y a plus de trois millions d'intoxications provoquées par les organophosphorés qui restent une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays du tiers monde [7, 8]. Le chlorpyrifos (CPF) est un insecticide organophosphoré, très utilisé dans l'agriculture [9]. Du point de vue biologique, il est considéré comme étant un anticholinérasique puissant, un évocateur du stress oxydatif et un inhibiteur des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules neuronales. Enfin, il est capable de provoquer d'autres effets toxiques tels que le dysfonctionnement hépatique et la génotoxicité [10].

Le métabolisme de ces deux xénobiotiques produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui perturbent le statut redox cellulaire, ce qui occasionne le stress oxydatif [11]. Les ROS peuvent également interagir avec l'ensemble des macromolécules biologiques,

provoquant ainsi des altérations des fonctions cellulaires susceptibles de conduire à la mort cellulaire soit par nécrose, soit par apoptose [12]. Les dommages oxydatifs de diverses biomolécules engendrent de nombreux dégâts cellulaires tels que les perturbations des processus de régulation de la survie cellulaire et la prolifération (voies de signalisation des MAPK ou de certaines caspases) [13]. De nombreuses études toxicologiques ont été effectuées pour comprendre les bases biologiques de la réponse cellulaire à un stress environnemental, cependant, beaucoup d'aspects restent à élucider.

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail était d'étudier les effets toxiques induits par le B(a)P et le CPF chez le rat, aussi bien sur le plan histologique que biochimique. Il a été question d'évaluer certains indicateurs biochimiques du stress oxydatif. Pour ce faire, le stress oxydatif a été évalué, en mesurant les taux du malondialdéhyde (MDA) et du glutathion réduit (GSH), et les activités de glutathion-S-transférase (GST), de la catalase (CAT) et de la gamma glutamyl transpeptidase (GGT) dans les extraits tissulaires hépatopulmonaires provenant d'animaux traités ou non par le B(a)P avec une dose de 100 mg/kg ou le CPF avec une dose de 6.75 mg/Kg. Parallèlement, les changements histopathologiques ont été analysés par microscope optique. Contrairement à l'étude du stress oxydatif induit par le B(a)P qui a été limitée au tissu hépatique, celle concernant le CPF a été élargie au foie et au poumon. De plus, nous avons cherché à mettre en évidence la présence d'activités protectrices potentielles de substances naturelles extraites de plantes notamment, et qui représentent une source inépuisable de principes actifs. En effet, nous avons évalué les bienfaits des extraits bruts de la propolis et des graines de la plante *Lepidium sativum* (*L. sativum*) contre les effets toxiques induits par le B(a)P ou le CPF, respectivement et ceci dans le foie et/ou le poumon.

Ce manuscrit est organisé en six parties ; une première partie introductive est suivie par une deuxième partie qui passe en revue l'essentiel de la bibliographie sur les mécanismes d'intoxications induites par le B(a)P et par le CPF, le stress oxydatif et les substances naturelles bioactives, puis, une troisième partie qui est réservée à la description de l'ensemble des approches et techniques employées. La quatrième partie est consacrée à la présentation et la discussion des résultats obtenus, et complétée par une cinquième partie qui est dédiée à la conclusion générale et les perspectives. Enfin, une sixième partie présente les principales références bibliographiques reliées à cette étude.

II. Revue bibliographique

II.1. Intoxications induites par le benzo(a)pyrène et le chlorpyrifos

II.1.1. Introduction

La qualité de l'environnement physique, chimique et biologique constitue l'un des déterminants de la santé des populations. L'organisation mondiale de la santé a d'ailleurs introduit le concept de « santé environnementale » pour souligner l'importance des relations entre l'environnement et la santé. De nos jours, la pression anthropique subie par l'environnement est très importante avec l'existence d'environ 37 millions de substances chimiques. Ces substances peuvent engendrer des effets toxiques irréversibles sur les organismes exposés [14]. Parmi ces polluants, on trouve les HAP et les pesticides. Le B(a)P est l'HAP le plus étudié, ses mécanismes de bioactivation et ses effets génotoxiques, mutagènes et cancérigènes ont été décrits chez les rongeurs et chez certains organismes marins [3]. En plus des HAP, le groupe des pesticides a retenu une attention particulière, il est soupçonné de présenter un risque pour la santé de l'homme et pour son environnement. Des effets cancérigènes, neurotoxiques ou de type perturbation endocrinienne des pesticides ont été mis en évidence chez l'animal [15].

II.1.2. Intoxications induites par le benzo(a)pyrène

II.1.2.1. Introduction

Le B(a)p est le composé prototypique des HAP, il est le plus étudié en termes toxicologiques. Ainsi, selon l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer, le B(a)p est cancérigène pour les animaux de laboratoire et probablement l'homme. Il est très lipophile, interagissant donc avec les membranes cellulaires, principalement au niveau des tissus riches en lipides. Les cellules hépatiques sont ainsi doublement touchées, en effet, d'une part le foie est un organe riche en lipides où le B(a)p s'accumule. D'autre part, le foie étant l'un des principaux sites de biotransformation des xénobiotiques, où le B(a)p est principalement métabolisé en composés hautement réactifs capables d'induire des effets délétères sévères [16].

II.1.2.2. Métabolisation du benzo(a)pyrène

Une fois absorbé, le B(a)p est principalement acheminé vers le foie où il est fixé sur les membranes cellulaires, grâce à des interactions hydrophobes. Sa présence dans le cytoplasme entraîne une induction spécifique de certaines enzymes du métabolisme des

xénobiotiques, par activation de la voie de transduction du signal impliquant l'AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) [17]. Ce récepteur régule l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour les enzymes du métabolisme et se lie à divers facteurs cytoplasmiques tels que l'Hsp 90 (*heat shock protein 90*) et la protéine AIP (*Ah interacting protein*) [18]. L'association entre l'AhR, Hsp 90 et l'AIP confère aux récepteurs cytoplasmiques une reconnaissance spécifique et optimale vis à vis de certains ligands et notamment les HAP. Dès sa pénétration dans la cellule, le B(a)p se lie spécifiquement à l'AhR, cette liaison est corrélée à la fois avec la dissociation de l'AhR et d'autres facteurs, les Hsp 90 et les AIP ; de ce fait, le monomère d'AIP est largué dans le cytosol permettant au reste du complexe ligand-récepteur de se transloquer vers le noyau (accumulation nucléaire du complexe B(a)p-AhR). Dans le noyau, l'AhR toujours associé au B(a)p se lie spécifiquement à une protéine nucléaire, l'ARNT (*Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator*). Le complexe hétérodimérique AhR-ARNT devient alors capable d'interagir avec l'ADN [19]; il reconnaît un motif classique contenant la séquence consensus '5-T/GNGCGTGACG/CA-3' dans l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) [20]. De plus, il a été récemment rapporté que les souris mutantes AhR (-/-) sont résistantes à la carcinogenèse induite par le B(a)p lorsqu'elles sont comparées avec AhR (+/+). Ainsi, les auteurs ont conclu que l'inefficacité des souris déficientes peut être due à leur incapacité de produire des quantités significatives de cyp 1A1 qui activent les métabolites carcinogéniques du B(a)p [21].

Le B(a)p, est d'abord métabolisé par les enzymes du système monooxygénase (MFO : *mixed function oxydogenase*) du cyp 450 (cyp 1A1, cyp 1B1) en composés plus hydrophiles, comme les phénols et les époxydes. Ces enzymes sont essentiellement localisées dans les microsomes [22]. Une voie importante d'activation métabolique du B(a)p procède par la génération de trans-7, 8 dihydrodiol du B(a)p (BPD) après hydratation des époxydes par l'époxyde hydrolase, une enzyme microsomale non dépendante du système cyp 450. Une fois formé, le BPD peut subir davantage d'oxydation par trois voies enzymatiques distinctes (figure 1). Dans la première voie, une seconde époxydation catalysée par les cyp 1A1/1B1 permet la transformation du BPD, un métabolite proximal du B(a)p, en métabolite ultime, le B(a)p-diol-époxyde (BPDE) [23]. Le BPDE est un métabolite hautement mutagène et tumorigène car, comme tous les diols époxydes formés à partir des HAP, il forme des adduits covalents avec l'ADN, en position exocyclique N₂ des résidus guanines et en N₆ des adénines [24].

Une 2^{ème} voie d'activation du B(a)p est catalysée par les AKR (*Aldo-keto-Reductases*) qui sont des oxydoréductases NADPH dépendantes. Il existe plusieurs isoformes de ces enzymes (AKR1C1, AKR1C4), qui catalysent l'oxydation du BPD pour générer l'o-quinone B(a)p-7, 8 dione (BPQ) [25]. La dihydrodiol déshydrogénase, appartenant à la famille des AKR, entre en compétition avec le cyp 450, afin de catalyser l'oxydation de BPD en catéchols. Le catéchol étant lui même instable, il est transformé en *o*-quinone (BPQ) par deux oxydations successives à un électron. Les quinones sont formées dans les hépatocytes de rat par AKR1C9 et sont cytotoxiques et génotoxiques. Le BPQ forme des adduits stables en N₂-dGuanosine, N₇-dGuanosine et en N₆-dAdénosine. Les adduits de type N₇-dGuanosine donnent lieu à des transversions G T observées dans le gène codant la protéine p53, une protéine suppresseur de tumeurs [26].

La 3^{ème} voie implique la formation d'un radical cationique catalysé par le cyp 450 peroxydase. Les métabolites dérivés des radicaux cationiques, le B(a)p-1-6 et B(a)p-3-6-dione alkylent l'ADN et peuvent aussi activer l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) conduisant à l'augmentation de la prolifération cellulaire, suggérant ainsi un rôle potentiel dans la promotion tumorale [27].

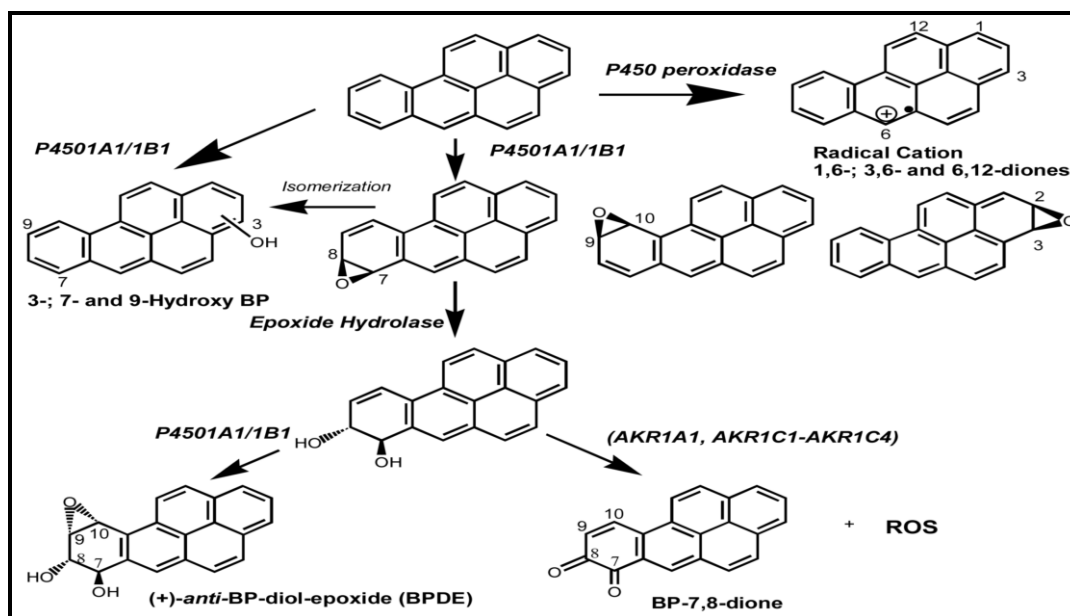


Figure 1. Voies de bioactivation du benzo(a)pyrène. Ce schéma représente l'activation métabolique du B(a)P par les voies des diol-époxydes, des *o*-quinones et de cytochrome p 450 peroxydases, menant principalement à la formation respectivement du BPDE, du BPQ et du B(a)p-3-6-dione [26].

Après l'activation du B(a)P, les métabolites oxydés vont alors, se lier à des groupements hydrophiles (acide glucuronique, acide sulfurique, glutathion et autres) dans le but de favoriser l'excrétion. Les enzymes qui catalysent ces réactions de détoxification sont induites à partir d'un mécanisme dépendant de la liaison B(a)p-AhR [28]. La GST est impliquée dans la conjugaison des métabolites réactifs du B(a)p ce qui permet de supprimer la formation d'adduits [29]. Il a été montré que la glucuronidation était une réaction importante de la conjugaison des métabolites du B(a)p dans le foie. De plus, les quinones formées par oxydation des phénols peuvent être réduites et se conjuguent aux glucuronides afin d'être excrétées [30].

II.1.2.3. Mécanismes des toxicités induites par le benzo(a)pyrène

L'exposition des organismes au B(a)p peut entraîner une interaction de ce polluant par le biais de leurs métabolites avec l'ensemble des macromolécules cellulaires. Elle mène principalement à la formation d'adduits à la désoxyguanosine (dGuo) qui résulte de l'addition du BPDE en position N₂ de la dGuo [31]. Un autre adduit stable résultant de l'addition du BPDE en position N₆ de la dAdo (désoxyadénosine) a pu être caractérisé. Bien que, le BPDE soit considéré comme le carcinogène ultime de B(a)P, d'autres métabolites du B(a)P peuvent former des adduits.

Le potentiel de BPQ à former des adduits stables de l'ADN et des protéines a récemment été démontré. Parmi ces adduits, certains ont pu être identifiés comme étant des adduits stables, liés à la Guanine, à l'Adénine, et à la Cytosine [32, 33]. Certains phénols, comme le 3-OH-B(a)P, peuvent générer des adduits des protéines [34]. Le radical cationique du B(a)P, est également capable de former des adduits de l'ADN sur la dGuo et en N₇ de la dAdo. La réparation incomplète des adduits d'ADN par le système de réparation semble être à l'origine d'une grande partie des cassures de brins d'ADN. En outre les ROS générées par le BPQ peuvent fragmenter les brins d'ADN [35].

D'autre part, le niveau de l'ARN_m du gène p53 augmente après le traitement des cellules par le B(a)p, le B(a)p active la transcription de p53, en se liant avec le facteur de transcription NF_κB (*facteur nucléaire kappa B*). En effet, la région promotrice du gène p53 (de -78 à +10), contient des motifs pour plusieurs facteurs importants de transcription y compris le facteur NF_κB [36]. Le gène p53 est l'un des gènes les plus généralement muté, identifié dans divers types de tumeurs humaines, les résultats de nombreuses études

suggèrent que l'inactivation de p53 est une étape critique menant à la transformation néoplasique. Les niveaux de la protéine p53 sont augmentés en réponse à divers types de dommage d'ADN [37].

Par ailleurs, le B(a)p inhibe la GJIC (*Gap Junction Intracellular Communication*) directement, et non pas par ses métabolites. Il a été démontré que cette inhibition n'est pas associée à l'activation du récepteur AhR par le B(a)P dans des cellules hépatique G27 n'exprimant pas les ARM_m du cyp 450 et de l'AhR, et des cellules hepGe en présence de α NF (α -naphthoflavone), un inhibiteur du métabolisme des HAP. Il en résulte la stimulation de la prolifération cellulaire parce que la formation de GJIC inhibe la prolifération cellulaire par le blocage de la dégradation de l'inhibiteur de la prolifération cellulaire, la protéine p27. Le changement de GJIC est l'un des facteurs de promotion de la cancérogenèse. Le fonctionnement de GJIC est altéré dans la majorité des tumeurs en comparaison avec les tissus sains du même organe, en effet, les concentrations des protéines GJIC sont élevées dans les interfaces 'cellules tumorales/cellules tumorales', et complètement nulles dans les interfaces 'cellules tumorales/cellules normales' [38].

Le B(a)P induit aussi le stress oxydatif ; le mécanisme essentiel de la génération des ROS par le B(a)p implique la conversion du B(a)p en quinones [4]. La formation de BPQ par voie AKR représente une voie potentielle de toxicité alternative à la voie promutagène de la formation du BPDE [23], et conduit à la génération de l'anion superoxyde (O_2°) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [27]. Le BPQ peut également être converti enzymatiquement en catéchols par AKR [39]. Le catéchol est un composé instable qui subit par la suite une auto-oxydation à un électron pour former un radical anion, semi-quinone et des ROS comme le H_2O_2 et l' O_2° [40]. La semi-quinone va subir une seconde auto-oxydation à un électron afin de générer le B(a)p7, 8 dione ainsi que des ROS (figure 2). L'impact spécifique de la formation des quinones est la génération des ROS, ces derniers ont été associés à l'activation d'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) menant à l'augmentation de la prolifération cellulaire [41].

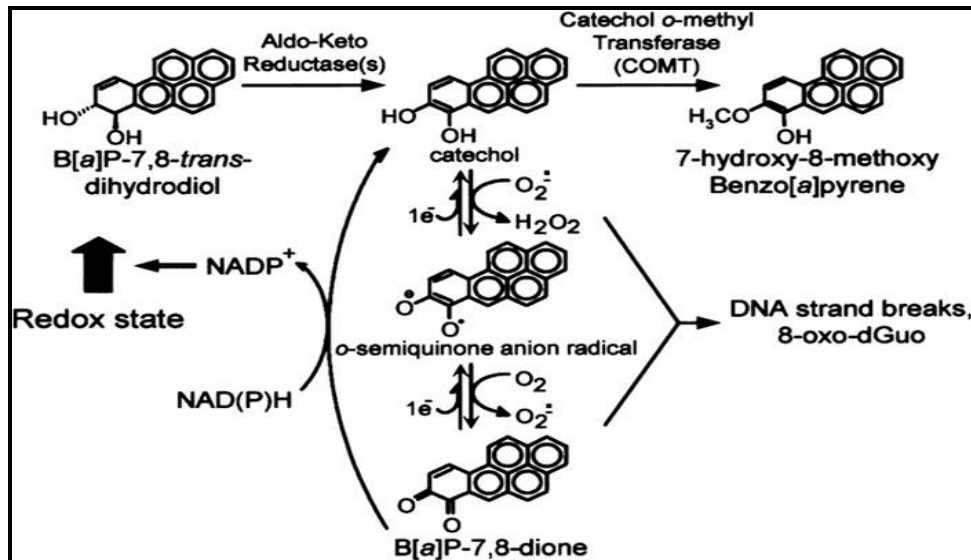


Figure 2. Activation métabolique du BPD par les AKR et formation des ROS. Génération du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), d'anion superoxyde (O₂^{•-}) par la voie des AKR [42].

II.1.3. Intoxications induites par le chlorpyrifos

II.1.3.1. Introduction

Le CPF, est un insecticide organophosphoré à large spectre [9], son principe actif repose sur la perturbation du fonctionnement du système nerveux par l'inhibition d'une enzyme essentielle à son bon fonctionnement : l'acétylcholinestérase (AChE). Cette inhibition se produit lorsque le CPF se fixe sur le groupe hydroxyle de la sérine du site actif de l'AChE, ce qui empêche la liaison de cette enzyme avec l'acétylcholine. L'inhibition de l'AChE provoque une accumulation de l'acétylcholine libérée dans la fente synaptique lors d'une stimulation nerveuse, menant à une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques. Ainsi, le passage de l'information nerveuse est perturbé, voir même bloqué, ce qui peut mener à l'apparition de divers troubles nerveux pouvant aller jusqu'à la mort de l'individu [43].

II.1.3.2. Métabolisation du chlorpyrifos

La métabolisation du CPF est exécutée par deux voies différentes (figure 3). La première, est la désulfuration oxydative de la double liaison avec le phosphore, par le cyp 450 du foie, qui donne lieu au chlorpyrifos-oxon (CPO). Ce métabolite est hydrolysé par une A-estérase : paraoxonase 1 (PON-1) ou une B-estérase en diethylphosphate (DEP) et un métabolite organique inactif le 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinal (TCP). C'est une des voies

de détoxification du CPF. Il en existe une deuxième voie dans laquelle le CPF peut être directement hydrolysé en diethylthiophosphate et le TCP. Ce dernier métabolite est éliminé dans les urines sous forme de sulfates ou glucuronides de TCP [44].

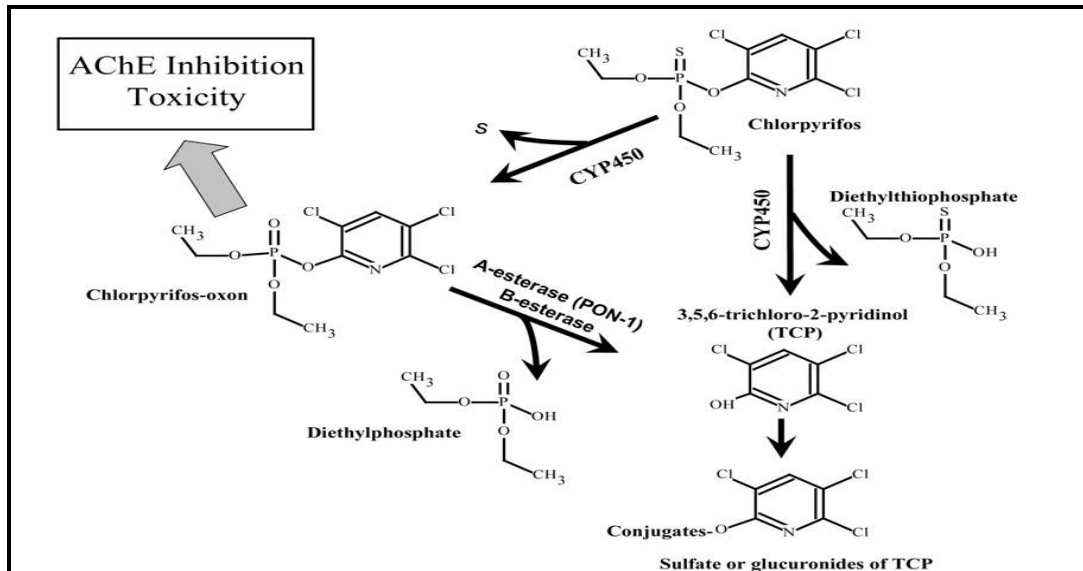


Figure 3. Schéma de la métabolisation du CPF. Ce schéma représente la transformation du CPF en métabolite actif, le CPO, par le cyp 450 et en métabolite inactif, le TCP [44].

II.1.3.3. Mécanismes des toxicités induites par le chlorpyrifos

Le CPF est susceptible de passer la barrière hémato-méningée et d'atteindre le système nerveux central. Des preuves de toxicité du CPF dans les cellules nerveuses ont été montrées ; des études sur des embryons de rat en culture exposés une journée au CPF durant le moment de la formation du tube neural (première semaine de gestation chez le rat) ont montré l'apparition d'anomalies mitotiques ainsi que apoptotiques dans le cerveau après 48 heures [45]. Ces altérations sont très semblables à celles produites par la nicotine dans les mêmes conditions d'exposition [46]. En considérant que la nicotine crée ces problèmes en agissant directement sur les récepteurs nicotiques, on pourrait penser que le CPF agirait de la même façon. Néanmoins, dans le cas du CPF, la stimulation des récepteurs nicotiques ne peut se faire que lors de la libération active d'AChE. Or, il semblait que le système de synthèse (choline acétyltransférase) de ce neurotransmetteur ne soit pas encore existant à ce stage du développement. Ces effets néfastes sur le cerveau en développement ne seraient donc pas liés directement à l'inhibition de l'AChE. Une étude a

permis de mettre en évidence la capacité du CPF à inhiber la synthèse d'ADN indépendamment de l'inactivation cholinergique. En effet, l'inhibition survient avant que les cellules présentent les caractères cholinergiques fonctionnels. Il s'agirait d'une interférence (de type non-cholinergique) entre le CPF et des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire [47]. Il y aurait un effet direct du CPF sur l'expression et la fonction de certains facteurs de transcription régulant le passage entre la réplication et la différenciation, ainsi que la croissance des processus neuronaux comme le CREB (*Ca⁺⁺/cAMP Response Element Binding Protein*) [48] et des facteurs neurotrophiques (BDNF: *Brain Derived Growth Factors*, NGF: *Nerve Growth Factor*, et FGFs: *Fibroblast Growth Factor Family*) [49].

De l'autre côté, il y a très peu d'évidences concernant les effets toxiques du CPF dans d'autres tissus en dehors du système nerveux. Une étude a révélé que le CPF est un mutagène, capable de provoquer des altérations chromosomiques [50]. Chez les rats, le CPF induisait des anomalies cytotoxiques, mitotiques, et immunologiques telles que l'altération de l'expression de CD5 et de CD8, la génération des ROS, et des dommages d'ADN [51, 52 et 53]. En outre, le CPF modifie les antioxydants chez le rat, menant probablement au développement d'effets oxydants [54]. Bien que les études chroniques étudiant la mutagénicité et la carcinogénicité du CPF étaient en grande partie négatives, mais, une étude épidémiologique récente sur les agriculteurs a indiqué qu'il existait une association significative entre l'utilisation du CPF et le cancer des poumons, du rectum, du rein et du cerveau [53].

L'induction de stress oxydatif a été rapportée comme principal mécanisme de toxicité du CPF après exposition sub-chronique ou chronique [55]. Les ROS peuvent être produites comme résultat du métabolisme du CPF par le cyp 450 [56]. Une autre manière de générer des ROS par le CPF est la consommation élevée d'énergie couplée par l'inhibition de la phosphorylation oxydative, et la libération élevée du glucose par l'induction de la glycogénèse dans le foie. La consommation élevée d'énergie conduit à minimiser la capacité des cellules à maintenir le niveau d'énergie. Pour cette raison, un excès des ROS est produit dans différents organes. En outre, l'exposition au CPF induit une hyperglycémie menant à l'augmentation de glycation non enzymatique par la liaison du glucose aux groupes amines des protéines et la formation de composés complexes, produits finaux de glycation avancée (AGEs : *advanced glycation end products*), qui changent et

altèrent la structure et la fonction des protéines, et induisent un stress oxydatif intracellulaire [57].

II.2. Le stress oxydant

II.2.1. Introduction

L'oxygène élément indispensable à la vie, pouvait dans certaines conditions devenir un danger pour l'organisme suite à la formation des ROS [58]. Un radical libre est une espèce chimique contenant un électron célibataire non apparié au niveau de son orbitale électronique périphérique, cet état confère à la molécule une grande instabilité et une réactivité vis-à-vis d'autres molécules. Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de l'électron libre sur une autre molécule [59]. Le *stress oxydant* est classiquement défini comme un déséquilibre en faveur des ROS. Ce déséquilibre résulte soit d'une production accrue des radicaux libres par rapport aux capacités antioxydantes intactes, ou bien d'un état déficient de ces dernières, ou bien de ces deux situations cumulées. Les espèces réactives de l'oxygène incluent les radicaux libres de l'oxygène : l' O_2^\bullet , le radical hydroxyle (OH^\bullet), mais, aussi certains dérivés oxygénés dont la toxicité est importante tels que le H_2O_2 [60].

L'anion superoxyde (O_2^\bullet), est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de ce dernier entraîne la formation d'oxygène fondamental et de H_2O_2 . L' H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre, mais, il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques peut lui permettre de se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, le H_2O_2 se décompose, en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}), en un ion OH^- et un OH^\bullet [$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\bullet + OH^- + Fe^{3+}$]. Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, à condition qu' O_2^\bullet soit absent du milieu car la présence de ce dernier transforme le Fe^{3+} en Fe^{2+} . Ainsi, la présence simultanée de H_2O_2 , d' O_2^\bullet et de fer permet la production d' OH^\bullet . L' OH^\bullet , avec une demi-vie de l'ordre de nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion de ce radical lui permet de réagir avec les biomolécules entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires [11].

II.2.2. Conséquences du stress oxydatif

L'accumulation des ROS a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines, les lipides et l'ADN [61].

II.2.2.1. Atteintes des macromolécules biologiques

Les lipides membranaires sont la cible privilégiée des ROS. Parmi les lipides membranaires, les phospholipides sont les plus abondants. Les acides gras polyinsaturés sont plus sensibles aux attaques radicalaires et génèrent des peroxydes lipidiques qui sont eux même très réactifs. La peroxydation lipidique fournit ainsi une grande variété de produits, dont certaines peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, le MDA et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) qui ont été très étudiés comme marqueurs de peroxydation lipidique [62].

Les protéines sont aussi sensibles à l'action des ROS, les plus touchées d'entre elles sont celles comportant un groupement sulphydryle (-SH). Le H_2O_2 , et surtout le HO° sont capables d'oxyder ces groupements, conduisant à l'inactivation de certaines enzymes. En particulier, la présence de HO° est à l'origine de dégradations irréversibles de protéines, par la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés. L' O_2° a également la capacité de réagir avec les centres Fer-Soufre de certaines protéines, entraînant le relargage de fer dans le milieu. Cette action a une double conséquence, puisqu'elle induit l'inactivation de la protéine hémique ainsi que la formation potentielle de nouveaux radicaux hydroxyles, par la réaction d'Haber-Weiss. En outre, les ROS induisent des modifications indirectes des protéines par la formation d'adduits par des aldéhydes dérivant de la peroxydation des lipides comme le MDA et 4-HNE. Les protéines peuvent alors subir soit des réticulations par formation notamment de ponts bi-tyrosine, soit des coupures en cas d'agression forte, ou encore des modifications de certains acides aminés en cas d'agressions modérés. Des enzymes, mais aussi des récepteurs cellulaires et des protéines de transport, peuvent être la cible de ces phénomènes oxydatifs et perdent ainsi leurs propriétés biologiques, en devenant alors beaucoup plus sensibles à l'action des protéases [63]. Les protéines oxydées se révèlent très hydrophobes, soit par suppression de groupements amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles forment des amas anormaux intracellulaire ou membranaire. Associés aux aldéhydes produits lors de la peroxydation lipidique, ces amas forment des dépôts de lipofushines

caractéristiques du vieillissement cellulaire. Aussi, des altérations peuvent concerner les protéines impliquées dans le maintien des gradients ioniques entre les cellules et les fluides extracellulaires. C'est le cas des pompes à calcium ou à potassium. Ces protéines sont essentielles dans la genèse du signal électrique des cellules musculaires et nerveuses [64].

D'autre part, le spectre d'altération de l'ADN est large : modification des bases puriques et pyrimidique, perte des bases « sites abasique », cassure simple ou double brins, altérations des sucres et aussi pontage ADN-protéine. Les modifications des bases d'ADN les plus communes sont 8-oxo-7, 8-dihydroguanine (8oxoGua) provenant de l'addition d' OH° dans la position C_8 de la guanine, en produisant un radical 8-hydroxy-7, 8-dihydroguanyl qui peut être oxydé en 8-oxoGua ou réduit pour donner un anneau ouvert FapyGua [65]. Le changement de l'ADN en 8-oxoGua fait partie des sites d'identification utilisés par des ADN glycosylase pour détecter les bases guaniniques endommagées [66]. L'interaction d' OH° avec des pyrimidines en positions 5 ou 6 peut produire plusieurs liaisons et deux produits parmi les plus abondant ; 5, 6-dihydroxy-5, 6 dihydrothymine et 5, 6-dihydroxy-5,6 dihydrocytosine. Le 8-oxoGua et 5, 6-dihydroxy-5, 6 dihydrothymine ont été utilisés comme marqueurs de l'augmentation du stress oxydatif liée au cancer [65]. Ces lésions ne sont pas létales, mais, elles sont mutagéniques, ainsi, l'hydrolyse de la liaison N-glycosidique entre la base et le désoxyribose libère la base et crée un site abasique non fonctionnel [41].

En outre, l'interaction des OH° avec l'ADN produit des coupures simples brins SSB (*Single Strand Break*), par un mécanisme impliquant la suppression de l'hydrogène de 2-désoxyribose ce qui permet la formation des radicaux peroxyde (ROO°) en présence de l'oxygène. Ces derniers peuvent également soustraire des atomes d'hydrogène des parties sucrés menant de ce fait aux ruptures de brin d'ADN par une voie qui implique la suppression de l'hydrogène en C_3 , C_4 et C_5 . Ainsi, des ruptures doubles brins DSB (*Double Strand Break*) peuvent se produire, suite à une rupture des deux chaînes à des sites assez proches, l'un de l'autre [67]. L'accumulation chronique des lésions d'ADN peut provoquer des erreurs de réplication d'ADN, l'induction des voies de transduction de signaux cellulaires, l'instabilité génomique (état précancéreux) et plutard, la transformation cellulaires maligne [61]. Par ailleurs, les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique (MDA et 4-HNE) peuvent s'ajouter au groupe amine des bases d'ADN et constituer ainsi, un autre type de dégâts oxydatifs de l'ADN. Le MDA forme des adduits

des bases dGua et dC. Il semble que dGua soit l'adduit le plus souvent formé [62]. Le 4-HNE forme préférentiellement le 4-HNE-Gua [68]. Enfin, l'attaque radicalaire des protéines qui entrent en contact avec l'ADN pour le protéger ou pour le lire, entraîne la genèse de pontage ADN-protéine [69].

II.2.2.2. Effet des ROS sur la signalisation cellulaire

Il est clairement établi que les ROS interfèrent avec l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans les voies de transduction du signal. Puisque les ROS sont oxydés, ils influencent le statut redox et peuvent selon, leur concentration causer soit la prolifération cellulaire ou la mort cellulaire. Il a été mentionné que la concentration élevée des ROS cause la mort cellulaire, et que l'effet des ROS sur la prolifération cellulaire s'est produit exclusivement à petite concentration. Les basses concentrations de H_2O_2 et $d'O_2^\circ$ stimulent la prolifération cellulaire [70]. Les mécanismes qui stimulent la prolifération cellulaire sont susceptibles d'impliquer l'interaction directe des ROS avec des récepteurs spécifiques et la modulation de l'état redox des molécules de signalisation telles que les protéines kinases et les facteurs de transcription.

Le changement du statut redox des molécules de signalisation peut alternativement changer ses activités menant à la stimulation de la croissance cellulaire en contribuant au développement du cancer [71]. Par exemple, les ROS ont été capables de moduler la capacité de la thioredoxine (TRx) à interagir et d'empêcher l'ASK₁ (*Apoptosing Signaling Kinase 1*) un membre de la famille MAPK₃, impliqué dans la voie de signalisation d'un récepteur de facteur de nécrose tumorale à une protéine Kinase active par le stress (*stress activated protein kinase*) SAPK ou JNK [72]. Cette kinase est maintenue inactive par une liaison avec la TRx et est activée par les ROS au niveau des fonctions thiol de deux cystéines pour former un pont disulfure, ce qui libère ASK₁ et lui permet d'initier la cascade MAPKinases. Puisque la voie de signalisation MAPK est un mécanisme important de régulation impliqué dans divers fonctions cellulaires dont la régulation du métabolisme et la prolifération cellulaire, les ROS peuvent affecter cette voie de signalisation et stimulent ainsi la prolifération cellulaire. La modification oxydante des facteurs de transcription (NF_κB, HIF-1 α) et des molécules de signalisation intermédiaire comme ERK et JNK a été également montrée pour être impliquée dans la modulation de la croissance et la survie cellulaire catalysée par les ROS (figure 4). En outre, l'oxydation de la protéine p53 au niveau du résidu cystéine affecte sa capacité de se lier à l'ADN. Ainsi, les ROS

peuvent compromettre les fonctions de p53 dans la régulation du cycle cellulaire et contribuent à la prolifération non contrôlée de la cellule [71].

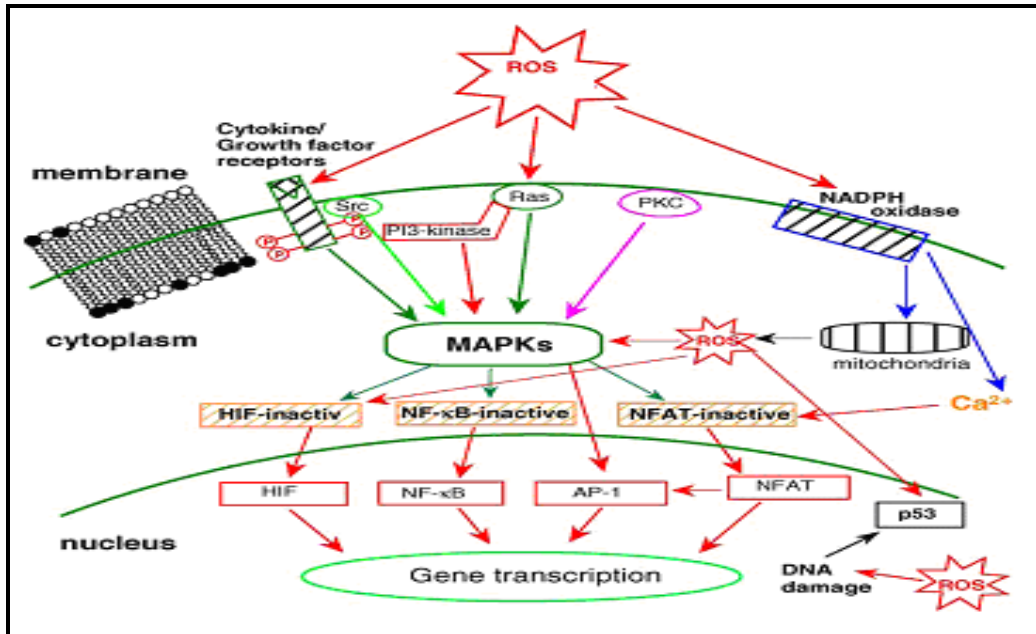


Figure 4. Voies de signalisation cellulaires modifiées par les ROS. Les modifications structurales des protéines mènent à l'activation de plusieurs cascades de signalisation comme MAPKinase, SRC et PI3 qui vont activer plusieurs facteurs de transcriptions à savoir NF- κ B, p53 et HIF1 [61].

II.2.3. Les systèmes antioxydants

II.2.3.1. Introduction

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique des ROS est assuré par des systèmes antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques [73]. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. L'avènement de la Biologie Moléculaire a permis de démontrer que les antioxydants sont des molécules qui possèdent des propriétés allant bien au-delà de leur capacité à piéger les ROS. Expérimentalement, il a été bien prouvé que les antioxydants présentent des activités anticancéreuses non seulement en piégeant des ROS mais aussi en augmentant la réponse immunitaire, en diminuant l'expression d'oncogènes ou en inhibant l'angiogenèse des tumeurs. Des recherches sur des cellules cancéreuses en culture ont démontré que le sélénium diminue le nombre de mitose de ces cellules [74].

II.2.3.2. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase et glutathion réductase) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ROS. La superoxyde dismutase (SOD), catalyse la dismutation de l' O_2^\bullet en H_2O_2 . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD) [75]. La distribution de ces isoformes varie selon le tissu. Cependant, la Mn-SOD semble indispensable à la vie, sa mutation est non viable ; l'espérance de vie maximale pour des souris Mn-SOD^{-/-} n'est que de 22 jours. Ceci n'est pas le cas pour la forme cytosolique bien que l'espérance de vie chez des souris transgéniques Cu/Zn-SOD^{-/-} est de 130 à 180 semaines [76].

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lors de cette réaction deux molécules de GSH sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). Il existe également une GPx associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx), qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique [77]. Il y a aussi la glutathion réductase qui a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries [78].

Concernant la CAT, elle est généralement responsable de l'élimination d' H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2 . Contrairement à la GPx, l'affinité de la CAT pour l' H_2O_2 est plus élevée seulement lorsque les teneurs en H_2O_2 sont accrus [76]. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol [79].

II.2.3.3. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, le GSH, l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C. Les oligoéléments comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le

stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique [80].

Le GSH réduit le H_2O_2 grâce à la réaction catalysée par la GPx. Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique [79]. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est utilisé comme marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé est augmenté [81].

L'ubiquinone et le cytochrome c sous leurs formes semi-radicalaires, jouaient un rôle fondamental dans la production des ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme « ubiquinol » agissait comme antioxydant [79]. L'ubiquinol protège les membranes contre la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de H_2O_2 . L'ubiquinone est également impliqué dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS [82]. Le cytochrome c présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' O_2° produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de H_2O [83].

Les vitamines E et C semblent être plus importants dans la lutte contre de stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' O_2° et OH° . Elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E [84].

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en flavonoïdes qui se trouvent en grande quantité dans le thé vert et les légumes. Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques [58].

II.3. Quelques sources naturelles de substances antioxydantes

II.3.1. Introduction

Il y a plus de 20 000 espèces de plantes utilisées en médecine traditionnelle, et ce sont toutes des réservoirs potentiels pour des substances actives. L'utilisation des molécules naturelles pour remédier au phénomène d'oxydation et ses conséquences sur la santé ont fait l'objet de nombreuses recherches. Les activités antioxydantes des extraits d'une grande variété de plantes ont été mises en évidence [85].

II.3.2. La propolis

La propolis ou la colle de l'abeille désigne une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques de circonstance visqueuse recueillies sur certaines parties des végétaux par les abeilles ouvrières spécialisés (Butineuses), qui les rapportent à la ruche, les additionnent et les modifient vraisemblablement en partie par l'apport de certaines de leurs sécrétions propres [86]. L'utilisation de la propolis remonte à l'Égypte antique et de façon certaine au Grèce ; d'où viens son nom « pro » : en avant et « polis » signifie la cité ou la ville. En fait ce nom provient du fait que les abeilles utilisent cette substance à l'entrée de la ruche [87]. Les anciens égyptiens, l'utilisaient pour embaumer les corps des défunts, et pour soigner et anesthésier les caries dentaires. En Europe, on trouve quelques traces de son usage, dans le traitement des plaies aux 18^{ème} et 19^{ème} siècles, mais c'est surtout à l'occasion de la guerre des Boers en Afrique du sud, qu'elle connaît son apogée d'utilisation, dans le cadre de ses propriétés désinfectantes et cicatrisantes. En union soviétique les apiculteurs ont utilisé la propolis comme un médicament pour les animaux depuis le 19^{ème} siècle [88].

La composition chimique de la propolis est variable selon l'origine géographique et l'écologie de l'abeille, ainsi que les arbres et les végétaux se trouvant dans son écosystème [89]. Malgré les différentes sources végétales dont la propolis est issue, elle présente tout de même qualitativement de nombreuses substances qui s'y retrouvent de façon constante et relativement stable. Globalement la propolis est constituée de : 50 à 55% de résines et baumes, 25 à 35% de cire, 10% d'huiles essentielles, 5% de pollen et 5% de matières organiques et minérales diverses. Jusqu'à présent, il a été identifié plus de 300 constituants dans différentes propolis mais les principaux sont de la classe des flavonoïdes de type

aglycone. Chimiquement, les aglycones de la propolis sont les flavones, flavonoles, flavonones et dihydroxyflavonoles [90].

La diversité d'éléments actifs et complémentaire que la propolis comporte, lui assure des propriétés thérapeutiques. L'étude des activités de la propolis a éveillé l'intérêt de nombreux chercheurs, l'ensemble des chercheurs montrent que la propolis a plusieurs activités à savoir : l'activité antioxydante, antibactérienne, antifongique, antivirale, hépatoprotective, pro-apoptotique et anti-tumoral [91]. C'est la présence des flavonoïdes essentiellement qui confère à la propolis toutes ces propriétés thérapeutiques [92].

II.3.3. La plante *Lepidium sativum*

Le genre *Lepidium* est constitué d'environ 175 espèces, largement distribuées à travers le monde, c'est l'un des genres les plus représentés de la famille des Brassicacées (appelés aussi Crucifères) qui ont été durant ces deux dernières décennies le centre de recherches intenses basées sur leurs bienfaits sur la santé humaine [93].

La plante *L. sativum* (cresson alénois) autrement connu comme cresson du jardin, est une herbe annuelle à croissance rapide [94]. Originaire de l'Orient, de l'Égypte jusqu'au Tibet, le cresson alénois était cultivé en Europe dès l'Antiquité [95]. Elle est très riche en plusieurs constituants, dont la teneur varie selon les conditions géographiques et climatiques, ainsi que les méthodes d'extraction. Le rendement d'huiles des graines de la plante *L. sativum* est de 23%. Cette huile est riche en acide gras (acides oléique, acide linoléique, acide palmitique, acide linoléique, acide stéarique et acide arachidique) [96].

Les principaux composés antioxydants du cresson sont les caroténoïdes dont le bêta-carotène, la lutéine et le zéaxanthine, et les flavonoïdes. Le cresson contient presque exclusivement des flavonoles, dont le kaempferol et la quercétine [97]. En outre, le cresson contient de grandes quantités de glucosinolates ; ces composés se retrouvent principalement dans les crucifères et sont biologiquement inactifs, mais lorsque l'aliment subit des dommages physiques, ils entrent en contact avec une enzyme présente dans la plante (la myrosinase) et se transforment alors en molécules actives, comme les isothiocyanates [98]. La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence des vitamines (A, B₂, B₆, B₉, K, et C). Moser et ses collaborateurs ont analysé les vitamines liposolubles de la plante *L. sativum* et ont pu identifier toutes les classes des

tocophérols dans l'huile [96]. Des travaux sur sa composition minérale ont rapporté que sa teneur en potassium, phosphore, manganèse, fer et le cuivre est importante [95].

La plante *L. sativum* possède des propriétés médicinales diverses, les feuilles de cette plante sont diurétiques et doucement stimulant. Les graines sont laxatives, diurétiques, toniques et adoucissantes. Une étude pharmacologique préliminaire sur des graines de la plante *L. sativum* a suggéré la présence d'une substance cardioactive douée d'une action probable par les adrénérgiques, et aussi préconisée comme stomachique et expectorante [99]. En outre, l'extrait aqueux des graines de la plante *L. sativum* possède une activité hypoglycémiant chez des rats diabétiques, et un effet anti-hypertensif chez les rats hypertendus [100 et 101]. Les propriétés antitussives et antiasthmatiques de la plante *L. sativum* sont bien reconnues depuis des siècles, elle est recommandée pour le traitement des maladies respiratoires [94]. La richesse de la plante *L. sativum* en isothiocyanates lui confère la capacité de limiter la progression du cancer [98]. En effet, la consommation d'aliments contenant des isothiocyanates a été associée à une diminution du risque du cancer du poumon, particulièrement chez les fumeurs [102]. De plus, des chercheurs ont démontré que les constituants de la plante *L. sativum* catalysent l'UDP glucuronosyltransférase, une enzyme qui joue un rôle clé dans la détoxification des amines hétérocycliques aromatiques, l'activation de cette enzyme pourrait être responsable de la réduction observée des effets génotoxiques et des lésions préneoplasiques [103].

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériel végétal et produits chimiques

Les graines de la plante *L. sativum* ont été procurées localement d'un spécialiste de plantes médicinales à Jijel, en Mars 2010, tandis que l'extrait de la propolis a été fourni gracieusement par le Professeur LAHOUEL Mesbah, Directeur du laboratoire de Toxicologie Moléculaire à l'Université de Jijel. La propolis a été récoltée durant l'été après la miellé, elle provient de l'Est Algérien, de la coopérative apicole de Kaous à Jijel. L'extraction des substances bioactives contenues dans la propolis a été réalisée dans l'éthanol et le méthanol. Cent grammes de propolis brute ont été coupés en petits morceaux puis additionnés de neuf volumes d'éthanol à 95 % puis laissée pour macération pendant 15 jours avec agitation de temps en temps. Après filtration, le filtrat a été évaporé à 79 °C. Le résidu a été repris dans le méthanol à 70 % et laisser à macération pendant une nuit. Après évaporation du solvant à l'évaporateur, l'extrait obtenu a été appelé extrait brut éthanolique de la propolis (EEP). Pa ailleurs, le CPF a été procuré sous forme liquide à une concentration de 480 g/L, auprès d'un spécialiste de protection des végétaux, tandis que le B(a)P est provenu de la société Sigma Aldrich.

III.2. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats femelles de race *Wistar Albinos*, dont le poids est compris entre 150 et 200 g, fournis par l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie). Tous les animaux sont de statut sanitaire EPOS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques). La stabulation des animaux se fait dans une animalerie périphérique dédiée aux rats et dont l'ambiance a été contrôlée (température 20-25 °C, photopériode de 12 heures/24) dans des cages rectangulaires fabriqués en matière plastique opaque. Comme le protocole ne s'est y oppose pas, la nourriture (croquettes provenant de la société de production des aliments pour animaux) et la boisson ont été servies « *ad libitum* ». Les animaux ont été répartis en huit lots selon le type de traitement.

III. 3. Préparation de l'extrait brut méthanolique des graines de la plante *L sativum*

L'extraction des substances bioactives contenues dans les graines de la plante *L. sativum* a été réalisée dans le méthanol selon la méthode de Brunton [104]. Les graines préalablement nettoyées et broyées, ont été mises à macérer dans un mélange méthanol/eau (7:3 V/V) à un rapport de 1/10 (P/V) pendant 48 heures à température ambiante. L'extrait hydro-alcoolique a été récupéré dans un premier temps après filtration du mélange sur papier filtre, le méthanol a été éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite à 45

°C dans un évaporateur rotatif (*Evaporator E100*). Permettant ainsi, d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui a été considéré comme étant l'extrait brut méthanolique (EBM) des graines de la plante *L. sativum*, ce dernier a été ensuite lyophilisé.

III.4. Analyse par CG/MS des extraits bruts de la propolis et des graines de la plante *L. sativum*

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) a été utilisée pour analyser les substances présentes dans les extraits bruts de la propolis et des graines de la plante *L. sativum*. Nous avons utilisé un chromatographe QP 210 de SHIMADZU, équipé d'un injecteur Split. Le gaz vecteur choisi a été l'hélium N55 dont le débit a été fixé à 0.7 ml/min. Une colonne capillaire SE 30 (25 m x 0.25 mm, épaisseur du film : 0.25 µm) a été utilisée. L'injection se fait en mode Split pendant 1 min. Un volume d'échantillon de 1 µl a été injecté manuellement à l'aide d'une micro-seringue. La température est programmée entre 100 et 310 °C à une vitesse de 5 °C/min selon le protocole de Bankova et al [105].

L'identification a été réalisée par comparaison des résultats (pics) avec la bibliothèque de spectres de masse NIST « *The National Institute of Standards and Technology* » comportant des références pour 147 198 molécules différentes. Cette banque de donnée fournit pour chaque spectre une liste de substances avec leur poids moléculaire, leur pic de base, leur pureté et leur fit (ajustement) pour le spectre. Nous avons choisi les fîtes les plus élevés révélateurs que la substance correspond le mieux au spectre de masse.

III.5. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de l'EBM des graines de la plante *L. sativum*

La teneur en polyphénols de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* a été estimée par la méthode de Li et al [106]. Brièvement, 1ml de réactif de Folin (10 fois dilué) a été ajouté à 200 µl d'échantillon (préparé dans le méthanol) avec dilutions convenables. Après 5 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) ont été additionnés au milieu réactionnel. Après 2 heures d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la densité optique (DO) a été mesurée à 765 nm. La concentration des polyphénols a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide

gallique et a été exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

Par ailleurs, la méthode de Bahorun et *al* [107] a été utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans l'extrait des graines de la plante *L. sativum*. A 1 ml d'échantillon, a été ajouté 1 ml de la solution d'AlCl₃ à 2 %. Après 10 minutes, la DO a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et a été exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

III.6. Estimation de l'activité anti-radicalaire de l'EBM des graines de la plante *L. sativum*

Pour étudier l'activité anti-radicalaire de l'EBM des graines de la plante *L. sativum*, nous avons opté pour la méthode de Mansouri et *al* [108] qui utilise le DPPH (diphényl picryl-hydrazyl) comme un radical libre stable. Brièvement, la solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 2.4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 25 µl de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* de différentes concentrations (25, 50, 75 et 100 µg/ml) ont été ajoutés à 975 µl de la solution de DPPH, le mélange a été laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH a été mesurée à 517 nm. L'activité anti-radicalaire est estimée selon l'équation suivante : % d'activité anti-radicalaire = [(DO contrôle - DO échantillon) / Abs contrôle] x 100

III.7. Animaux traités par les différentes substances employées

L'étude a été réalisée sur 28 rats *Wistar Albinos* femelles, dont le poids est compris entre 150 et 200 g. Deux modèles animaux d'intoxication ont été développés, en utilisant soit le B(a)P, soit le CPF. Nous avons aussi cherché à tester la présence d'effets protecteurs potentiels des extraits bruts de la propolis et des graines la plante *L. sativum* contre, respectivement, les méfaits du B(a)P et du CPF.

Quatre lots d'animaux de 3 rats chacun ont été utilisés pour la production du modèle animal intoxiqué par le B(a)P, le premier groupe a servi de contrôle ; ses animaux ont reçu 1ml d'huile d'olive. Les animaux du groupe 2 ont été traités par une dose unique du B(a)P solubilisé dans l'huile d'olive à 100 mg/kg du poids animal par voie intrapéritonéale. Les

animaux du groupe 3 ont été prétraités par une dose unique du B(a)P à 100 mg/kg du poids animal par voie intrapéritonéale et après 14 semaines les animaux ont été traités par l'EEP à 100 mg/kg du poids animal par voie orale pendant trois jours. Enfin, les animaux de groupe 4 ont été traités par l'EEP à 100 mg/kg du poids animal par voie orale, et ceci, pendant 3 jours. Les doses du B(a)P et de l'EEP ont été choisies selon le protocole de Gunning et *al* [109] et Lahouel et *al* [110] respectivement.

Les animaux du deuxième modèle ont été aussi répartis en quatre groupes. Le premier lot a reçu 1ml du DMSO (diméthyl sulfoxyde) à 0.5 % par voie orale chaque jour pendant 28 jours et représentait le lot témoin. Les animaux de groupe 2, ont reçu par gavage une dose quotidienne du CPF à 6.75 mg/kg du poids animal (1/20 DL₅₀) solubilisé dans le DMSO pendant 28 jours. Les animaux de groupe 3, ont reçu par gavage une dose quotidienne de 100 mg/kg du poids animal de l'EBM des graines de la plante *L. sativum*, trente minutes après, le CPF solubilisé dans 0.5 % du DMSO à une dose de 6.75 mg/kg du poids animal (1/20 DL₅₀) a été administré par gavage pendant 28 jours. Enfin, le dernier lot a reçu une dose quotidienne de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* à 100 mg/Kg du poids animal par voie orale, et ceci, pendant 28 jours. Les doses du CPF et de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* ont été choisies selon le protocole de Mansour et *al* [111] et Al-Yahya et *al* [112] respectivement.

A la fin des délais d'administration, les animaux ont été sacrifiés, le foie et le poumon ont été immédiatement prélevés et rincés par l'eau physiologique (le foie est prélevé à partir du premier et du deuxième modèle, tandis que le poumon est prélevé à partir du deuxième modèle). Un morceau du foie et du poumon ont été imprégnés dans une solution du formol à 10 % pour l'étude histologique, le reste a été stocké à -30 °C pour l'étude biochimique.

III.8. Préparation des fractions cytosoliques et dosage des protéines totales

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par Iqbal et *al* [113]. Pour cela, 1 g de tissu (foie ou poumon) a été coupé et homogénéisé avec 3 volumes du tampon phosphate (0.1 M pH 7.4) contenant du KCl à 1.17 % à l'aide du broyeur de *Dounce* (*Kontes, Glass company an ISO-9001 steered firm New Jersey USA*),

l'homogénat a été ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15 mn à 4 °C à l'aide d'une centrifugeuse *Bioblock Scientific 55702* pour séparer les débris nucléaires et le surnageant a été centrifugé à 9600 rpm à 4 °C pendant 30 min. Le surnageant ainsi obtenu a été utilisé comme source d'enzymes.

La concentration cytosolique des protéines a été évaluée par la méthode de Lowry et *al* [114]. A 1 ml de la fraction cytosolique a été ajouté 1 ml du réactif de Lowry, le mélange a été bien agité puis incubé à température ambiante pendant 15 min. Ensuite 3 ml de réactif Folin-ciocalteu dilué à 10 % ont été ajoutés au mélange précédent, ce dernier a été incubé à température ambiante à l'obscurité pendant 45 min. La DO a été mesurée à 750 nm. Dans les mêmes conditions, une gamme étalon a été établie, en utilisant le sérum albumine bovine (BSA).

III.9. Dosage des taux cytosoliques du MDA et du GSH

Le taux du MDA a été évalué par la méthode de d'Okhawa et *al* [115]. Nous avons homogénéisé 1g de tissu (foie ou poumon) avec 3 volumes de solution KCL 1.15 M, par un broyeur de *Dounce*. A 0.5 ml de l'homogénat, nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20 % et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67 %. Le mélange a été chauffé à 100 °C pendant 15 min, refroidi puis additionné de 4 ml de n-butanol. Ensuite, le mélange obtenu a été centrifugé pendant 15 min à 3000 rpm/min à l'aide d'une centrifugeuse *Bioblock Scientific 55702*, la DO de surnageant à 530 nm a été déterminée. Le taux du MDA a été déduit à partir d'une droite d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions que les échantillons avec de 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane. La concentration en MDA a été exprimée en nmole/g de tissu.

Pour le dosage du GSH, nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman [116] qui est basée sur le réactif DTNB (acide 5, 5-dithiobis 2-nitrobenzoïque). Pour cela, 1 g de tissu (foie ou poumon) ont été coupés et homogénéisés avec 3 volumes de TCA 5 % à l'aide d'un broyeur de *Dounce* puis centrifugé à 2000 rpm en utilisant une centrifugeuse *Bioblock Scientific 55702*. Ensuite, 50 µl de surnageant ont été dilués dans 10 ml de tampon phosphate 0.1 M pH 8. A 3 ml du mélange de dilution, nous avons additionné 20 µl de DTNB 0.01 M. Après 15 min d'incubation la lecture de la DO a été effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA 5 %. Le taux du GSH

a été déduit à partir d'une gamme étalon du GSH préparé dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations ont été exprimées en mmoles/g de tissu.

III.10. Mesure des activités cytosoliques de GGT, de la GST et de CAT

L'activité de GGT a été déterminée selon la méthode décrite par Meister et *al* [117]. 1 g de tissu (foie ou poumon) a été homogénéisé avec 3 volumes du tampon Tris MgCl₂ (Tris 0.1 M, MgCl₂ 20 mM pH 9), l'homogénat obtenu a été centrifugé à 4000 rpm pendant 15 min en utilisant une centrifugeuse *Bioblock Scientific 55702*. Ensuite, 50 µl de surnageant a été incubé pendant 30 min à 25 °C en présence de 200 µl de substrat (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). La DO a été lue par spectrophotomètre à 405 nm. L'activité enzymatique a été exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante :

$$\text{GGT en UI/g de protéines} = [(\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{contrôle}}) \times 0.0602 \times V_{\text{échantillon}}] / \text{g de protéines}$$

Par ailleurs, l'activité de la GST a été évaluée selon la méthode de Habig et *al* [118]. Un mélange de 850 µl de tampon phosphate 0.1 M pH 6.5 et de 50 µl du chlorodinitrobenzène (CDNB) 20 mM a été préparé et incubé à 37 °C pendant 10 min. La réaction a été déclenchée par l'addition à ce mélange de 50 µl d'une solution de glutathion 20 mM et 50 µl de la fraction cytosolique. La DO a été mesurée à 340 nm toutes les minutes pendant 5 min. Les résultats de l'analyse ont été calculés selon la formule ci-dessous, ils ont été exprimés en UI/g de protéines.

$$\text{GST en UI/g de protéines} = [(\text{DO}_{\text{échantillon}} - \text{DO}_{\text{contrôle}}) \times 100 / (9.6 \times 0.05)] / \text{g de protéines}$$

Parallèlement, l'activité de CAT a été déterminée, en adoptant la méthode de Clairborne [119]. En bref, un mélange réactionnel a été formé de 1 ml du tampon phosphate (0.1 M pH 7.2), 950 µl de H₂O₂ 0.019 M, et 25 µl de la source enzymatique. La lecture de la DO a été effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique a été exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante :

$$K = 2.3 / \Delta t \cdot \log_{10} (\text{DO}_0 / \text{DO}_t) / \text{g de protéines} \quad (\text{Sachant que : } \text{DO}_0 : \text{DO au temps } 0 ; \text{DO}_t : \text{DO après } 1 \text{ mn} ; \Delta t : \text{Intervalle de temps en mn}).$$

III.11. Etude histologique

La fixation des organes a été réalisée immédiatement après prélèvement des organes à température ambiante dans le formol à 10 %. Les organes ont été ensuite déshydratés dans des bains successifs de 20 min chacun dans l'éthanol 70°, l'éthanol 90°, l'éthanol absolu, puis deux bains de xylène. Enfin l'organe a été prêt pour son inclusion dans la paraffine.

Chaque bloc de paraffine a été débité à l'aide d'un microtome en coupes de 5 µm d'épaisseur. Chaque coupe a été délicatement déposée dans un bain-marie à 50 °C et récupérée sur une lame. Les lames ont été ensuite placées à l'étuve à 60 °C pendant une heure afin de faire fondre la paraffine. Le surplus de paraffine a été enlevé en trempant les lames dans deux bains successifs de 15 min chacun dans le xylène suivi de deux autres bains de même durée dans l'éthanol absolu. Les coupes ont été réhydratées, en les plongeant dans des bains successifs d'éthanol 95°, deux bains d'éthanol 70° et un bain d'eau distillée.

Une fois que les coupes ont été déparaffinées, elles ont été trempées dans un bain d'hématoxyline pendant 30 secondes. Les éléments basophiles de tissu vont alors prendre une coloration rouge-violette. Les lames ont été rincées dans deux bacs d'eau de robinet successifs puis trempées et agitées 2 à 3 fois dans un bain contenant 1 % d'acide chlorhydrique 32 % et 99 %, ensuite d'éthanol 96 %. Les lames ont été encore rincées avec de l'eau puis trempées dans une solution d'eau ammoniacale à 0.25 % jusqu'à obtention d'une couleur bleue (coloration violette des noyaux). Les lames ont été rincées puis disposées dans un bain d'éosine pour colorer les éléments acidophiles du tissu. Après un rinçage, les lames ont été trempées dans trois bains successifs d'éthanol 100 % (décoloration) puis passées rapidement dans un bain de toluène. Les lames ont été ensuite scellées avec une lamelle à l'aide d'une colle EUKITT et conservée dans des boîtes à températures ambiante jusqu'à l'analyse sous microscopes [120].

III.12. Analyse statistique

Les résultats ont été donnés sous forme de moyennes et écart-types. La différence entre les moyennes des témoins et des groupes traités par le B(a)P ou le CPF a été déterminée par le test de student, et par l'analyse de variance à un facteur ANOVA (*one-way analysis of variance*) par le logiciel SPSS 13.0 pour la comparaison entre les différents groupes lors de l'évaluation de l'effet préventif des extraits bruts alcooliques de la propolis et de la plante *L sativum*. Toutes les analyses ont été réalisées au seuil de signification de 5 %. La

valeur trouvée par le calcul peut affirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que : différence non significative : NS ; différence significative : $p < 0.05$ (*); différence très significative : $p < 0.01$ (**) et différence hautement significative : $p < 0.001$ (***) .

IV. Résultats et discussion

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

IV.1.1. Mise en évidence des altérations histologiques hépatiques

L'étude histologique a pour but de vérifier l'existence des différences dans l'architecture du foie. Elle a été faite sur des fragments isolés du foie de rats témoins non traités et des rats ayant reçus une dose unique du B(a)P à 100 mg/kg du poids animal par voie intrapéritonéale en procédant à une coloration d'hématoxyline éosine qui permet d'apprécier l'état basal d'un tissu. Observées au microscope optique (Gx100), les coupes des foies des rats témoins montrent l'organisation histologique d'un foie normal (Figure 5A). Le lot pathologique traité par le B(a)P (figure 5B), présente des nécroses à petit foyer, qui s'accompagne d'un filtrat inflammatoire (figure 5B, I), dû à la libération du contenu cellulaire y compris les cytokines, spécifique au phénomène inflammatoire. Lin et Yang ont montré que le B(a)P cause la mort des cellules HepG2 par nécrose suite à une activation de PARP1 (*poly ADP-ribose polymérase 1*) et l'épuisement de NAD^+ qui conduit à une inhibition de la glycolyse et la production d'ATP [121]. La PARAP1 est une enzyme nucléaire qui participe dans la nécrose et l'apoptose [122 et 123]. Nous avons observé aussi des modifications cytoplasmiques, des infiltrations des cellules polynucléaires, une perte d'architecture et des septas fibreuses et inflammatoires (figure 5B, F).

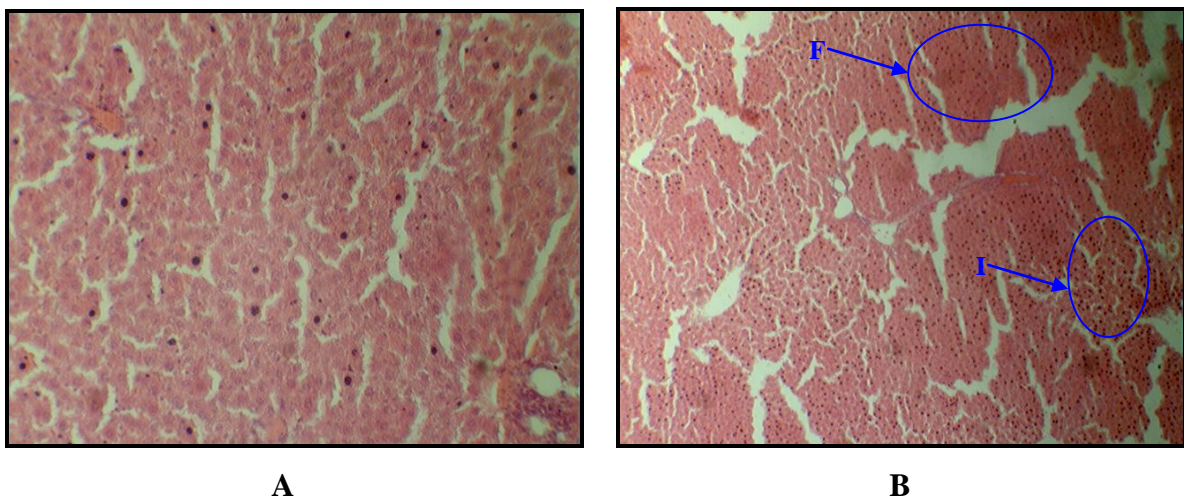


Figure 5. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus hépatiques traités par le B(a)P. Les coupes histologiques ont été obtenues à partir des rats traités ou non par le B(a)P et observées par microscope optique (Gx100), après coloration par hématoxyline éosine, selon, le protocole de Martoja et Martoja [120]. A : rats témoins non traités montrant une architecture hépatique normale. B : rats traités par une dose unique de 100 mg/Kg du B(a)P par voie intrapéritonéale montrant une infiltration inflammatoire (I), des septas fibreuses et inflammatoires (F).

IV.1.2. Evaluation du stress oxydatif hépatique

L'objectif de cette partie du travail est d'évaluer le stress oxydatif au niveau du foie après traitement des rats par le B(a)P avec une dose unique de 100 mg/Kg du poids animal par voie intrapéritonéale parce que le foie est le lieu du métabolisme des xénobiotiques et que le stress oxydatif induit par le B(a)P dans le foie n'est pas bien étudié. Afin d'étudier le stress oxydatif engendré par le B(a)P, nous avons mesuré les taux du MDA et du GSH et nous avons aussi évalué les activités de GGT, de la GST, et de CAT.

Les dégâts cellulaires provoqués par le B(a)P sur les macromolécules biologiques ont été quantifiés à travers la mesure des lipides oxydés. Il existe de nombreux marqueurs de la peroxydation lipidique dont le MDA qui est sans doute le représentant de la peroxydation lipidique le plus connus et le plus utilisé. Ce dernier perturbe la fluidité membranaire, rend la membrane plus perméable, modifiant ainsi les hémostasies chimiques et redox cellulaires [124].

La quantification du taux du MDA est généralement acceptée comme indicateur de stress oxydatif résultant d'une surproduction des ROS et d'une diminution des défenses antioxydantes [125]. Le taux du MDA a été mesuré par le test de TBARS (*Thiobarbituric Reactive Species*). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et à chaud (100 °C) entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol. La réaction mesure non seulement le MDA préexistant, mais aussi le MDA formé de manière artefactuelle par décomposition thermique des peroxydes, et ceux générés au cours de la réaction. Le résultat du dosage du MDA par le TBA est donc la somme du MDA préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidique, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du MDA, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du MDA s'est substituée la notion de TBARS. Cette technique est assez controversée puisque de nombreuses revues soulignent l'hétérogénéité des résultats obtenus, s'appuyant sur le fait que le MDA n'est pas le seul composé qui peut réagir avec le TBA car d'autres aldéhydes (formaldéhyde, acétaldéhyde) et d'autres substances non lipidiques comme les protéines peuvent réagir avec le TBA [126].

Une nouvelle méthode a été proposée en 2001, pour effectuer un dosage du MDA réellement produit par le B(a)P. Cette méthode est fondée sur la dérivation du MDA, en milieu acide à 37 °C, par du diaminonaphtalène pour former un composé diazepinium. Ce diazepinium est quantifié par chromatographie liquide haute performance couplée à une spectrométrie de masse (HPLC/MS). La mesure du MDA est très spécifique car le dérivé formé possède un spectre avec maximum d'absorption à 311 nm alors que les autres aldéhydes ont un maximum à 235 nm. Cette méthode mesure spécifiquement le MDA et permet d'éviter les interactions avec les protéines [127].

Nos résultats montrent une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux du MDA chez les rats traités par le B(a)P par rapport aux rats témoins. Ces valeurs respectives : 18.18 ± 2.49 nmole/g et 9.89 ± 3.20 nmole/g de foie (figure 6A). Une telle hyperperoxydation pourrait être le résultat d'une modification importante du statut redox cellulaire dans le foie en faveur des prooxydants, car le B(a)P s'est avéré générateur des radicaux libres qui par leur pouvoir oxydant, sont à l'origine de l'oxydation de l'ADN, de lipides et des protéines. Cela est en accord avec les résultats de Kamaraj et ses collaborateurs qui ont trouvé une augmentation du taux de MDA dans le poumon des rats traité par le B(a)p [5].

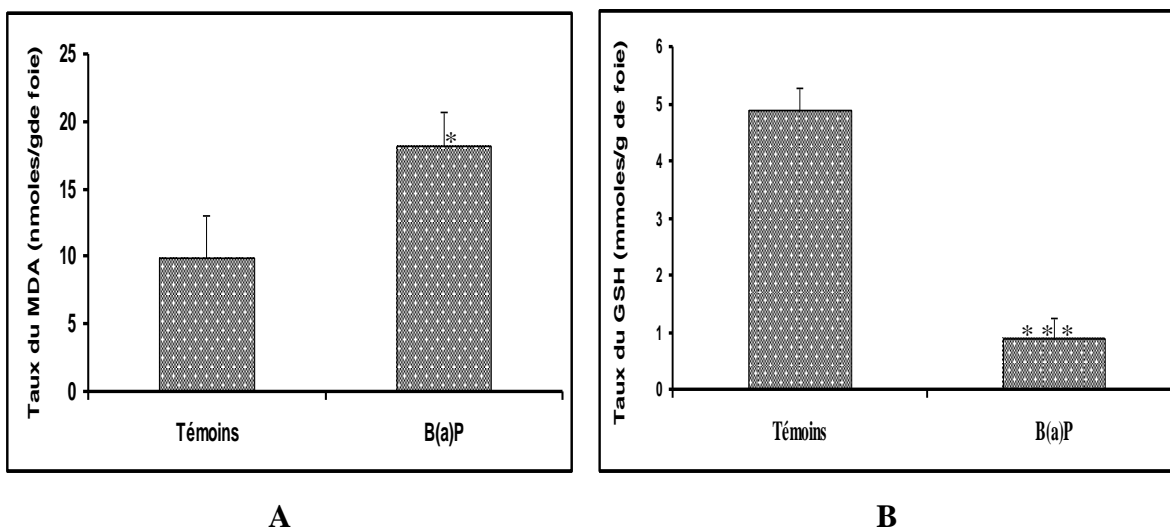


Figure 6. Effets du B(a)P sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatiques. Les taux ont été mesurés à partir des tissus hépatiques provenant des rats traités ou non par le B(a)P, selon, les méthodes d'Okhawa et al [115] et d'Ellman [116]. A : effet sur le MDA ; B : effet sur le GSH. Témoins : rats non traités ; B(a)P : rats traités par une dose unique de 100 mg/Kg du B(a)P par voie intrapéritonéale. * : différence significative ; *** : différence hautement significative.

Nous avons aussi remarqué une diminution hautement significative du taux du GSH ($p < 0.001$) chez les rats recevant le B(a)P (0.91 ± 0.35 mmole/g de foie) par rapport aux rats témoins (4.91 ± 0.36 mmole/g de foie) (figure 6B). La concentration intracellulaire en GSH est considérée par certains auteurs comme un véritable marqueur de l'état de santé d'un individu. Ce peptide, est l'un des systèmes les plus puissants intervenant dans la détoxification des ROS, en réduisant à la fois le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes lipidique [128].

Le glutathion, est un tripeptide synthétisé par toutes les cellules de l'organisme ; le foie reste la source principale [129]. Il existe sous deux formes chimiques, la forme oxydée (GSSG) et la forme réduite (GSH) qui représente 98 à 99% du glutathion total. La fonction sulfhydryle (-SH) est à l'origine de sa grande réactivité et de son pouvoir réducteur puissant. Le GSH permet la détoxification de certains xénobiotiques électrophiles et l'inactivation des composés oxygénés réactifs [124]. Il joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles que la GPx, la CAT et la SOD [130].

Lors du traitement des rats par le B(a)P, le taux du GSH est nettement diminués suite à son action de neutralisation des radicaux libres, générés par le B(a)P, ce phénomène aussi provoque sa déplétion et facilite la peroxydation des lipides et l'oxydation des protéines. Par ailleurs, le GSH sert également de substrat pour la GST qui catalyse sa conjugaison avec le B(a)p, participant ainsi à la détoxification de ce dernier. Lin et Yang ont observé une augmentation du taux du GSH après traitement des cellules HepG₂ par le B(a)P pendant 24 heures, cela veut dire que le GSH participe à la détoxification du B(a)P, et il est aussi impliqué dans la régulation redox du cycle cellulaire [131].

Nous avons également apprécié l'effet du B(a)P sur l'activité du GGT (figure 7). Le traitement des rats par le B(a)p a conduit à une augmentation non significative de l'activité du GGT avec une valeur de 1273.66 ± 603.21 UI/g de protéines par rapport au groupe témoin 745.33 ± 225.71 UI/g de protéines. La GGT est une glycoprotéine principalement trouvée dans les membranes des cellules. Cette enzyme est moins solidement ancrée dans la membrane, donc sa libération se fait plus facilement. La GGT catalyse le transfert de gamma glutamyl provenant du glutathion, à un acide aminé, ou bien à une molécule d'eau. Elle participe ainsi dans le transfert des acides aminés et la détoxification cellulaire [132].

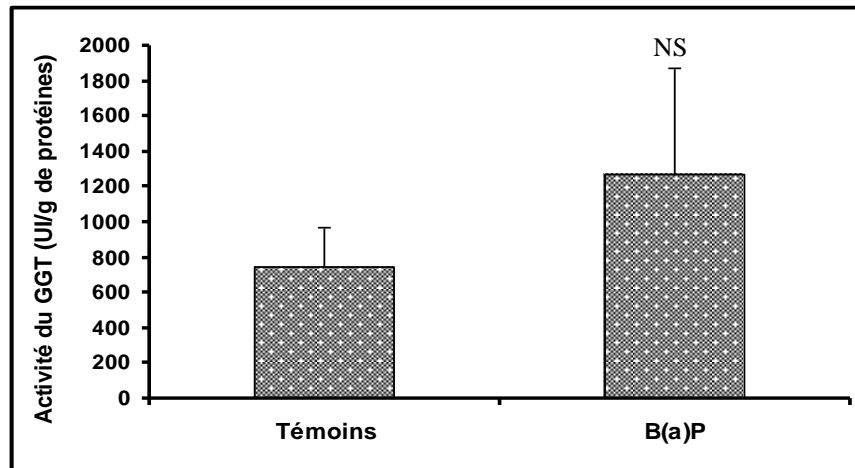


Figure 7. Effet du B(a)P sur l'activité cytosolique de GGT dans les tissus hépatiques. L'activité de GGT a été mesurée à partir des fractions cytosoliques provenant des rats traités ou non par le B(a)P, selon la méthode de Meister et al [117]. Témoins : rats non traités ; B(a)P : rats traités par une dose unique de 100 mg/Kg du B(a)P par voie intrapéritonéale. NS : différence non significative.

L'augmentation de l'activité de GGT est due probablement à l'utilisation du GSH extracellulaire qui neutralise les radicaux libres formés, parce que nous avons déjà indiqué que le taux du GSH intracellulaire est diminué après le traitement par le B(a)P. La GGT catalyse la première étape dans la dégradation du GSH extracellulaire, elle hydrolyse la liaison gamma glutamyl entre le glutamate et la cystéine. Dans ce processus, la GGT libère le cystéinylglycine, qui va ensuite se dégrader en cystéine et glycine par une dipeptidase de la membrane plasmique. La cystéine résultante de la dégradation du GSH extracellulaire par la GGT est essentielle pour la synthèse de nouvelles molécules du GSH intracellulaire [132].

Plusieurs études ont été consacrées pour montrer la relation entre l'activité de GGT et le niveau cellulaire du GSH. Rajpert-De Meyts et ses collaborateurs ont étudié le rôle de la GGT dans l'utilisation cellulaire du GSH ; en utilisant des fibroblastes NIH-3T3 qui ont la capacité de la surexpression de GGT [133]. Après l'exposition aux agents épuisants le GSH, ils ont trouvé que ces cellules pouvaient utiliser le GSH extracellulaire beaucoup plus efficacement que les cellules témoins, car, le GSH extracellulaire était suffisant pour soutenir le niveau intracellulaire du GSH, et la reconstitution du GSH épuisé s'est produite plus rapidement [134]. Un certain nombre de travaux ont ainsi analysé la contribution de GGT dans l'utilisation de GSH extracellulaire lors la protection contre le stress oxydatif.

Shi et ses collaborateurs ont observé que l'administration exogène du GSH aux cellules de fibroblaste NIH-3T3 pourrait aider à maintenir le GSH intracellulaire, de ce fait empêchant les dommages provoqués par le H_2O_2 , l'effet protecteur a été perdu après inhibition de GGT [135]. En accord avec ces observations, un stress oxydatif induit par les quinones a conduit à une augmentation rapide de niveau d'ARN_m de GGT dans les cellules épithéliales de poumon de rat. Stark et ses collaborateurs ont proposé un effet paradoxal de GGT, ils ont montré que la dégradation du GSH par la GGT est capable de jouer un rôle pro-oxydant suggérant que la formation de cystéinyglycine qui est un thiol très réactif a pu causer la réduction de fer ferrique (Fe^{+3}) à (Fe^{+2}) avec la production des ROS [136].

D'autre part, l'effet du B(a)P sur l'activité de la GST et de CAT a été évalué et illustré dans la figure 8. La GST est une protéine soluble localisée dans le cytosol et le réticulum endoplasmique, elle catalyse la conjugaison du GSH avec de nombreux xénobiotiques et leurs métabolites réactifs, pour former des métabolites plus hydrosolubles, elle joue donc, un rôle très important dans le processus de détoxification [137]. Le traitement des rats par le B(a)P a conduit à une diminution significative dans l'activité de la GST qui atteint 245.33 ± 68.33 UI/g chez les rats traités par le B(a)P contre 430.66 ± 26.57 UI/g de protéines chez les rats témoins non traités (figure 8A).

La diminution de l'activité de la GST, comme nous avons constaté est imputable à la formation, au cours du métabolisme oxydatif, de produits réactifs qui sont des substrats pour la GST. Une baisse du taux de GSH et de l'activité de la GST entraînent une baisse des capacités de détoxification dans le foie, ce qui a pour conséquence une accumulation cellulaire des radicaux libres oxygénés, de produits de la peroxydation et des produits dérivés du métabolisme du B(a)P. Cette accumulation d'agents cytotoxiques va exacerber les dommages cellulaires et augmenter l'instabilité génétique par l'augmentation des dommages d'ADN et des protéines régulatrices du cycle cellulaires (p53).

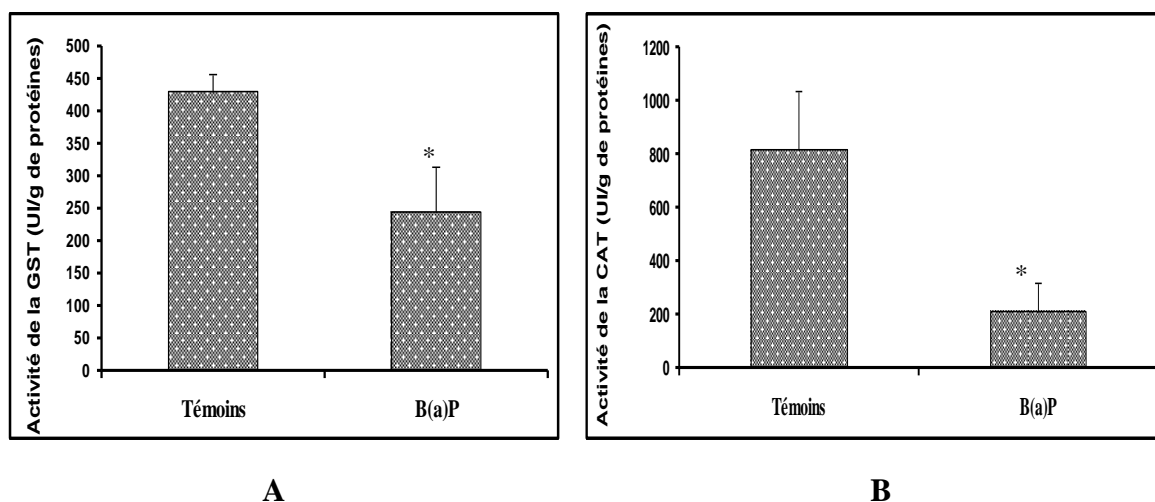


Figure 8. Effets du B(a)P sur les activités cytosoliques de la GST et de CAT dans les tissus hépatiques. Les activités ont été mesurées à partir des fractions cytosoliques provenant des rats traités ou non par le B(a)P, selon, les méthodes de Habig et al [118] et de Clairborne [119]. A : effet sur la GST ; B : effet sur la CAT. Témoins : rats non traités ; B(a)P : rats traités par une dose unique de 100 mg/Kg du B(a)P par voie intrapéritonéale. * : différence significative.

Parallèlement, le traitement par le B(a)P a conduit à une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité de CAT qui atteint 212.66 ± 105.62 UI/ g de protéines contre 817 ± 218.13 UI/g chez les rats témoins non traités (figure 8B). La CAT est une enzyme majoritairement peroxysomale, en particulier, dans les hépatocytes et les érythrocytes, elle catalyse la dismutation du H_2O_2 en eau et oxygène moléculaire [138]. Elle est formée de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés, comportant chacune un groupe hémique avec un atome de fer. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O de H_2O_2 , créant de ce fait une molécule d'eau et un groupement hautement oxydant qui peut ensuite oxyder une autre molécule de H_2O_2 pour donner du dioxygène et de l'eau. La baisse de l'activité de CAT pourrait être attribuée à la consommation de cette enzyme suite à la production excessive de H_2O_2 dans les cellules traitées par le B(a)P [139]. Cependant, la plupart des auteurs penchent pour l'hypothèse selon laquelle la diminution de l'activité de CAT serait due à une augmentation de la peroxydation lipidique [140].

Par ailleurs, il est intéressant de supposer que la diminution des activités de la GST et de CAT est due probablement à une inhibition du facteur Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) par la protéine p53. Le Nrf2 est un facteur de transcription qui active l'élément de réponse antioxydante ARE (*Antioxidant Response Element*) pour renforcer le

système antioxydant piègeur des radicaux libres. Dans les conditions normales (absence de stress oxydatif), ce facteur se retrouve lié à une protéine cytoplasmique Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) conduisant à sa désactivation et ensuite à sa dégradation. Lors de l'exposition aux facteurs de stress oxydatif, Keap1 subit un changement conformationnel libérant Nrf2, ensuite ce dernier va se transloquer vers le noyau. Deux mécanismes indépendants ont été impliqués dans le processus de dissociation; Keap1 contient des cystéines réactives (C273 et C288) qui forme des liaisons disulfures intermoléculaires lors de l'exposition à un stress oxydatif. En outre, la dissociation du complexe Nrf2-Keap1 se fait par la phosphorylation de Nrf2 par la protéine Kinase C (PKC), activée lors de la libération du calcium induit par les ROS. L'activation de Nrf2 a comme conséquence l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la détoxification des xénobiotiques et la réponse antioxydante [141].

Faraonio et ses collaborateurs ont trouvé que l'activation des antioxydants par Nrf2 est supprimée par p53 ; par l'interaction directe de p53 avec une séquence spécifique « ARE » située dans les régions promotrices des gènes codant pour les antioxydants. Considérant que l'apoptose induite par p53 exige une accumulation des ROS, cette désactivation de Nrf2 semble être visée pour empêcher la génération d'un environnement intracellulaire antioxydant fort qui pourrait gêner l'induction de l'apoptose [142]. Xin Hai et ses collaborateurs ont montré que le B(a)P active le gène de p53 par l'induction de NF- κ B (*facteur nucléaire kappa B*) [34]. Le NF- κ B est un facteur de transcription qui occupe une place centrale dans la régulation de la réponse inflammatoire et immune, en induisant l'expression de différents gènes dont ceux codant pour de nombreuses cytokines, des récepteurs intervenant dans la reconnaissance immune, des protéines impliquées dans la présentation des antigènes et des récepteurs nécessaires pour l'adhésion et la migration des neutrophiles ; il intervient également dans la survie des lymphocytes B [143].

Les ROS sont censés d'être impliqués dans l'activation de NF κ B sur la base de la capacité des oxydants à activer NF κ B par l'oxydation de certains de ses groupements thiols par l'intermédiaire de TNF et IL-1. En effet il a été démontré que la suppression de TNF et IL-1 provoque la diminution du niveau de NF κ B actif [144]. L'importance des ROS dans l'activation de NF κ B est encore soutenue par des études démontrant que l'activation de NF κ B par la majorité des stimuli peut être bloquée par les antioxydants possédant des groupements thiols (comme les polyphénols de thé vert et la vitamine E), bien que ceci

pourrait être pas très spécifique parce que les antioxydants ont des cibles multiples. De même l'activité de NF κ B a été diminuée dans les cellules qui ont une surexpression de la catalase [145].

IV.2. Caractérisation des toxicités hépatopulmonaires induites par le chlorpyrifos

IV.2.1. Mise en évidence des altérations histologiques hépatopulmonaires

Les résultats des coupes histologiques des foies des rats ayant reçu le CPF avec une dose de 6.75 mg/Kg par voie orale quotidiennement pendant 28 jours (figure 9) montrent des modifications cytoplasmiques (figure 9B, FC), ainsi que la présence de quelques foyers de nécrose, cette nécrose est accompagnée d'une congestion et d'une vasodilatation hépatocyttaire aigue (les espaces portes et les veines centro-lobulaires sont dilatés par la dégénération des hépatocytes environnants). De plus, des infiltrations inflammatoires, ainsi qu'une prolifération des cellules de Kupffer ont été détectées entre les hépatocytes dégénérés.

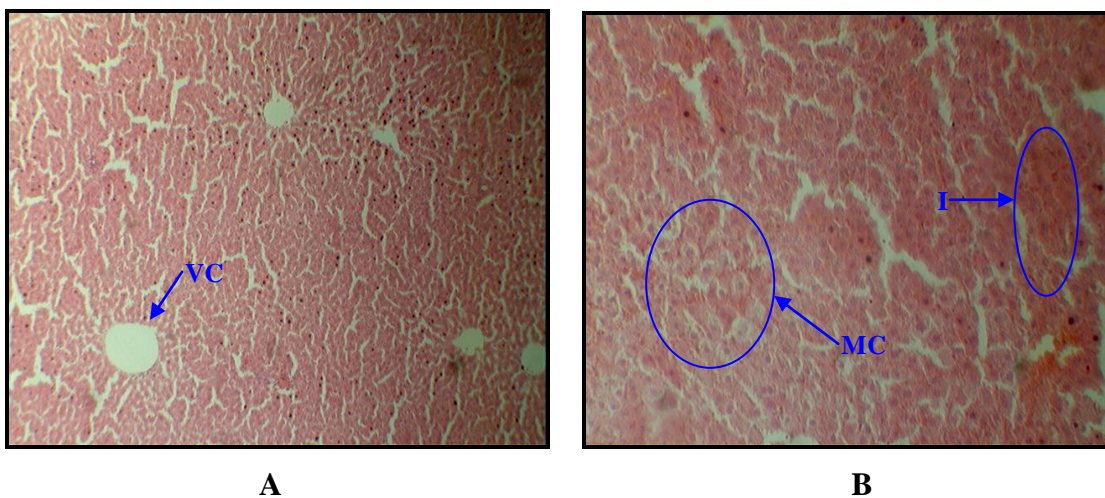


Figure 9. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus hépatiques traités par le CPF. Les coupes histologiques ont été obtenues à partir des foies des rats traités ou non par le CPF et observées par microscope optique (Gx100), après coloration par hématoxyline éosine, selon le protocole de Martoja et Martoja [120]. A : rats témoins non traités montrant une architecture normale avec la veine centrale (VC) ; B : rats traités par le CPF montrant une modification cytosolique (MC), inflammation (I).

Concernant le poumon (figure 10), nous avons observé des structures normales typiques d'alvéoles dans le groupe témoin (figure 10A). En revanche, dans le groupe traité

par le CPF (figure 10), nous avons observé que les septas sont élargies de façon homogène par la fibrose et l'inflammation, ainsi que des infiltrations des cellules mononucléaires. De plus, nous avons constaté la présence des zones hémorragiques, des changements emphysémateux (figure 10B, E), de desquamation de la bordure épithéliale de la bronchiole terminale (figure 10B, D), et d'un tissu conjonctif épaisi et accru dans les septas alvéolaires.

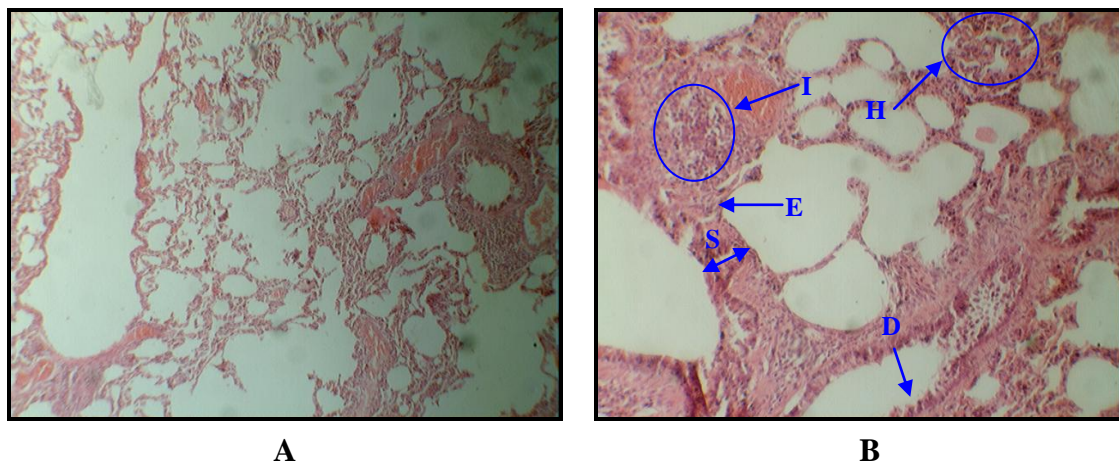


Figure 10. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus pulmonaires traités par le CPF. Les coupes histologiques ont été obtenues à partir des poumons des rats traités ou non par le CPF et observées par microscope optique (Gx100), après coloration par hématoxyline éosine, selon le protocole de Martoja et Martoja [120]. A : rats témoins non traités ; B : rats traités par le CPF montrant une desquamation de la bordure épithéliale (D), hémorragie (H), changements emphysémateux (E), infiltration des cellules mononucléaires (I) et épaississement des septas interalvéolaires (S).

IV.2.2. Evaluation du stress oxydatif hépatopulmonaire

La présente étude a été conduite pour évaluer le stress oxydatif au niveau du foie et des poumons, après traitement des rats par le CPF avec une dose de 6.75 mg/Kg par voie orale quotidiennement pendant 28 jours. L'étude a été réalisée dans le foie et le poumon, puisque ces dernières années, de nombreux chercheurs se sont intéressés seulement à la toxicité neurologique du CPF et il est dommageable de constater qu'une large partie des études traitant les effets neurologiques de CPF a été réalisée à des concentrations très importantes.

L'effet du CPF sur le foie et le poumon a été évalué d'une part par la mesure des taux cytosoliques du MDA et du GSH (figure 11). Comparés aux rats témoins, les rats traités

par le CPF montraient une augmentation statistiquement significative du taux du MDA dans le foie et le poumon, qui a atteint, respectivement les valeurs de 16.68 ± 6.27 et 8.13 ± 3.07 nmole/g de tissu chez les rats traités contre les valeurs de 2.55 ± 0.40 et 1.55 ± 1.23 nmole/g de tissu chez les rats témoins, respectivement (figure 11A). Ce résultat est en accord avec les résultats d'autres études qui ont mis en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique après traitement par le CPF. Zama et ses collaborateurs ont montré que le taux du MDA dans le foie des rats augmente de façon significative après l'administration du CPF [146]. Cette observation est corroborée par les travaux d'autres auteurs [147, 148]. D'autre part, Gokce Uzun et ses collaborateurs ont observé une augmentation significative du taux du MDA dans le poumon des rats après traitement par le CPF [149].

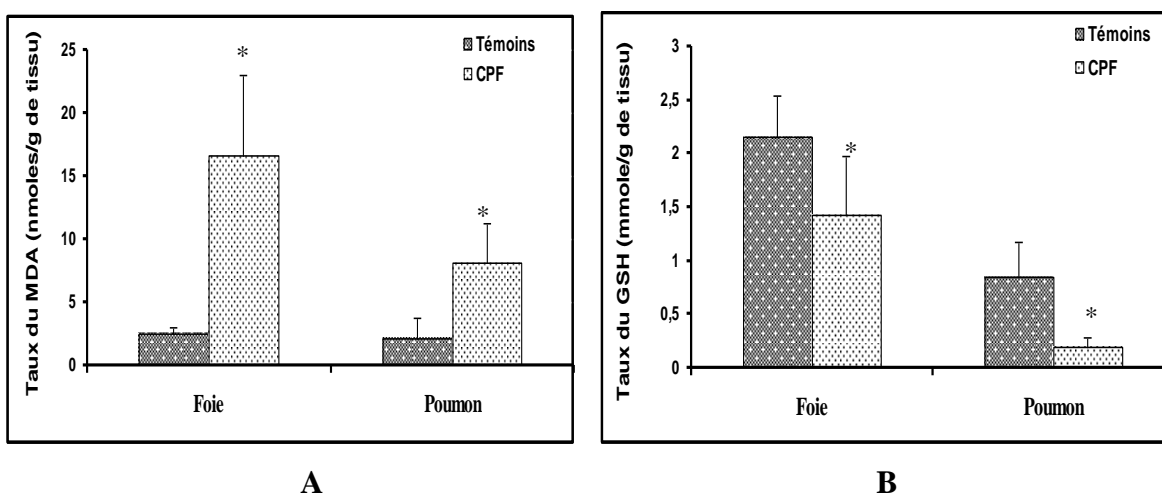


Figure 11. Effets du CPF sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatopulmonaires traités par le CPF. Les taux ont été mesurés à partir des tissus hépatopulmonaires provenant des rats traités ou non par le CPF, selon les méthodes d'Okhawa et al [115] et d'Ellman [116]. A : effet sur le MDA ; B : effet sur le GSH. Témoins : rats non traités ; CPF : rats traités par une dose de 6.75 mg/Kg du CPF par voie orale quotidiennement pendant 28 jours. * : différence significative.

La peroxydation lipidique a été suggérée en tant qu'un des mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité induite par les pesticides organophosphorés. Elle a été employée comme une mesure de stress oxydatif induit par ces xénobiotiques [111]. Dans notre travail, le taux du MDA dans le foie et les poumons des rats traités par le CPF est significativement élevé par rapport aux rats témoins non traités. Goel et ses collaborateurs ont observé une dépression significative dans l'activité de NADPH cytochrome c réductase

et NADH cytochrome c réductase après traitement par le CPF, et ont suggéré que le soufre ait libéré pendant la désulfuration oxydative du CPF en CPO et peut se lier, pas seulement, au cyp 450, mais également au NADH cytochrome c réductase aboutissant à l'inactivation de ce monooxygénase [150]. Alternativement, la NADPH cytochrome c réductase est aussi impliquée dans l'initiation du processus de peroxydation lipidique NADPH dépendante dans les membranes microsomales, et l'augmentation de la peroxydation lipidique en raison de l'intoxication par le CPF peut également être la cause de l'activité enzymatique diminuée [151]. D'autre part, Goel et ses collaborateurs ont signalé que le CPF a causé une diminution significative du zinc, l'insuffisance du zinc par elle-même a pu augmenter la peroxydation lipidique. Ceux-ci suggèrent indirectement une plus grande production des radicaux libres chez les rats traités par le CPF, particulièrement les radicaux d'hydroxyle, qui agissent sur les acides gras insaturés des phospholipides membranaires pour produire le MDA [152].

Mehta et ses collaborateurs ont rapporté que les rats traités par le CPF montraient un stress oxydatif, avec une augmentation du niveau de H_2O_2 [11]. Le H_2O_2 est l'un des ROS le plus généralement mesuré en raison de sa plus grande stabilité. Les pesticides sont connus pour augmenter la production des ROS conduisant à un stress oxydatif [153]. Les ROS et le MDA sont impliqués dans la promotion et la progression de la carcinogenèse, leur augmentation peut conduire à des dommages cellulaires et moléculaires menant à des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs ou les gènes codant des enzymes antioxydants. La peroxydation lipidique est bien connue comme étant un facteur causant l'apoptose par l'intermédiaire de p53 [154].

Parallèlement, le traitement des rats par le CPF pendant 28 jours a conduit à une diminution significative du taux du GSH dans le foie comme dans le poumon, atteignant respectivement, les valeurs de 1.43 ± 0.55 et 0.20 ± 0.086 mmole/g chez les rats traités comparativement au 2.15 ± 0.39 et 0.85 ± 0.32 mmole/g chez les rats témoins (figure 11B). Nous suggérons que cet épuisement du GSH pourrait être responsable de l'augmentation de la peroxydation lipidique. Le GSH est la clé de la défense cellulaire antioxydante, et agit en tant que cofacteur essentiel pour les enzymes antioxydantes comme la GPx [155]. Dans cette étude, l'augmentation observée de la peroxydation lipidique et l'épuisement concomitant dans le taux du GSH, suggère que la peroxydation lipidique pourrait être une conséquence de la diminution de réserve cellulaire en GSH. Grâce à la fonction thiol de la

cystéine, le GSH est un composé important pour le maintien de l'état réduit de la cellule. Selon plusieurs auteurs, la conjugaison du GSH à des pesticides ou aux métabolites *in vivo* pourrait être la voie majeure de leur détoxification [156]. Nous supposons donc que le GSH a été utilisé pour la détoxification du CPF, ce qui a engendré une baisse du taux de ce dernier. La diminution du taux du GSH, ainsi que le rapport GSH/GSSG ont été rapporté dans le stress oxydatif induit par plusieurs produits chimiques [157]. L'altération du rapport GSH/GSSG par la déplétion du GSH entraîne une oxydation des groupements -SH des protéines entraînant la formation de ponts disulfures intra-ou extra-moléculaires, et par conséquent une altération de la conformation spatiale et la fonction des protéines [60].

D'autre part, nous avons noté une augmentation non significative de l'activité enzymatique de GGT dans le foie comme dans le poumon des rats recevant le CPF (850 ± 79.39 ; 965.66 ± 166.39 UI/g de protéines) par rapport à celle mesurée chez les témoins (606.66 ± 196.55 ; 739.66 ± 108.30 UI/ g de protéines) (figure 12). Comme nous avons démontré auparavant l'augmentation de l'activité du GGT a été due probablement à l'utilisation du GSH extracellulaire qui contribue à l'épuisement des radicaux libres formés, parce que, nous avons déjà indiqué que le taux du GSH intracellulaire est diminué, après traitement par le CPF.

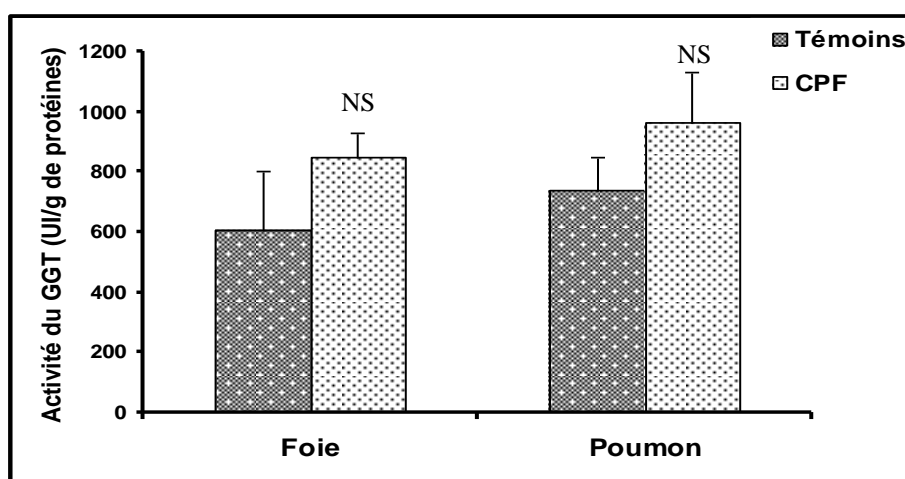


Figure 12. Effet du CPF sur l'activité cytosolique de GGT dans les tissus hépatopulmonaires traités par le CPF. L'activité de GGT a été mesurée à partir des fractions cytosoliques provenant des rats traités ou non par le CPF, selon la méthode de Meister et al [117]. Témoins : rats non traités ; CPF : rats traités par une dose de 6.75 mg/Kg du CPF par voie orale quotidiennement pendant 28 jours. NS : différence non significative.

Par ailleurs, l'effet du CPF sur les activités de la GST et de CAT dans le foie et le poumon a été constaté (figure 13). Nous avons observé une diminution significative de l'activité de la GST dans le foie comme dans le poumon chez les rats traités (211.66 ± 67.92 ; 16.33 ± 5.03 UI/g de protéines) par rapport aux rats témoins non traités (442 ± 88.47 ; 141.66 ± 14.29 UI/ g de protéines) (figure 13A). La différence significative de l'activité de la GST dans le foie et le poumon après traitement par le CPF est proportionnelle à la diminution du taux de GSH, ce résultat est en accord avec les résultats d'autres études qui ont mis en évidence une diminution de l'activité de la GST après traitement par le CPF [149 et 158].

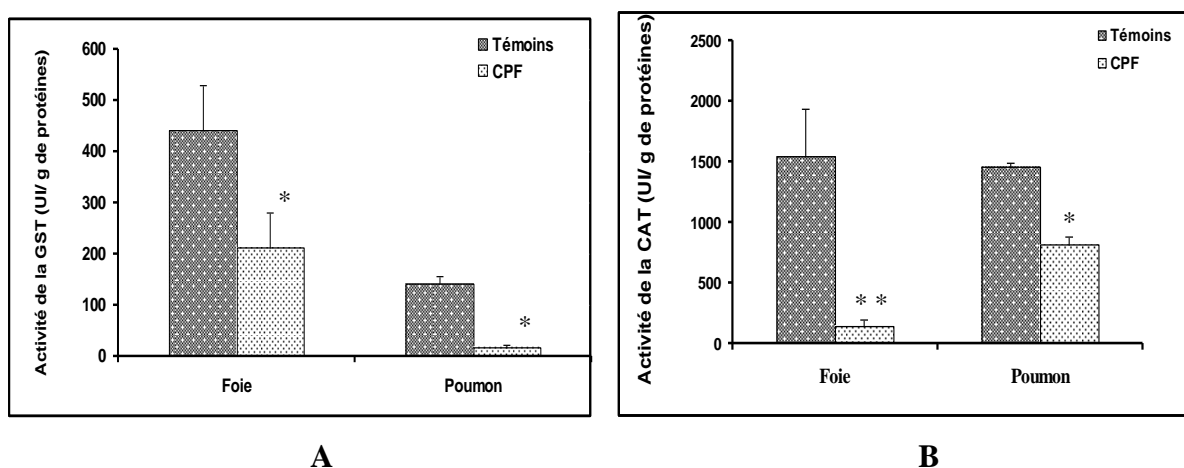


Figure 13. Effets du CPF sur les activités cytosoliques de la GST et de CAT dans les tissus hépatopulmonaires traités par le CPF. Les activités ont été mesurées à partir des fractions cytosoliques provenant des rats traités ou non par le CPF, selon, les méthodes de Habig et al [118] et de Clairborne [119]. A : effet sur la GST ; B : effet sur la CAT. Témoins : rats non traités ; CPF : rats traités par une dose de 6.75 mg/Kg du CPF par voie orale quotidiennement pendant 28 jours. * : différence significative par rapport au témoin ; ** : différence très significative.

De l'autre côté, l'activité de CAT dans l'homogénat du foie et du poumon a très significativement diminué chez les rats recevant le CPF (445.33 ± 10.08 et 396 ± 41.98 UI/g) par rapport à celle mesurée chez les témoins (1233.33 ± 27.75 et 1070 ± 17.69 UI/g) (figure 13B). Parmi, les systèmes antioxydants enzymatiques cellulaires figurent en première ligne la CAT. L' O_2^\bullet , première espèce toxique formée à partir de l'oxygène, est éliminé et maintenu à un niveau de concentration assez bas par la SOD, qui catalyse sa desmutation en H_2O_2 . Ce dernier est transformé en H_2O et O_2 par la CAT. L'évaluation de l'activité des systèmes enzymatiques a mis en évidence une réduction significative de

l'activité cytosolique de la CAT dans le foie et le poumon des rats traités par le CPF, ce résultat est en accord avec les résultats d'autres études qui ont mis en évidence une diminution de l'activité de CAT après traitement par le CPF [148 et 159]. Selon Ozcan Oruç, la diminution de l'activité de la CAT pourrait être due à la production excessive d'anion superoxyde [160].

IV.3. Caractérisation des extraits bruts de la propolis et des graines de la plante *L. sativum*

La sélection de la propolis et des graines de la plante *L. sativum* s'est fondée sur les critères suivants : la propolis, ce produit, du moins, très bénéfique pour l'abeille, suscite beaucoup d'intérêts pour l'homme, et constitue un élément susceptible de fournir de nouveaux produits, qui pourraient avoir une protection pour la santé humaine. Dans le monde entier, de nombreuses études sont consacrées à la propolis, source importante de composés phénoliques, notamment les flavonoïdes. Tandis que les graines de la plante *L. sativum* est une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde, les extraits bruts des graines de cette plante sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle.

La caractérisation de l'EEP a été réalisée par CG/MS qui est considérée comme étant la méthode la plus effective dans la détection et la caractérisation des composés dans les mélanges organiques complexes, son avantage est d'avoir la capacité de déterminer les structures complètes sans avoir besoin d'autres méthodes physicochimiques. L'analyse de l'EEP par la CG/MS nous a donné le chromatogramme illustré dans la figure 14.

Le chromatogramme obtenu après analyse de l'EEP, montre l'apparition d'un grand nombre de composés avec différentes abondances. Nous avons remarqué que le taux des flavonoïdes est très élevé comme la pinocembrine, la techtochrysin et la naringénine. Cette famille de substances est considérée comme étant la partie dominante de la propolis, et d'après des travaux publiés, la qualité de la propolis a un lien direct avec le pourcentage de ces substances. En outre, nous avons noté la présence de produits intermédiaires de la biosynthèse des flavonoïdes comme les chalcones. Nous avons aussi constaté, la présence d'esters d'acides aliphatiques comme l'éthyl hexadécanoate et l'éthyl octadécanoate.

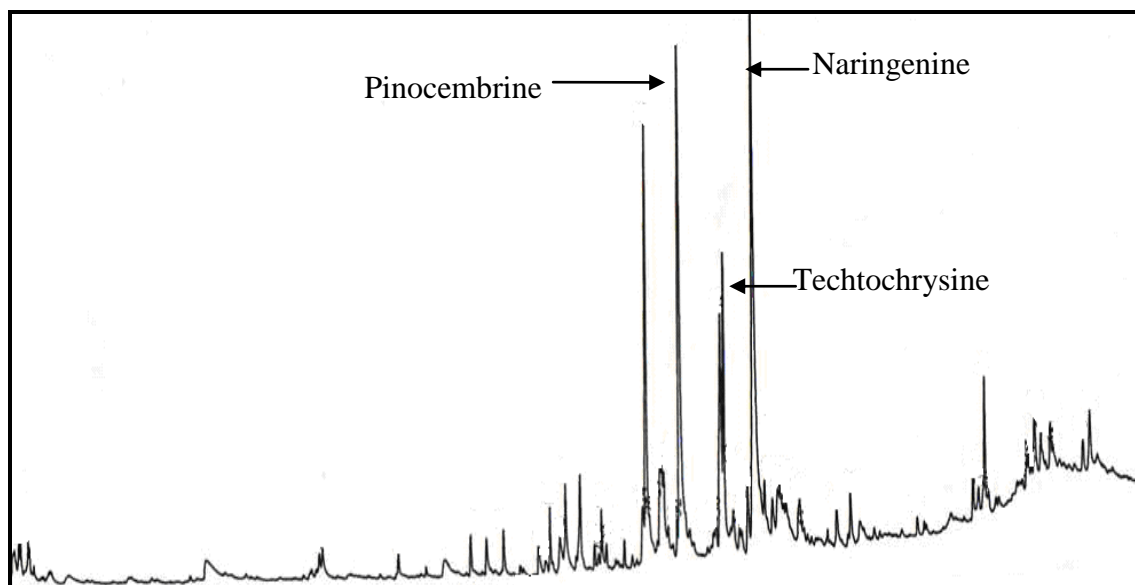


Figure 14. Résultats d'analyse de l'EEP par CG/MS. 1 μ l de l'EEP a été injecté dans un chromatographe QP 210 de SHIMADZU. Le gaz vecteur choisi est l'hélium N55, la température a été programmée entre 100-310 °C, selon, le protocole de Bankova et al [105]. Les composants les plus importants sont indiqués par des flèches.

Par ailleurs, l'analyse chimique de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* par la CG/MS (figure 15) a montré que la plupart des substances identifiées sont des acides gras représentés par l'acide oléique (9-octadécénoïque), l'acide palmitique (Hexadécanoïque) et l'acide linoléique (octadécadiénoïque). En outre, nous avons constaté que l'EBM des graines de la plante *L. sativum* renferme des terpènes en quantité assez faible tels que le nonacosane, le valtrate et le pentatriacontane. Nous avons noté aussi la présence d'un flavonoïde qui est le pentadecenol. Le profil chimique de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* concorde avec celui de Bryan et ses collaborateurs qui ont trouvé que les composés majoritaires de l'extrait brut de la plante *L. sativum* sont les acides gras [161].

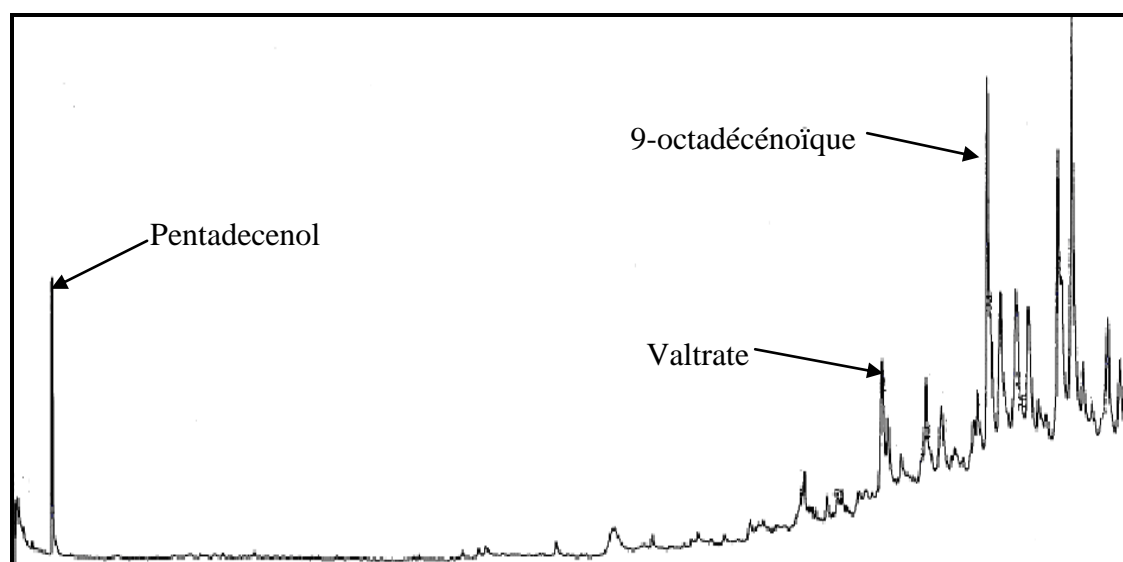


Figure 15. Résultats d'analyse de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* par CG/MS. 1 μ l de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* a été injecté dans un chromatographe QP 210 de SHIMADZU. Le gaz vecteur choisi est l'hélium N55, la température a été programmée entre 100-310 °C, selon, le protocole de Bankova et al [105]. Les composants les plus importants sont indiqués par des flèches.

En outre, la caractérisation de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* est complétée par une étude quantitative au moyen des dosages spectrophotométriques avaient pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux et des flavonoïdes, et une évaluation du pouvoir anti-radicalaire. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des effets pharmacologiques des plantes leur sont attribués. La méthode de dosage des polyphénols totaux est celle de Li et ses collaborateurs [106], elle est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique phosphomolybdique de réactifs de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue qui présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de Bahorun et ses collaborateurs en utilisant comme standard la quercétine [107].

Les polyphénols sont des phytomicronutriments synthétisés par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales [162]. Il s'agit d'une grande famille de molécules organiques dont les plus connus sont les flavonoïdes et les tanins. Ils ont une structure

particulière qui leur confère une activité « scavenger » et donc antioxydante. Le résultat du dosage des polyphénols (tableau 1) montre que l'EBM des graines de la plante *L. sativum* contient 64.37 ± 0.26 mg EAG/g d'extrait. Pareillement, l'évaluation quantitative des flavonoïdes (tableau 1) montre que l'EBM des graines de la plante *L. sativum* contient 9.29 ± 0.85 mg EQ/g d'extrait.

Tableau 1. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de l'EBM des graines de la plante *L. sativum*. Les dosages ont été réalisés selon les méthodes de Li et al [106] pour le dosage des polyphénols totaux, et de Bahorun et al [107] pour le dosage des flavonoïdes. (a) : mg EAG/g d'extrait. (b) : mg EQ/g d'extrait. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm écart-type.

	Teneur en polyphénols ^(a)	Teneur en flavonoïdes ^(b)
EBM des graines de la plante <i>L. sativum</i>	64.37 ± 0.26	9.29 ± 0.85

D'autre part, l'effet « scavenger » ou la capacité de piégeage des radicaux libres de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* est déterminé en utilisant la méthode au DPPH. Une méthode rapide, simple et peu coûteuse a la capacité de mesurer l'activité antioxydante des extraits en utilisant le radical libre stable DPPH. Le DPPH est largement utilisé pour tester la capacité des composés d'agir en tant qu'éboueurs des radicaux libres ou donneurs d'hydrogènes. La méthode de DPPH a été également ces dernières années utilisée pour mesurer les antioxydants dans les systèmes biologiques complexes. Quand-t-il réagit avec un composé antioxydant qui peut donner les protons hydrogènes, le DPPH est réduit (DPPH-H) et change donc de couleur (du violet vers le jaune), ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 517 nm, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons [163]. Le profil anti-radicalaire obtenu (figure 16) révèle que l'extrait possède une activité antioxydante dose dépendante. Le pouvoir antioxydant vis-à-vis du DPPH, le plus élevé (75.54%) est observé avec une dose de 100 μ g/ml, pouvoir proche à celui qu'exerce la vitamine C (90.45%) à la même concentration.

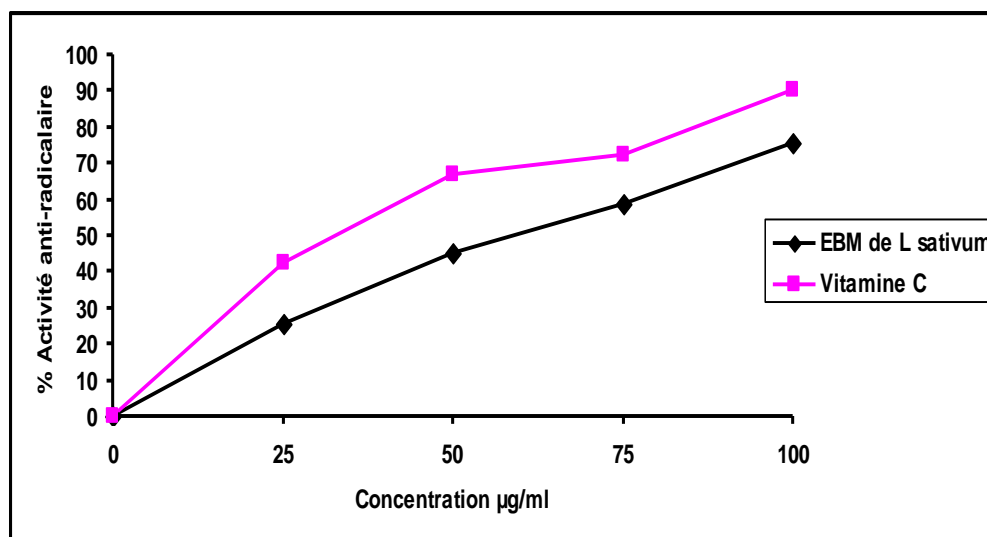


Figure 16. *Activité anti-radicalaire de l'EBM des graines de la plante L. sativum. Les activités anti-radicalaires en fonction des concentrations de l'EBM des graines de la plante L. sativum ou de la vitamine C ont été mesurées selon le protocole de Mansouri et al [108], dans lequel le DPPH a été utilisé comme radical libre et la vitamine C comme témoin.*

Les composés phénoliques et plus particulièrement les flavonoïdes sont reconnus comme des substances potentiellement antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène, l'effet « scavenger » des flavonoïdes (FLOH) est attribué à leur faible potentiel redox qui les rend thermodynamiquement capable de réduire les radicaux libre (R°) par transfert d'atome d'hydrogène à partir des groupements hydroxyle. Cette réaction donne naissance au radical aroxyde (FLO°) et à la molécule radicalaire rendue stable (RH), le FLO° subira par la suite un réarrangement structural permettant la redistribution de l'électron célibataire sur le cycle aromatique et la stabilisation des radicaux aroxydes [164].

IV.4. Mise en évidence de l'effet hépatoprotecteur de l'EEP contre l'intoxication induite par le B(a)P

Le traitement des rats pendant trois jours par l'EEP avec une dose de 100 mg/Kg a permis de neutraliser les modifications histologiques hépatiques comme les infiltrations inflammatoires et les septas fibreuse et inflammatoires (figure 17A) induites par le B(a)P après traitement par une dose unique du B(a)P de 100 mg/kg par voie intrapéritonéale. Nos résultats ont montré que les coupes de foie des rats postérieurement traités par l'EEP après traitement par le B(a)P présentaient une architecture normale, avec quelques hépatocytes en stade inflammatoire (figure 17B).

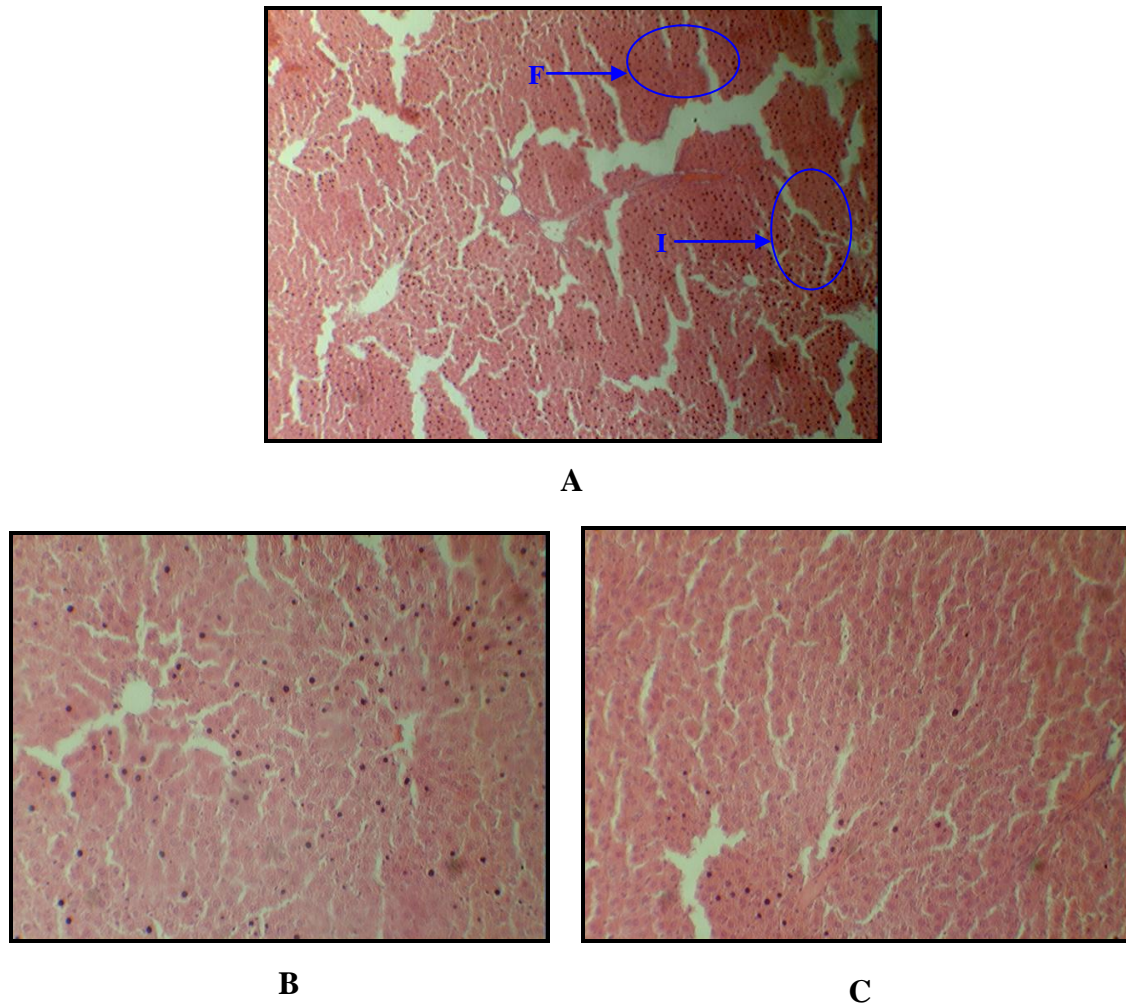


Figure 17. *Analyse par microscope optique des tissus hépatiques des rats intoxiqués par le B(a)P et traités par l'EEP. Les coupes histologiques ont été préparées à partir des foies des rats intoxiqués par le B(a)P et/ou traités par l'EEP et observées par microscope optique (Gx100), après coloration par hématoxyline éosine selon le protocole de Martoja et Martoja [120]. A : rats traités par le B(a)P seul montrant une infiltration inflammatoire (I), des septas fibreuses et inflammatoires (F) ; B : rats traités par le B(a)P et l'EEP présentant une architecture normale avec quelques hépatocytes en stade inflammatoire ; C : rats traités par l'EEP seul présentant une architecture normale.*

Par ailleurs, l'effet de l'EEP sur le stress oxydatif hépatique induit par le B(a)P a été constaté par l'évaluation des taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatiques (figure 18). Nous avons remarqué une diminution significative du taux de MDA chez les rats traités par le B(a)P et l'EEP par rapport aux rats traités seulement par le B(a)P (figure 18A); la propolis a été révélée comme étant un composé chémoprotecteur, pourvu d'un pouvoir antiperoxydant et jouant un effet écran contre l'action délétère des radicaux libres. Cela est en accord avec les résultats obtenus par Lahouel et ses collaborateurs [91] qui ont montré que les polyphénols diminuent les produits de la

peroxydation lipidique (MDA). L'EEP semble apporter une protection contre les radicaux libres formés par la métabolisation hépatique du B(a)P. Il empêche aussi, la liaison de ces métabolites réactifs avec les lipides membranaires des cellules hépatiques, ce qui se traduit par la diminution du taux du MDA tissulaire.

Aussi, nous avons noté une augmentation très significative du taux du GSH (Figure 18B) ; le traitement ultérieur des rats par l'EEP a empêché la diminution du taux du GSH chez les rats recevant le B(a)P en maintenant le niveau cellulaire normal de ce tripeptide. Autrement dit, les flavonoïdes de la propolis ont un effet « scavenger », c'est-à-dire au lieu que les radicaux libres produits par le B(a)P se neutralisent par le GSH, ils vont plutôt être capturés par les composés phénoliques, en maintenant ainsi, le taux normal du GSH des cellules hépatiques. En outre, Moskaug et ses collaborateurs ont prouvé que des concentrations relativement basses des flavonoïdes stimulent l'expression d'une enzyme la glutamylcystéine synthétase nécessaire pour la synthèse du GSH [165].

Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets sur la santé ; en effet leur rôle d'antioxydant naturel suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, des maladies cardiovasculaires, et des maladies neurodégénératives [166, 167].

Dans le but d'identifier les sites potentiels au sein des flavonoïdes qui sont responsables de l'effet « scavenger », plusieurs travaux ont étudié la cinétique et le mécanisme réactionnel des flavonoïdes. Amič et ses collaborateurs ont mis en évidence la relation structure fonction de 29 flavonoïdes (flavones, flavols et flavonones) et leurs capacité de piéger les radicaux libres. Les résultats de cette étude ont montré que les flavonoïdes les plus efficaces sont ceux qui renferment des groupements 3, 4-dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3-OH sur le cycle C [168]. Ces dernières années, une importance particulière a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes qui sont attribuées à leur capacité à piéger directement les radicaux libre, chélater les ions métalliques impliqués dans la production des ROS, inhiber certaines enzymes telles que les oxydases et activer les enzymes antioxydantes [169].

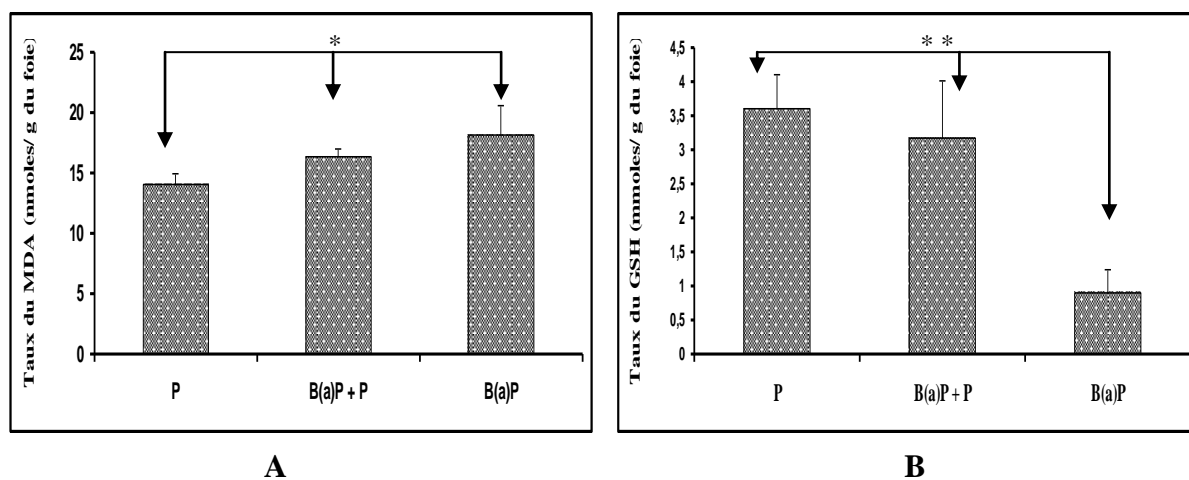


Figure 18. Effets de L'EEP sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatiques intoxiqués par le B(a)P. Les taux ont été mesurés à partir des tissus hépatiques provenant des rats intoxiqués par le B(a)P et/ou traités par l'EEP, selon les méthodes d'Okhawa et al [115] et d'Ellman [116]. A : effet sur le MDA ; B : effet sur le GSH. P : rats traités par 100 mg/Kg de l'EEP par voie orale pendant 3 jours ; B(a)P+P : rats traités par une dose unique de 100 mg/Kg du B(a)P par voie intrapéritonéale et après 14 semaines traités par une dose de 100 mg/Kg de l'EEP pendant 3 jours ; B(a)P : rats traités par une dose unique de 100 mg/Kg du B(a)P par voie intrapéritonéale. * : différence significative ; ** : différence très significative.

De l'autre côté, les activités de CAT, de la GST et de GGT chez les rats traités par le B(a)P et l'EEP ont été conservées à leurs niveaux normaux et ceci, comparativement aux rats traités par le B(a)P seul. Nos résultats (figure 19) ont permis de confirmer le rôle antioxydant des flavonoïdes. Ces derniers ont la capacité de capturer et d'inactiver les radicaux libres. Ils agissent par empêchement de la fixation des radicaux libres sur l'ADN et par l'activation du système de détoxification [170]. Les polyphénols sont parmi des antioxydants les plus communs dans les fruits et légumes, en tant qu'agent chemopreventive. Beaucoup d'études ont suggéré que les effets bénéfiques des polyphénols proviennent de leurs pouvoirs antioxydants ; cependant, les effets antioxydants ne peuvent pas expliquer tous les effets des polyphénols, tels que l'inhibition de la transduction du signal cellulaire [171]. Sugata et ses collaborateurs, ont montré que les polyphénols de thé peuvent limiter la carcinogenèse induite par le B(a)P dans le poumon par la modulation différentielle de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose tels que p53 et bax, bcl-2, mdm-2, p21 et p27 [172].

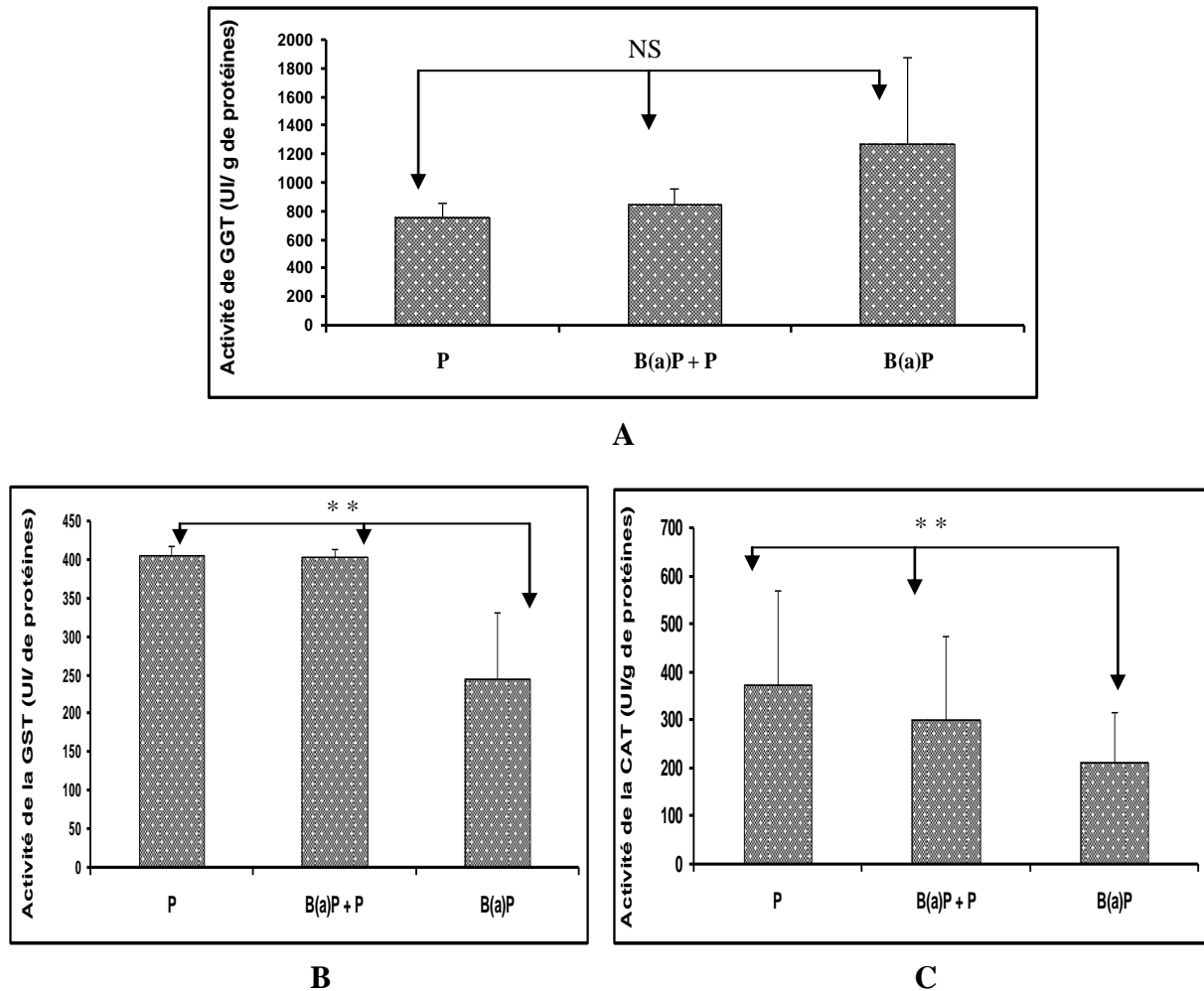


Figure 19. Effets de L'EEP sur les activités cytosoliques de GGT, de la GST et de CAT dans les tissus hépatiques intoxiqués par le B(a)P. Les activités ont été mesurées à partir des fractions cytosoliques provenant des rats intoxiqués par le B(a)P et/ou traités par l'EEP, selon, les méthodes de Meister et al [117], de Habig et al [118] et de Clairborne [119]. A : effet sur GGT ; B : effet sur la GST ; C : effet sur la CAT. P : rats traités par 100 mg/Kg de l'EEP par voie orale pendant 3 jours ; B(a)P+P : rats traités par une dose unique de 100 mg/Kg du B(a)P par voie intrapéritonéale et après 14 semaines traités par une dose de 100 mg/Kg de l'EEP pendant 3 jours ; B(a)P : rats traités par une dose unique de 100 mg/Kg du B(a)P par voie intrapéritonéale. NS : différence non significative ; ** : différence très significative.

IV.5. Mise en évidence de l'effet protecteur hépatopulmonaire de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* contre l'intoxication induite par le CPF

L'effet protecteur de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* est évalué en étudiant d'une part, les changements histologiques au niveau du foie et des poumons, provenant des rats après traitement par le CPF. Nous avons constaté que les tissus hépatiques des animaux intoxiqués par le CPF ont été protégés grâce aux administrations préventives d'EBM des graines de la plante *L. sativum* (figure 20A).

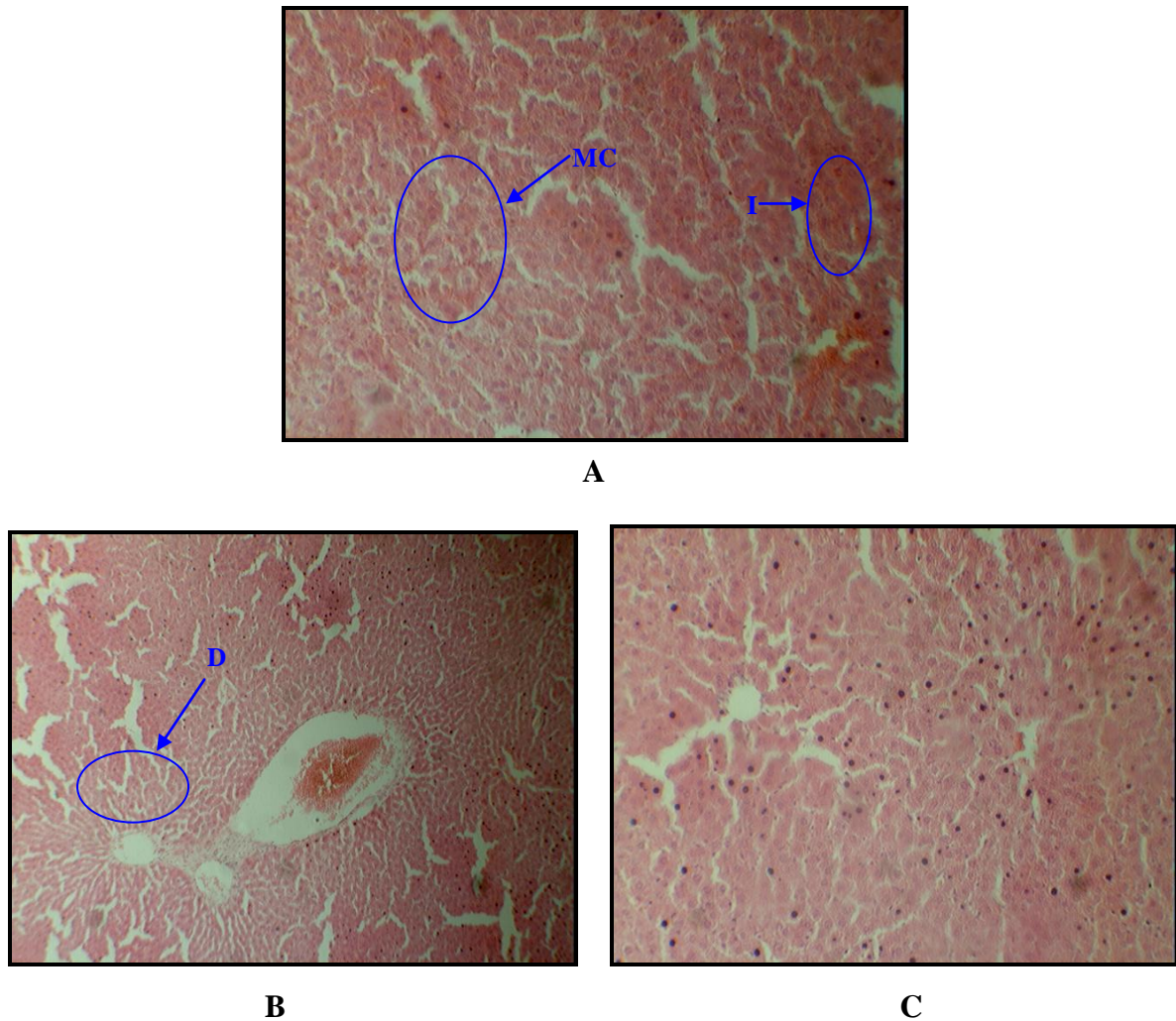
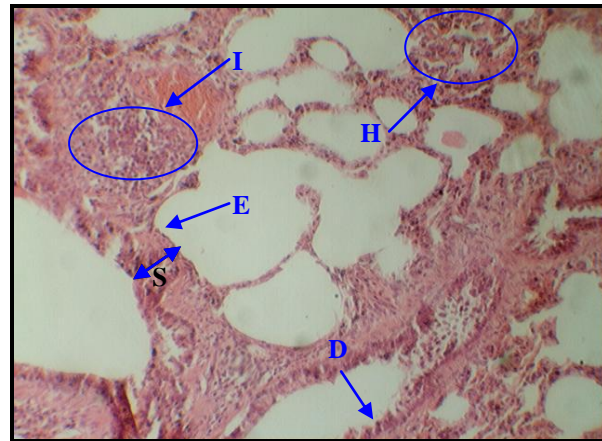
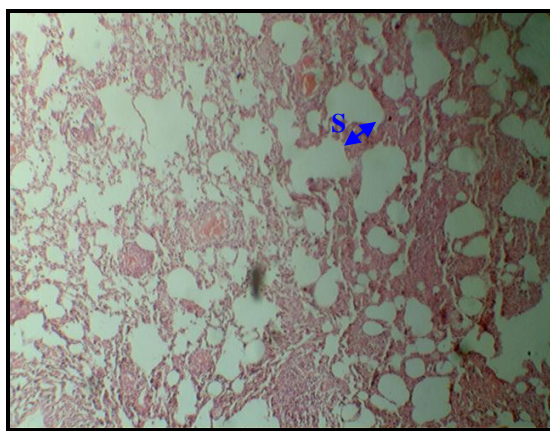


Figure 20. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus hépatiques prétraités par l'EBM des graines de la palme *L. sativum* et intoxiqués par le CPF. Les coupes histologiques ont été préparées à partir des foies des rats intoxiqués par le CPF et/ou prétraités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* et observées par microscope optique (Gx100), après coloration par hématoxyline éosine selon le protocole de Martoja et Martoja [120]. A : rats traités par le CPF montrant une modification cytosolique (MC), inflammation (I) ; B : rats traités par l'EBM des graines de *L. sativum* et le CPF montrant un léger changement dégénératif (D) ; C : rats traités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* montrant une architecture normale.

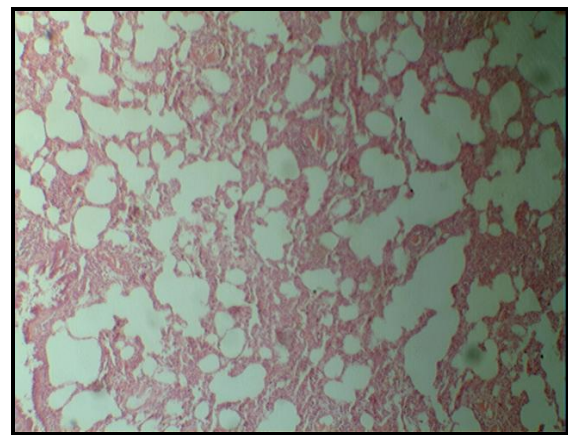
Les coupes du foie observées présentaient un léger changement dégénératif (figure 20A, D) dans les hépatocytes entourant la veine centrale, ainsi que l'absence d'infiltrations inflammatoires. Ceci peut être expliqué par l'activation de facteurs tels que les PPARS (*peroxisome proliferator-activated receptors*) qui exercent des effets antagonistes vis-à-vis de NF_κB et AP-1 ; facteurs interviennent dans l'activation des processus inflammatoires, et cela constituerait l'un des mécanismes des effets anti-inflammatoires des acides gras [143]. Le traitement préventif des rats par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* a aussi permis de protéger les poumons des rats postérieurement intoxiqués par le CPF (figure 21).



A



B



C

Figure 21. Résultats d'analyse par microscope optique des tissus pulmonaires prétraités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* et intoxiqués par le CPF. Les coupes histologiques ont été préparées à partir des poumons des rats intoxiqués par le CPF et/ou prétraités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* et observées par microscope optique (Gx100), après coloration par hématoxyline éosine selon le protocole de Martoja et Martoja [120]. A : rats traités par le CPF montrant une desquamation de la bordure épithéliale (D), hémorragie (H), changements emphysémateux (E), infiltration des cellules mononucléaires (I) et épaissement des septas interalvéolaires (S) ; B : rats traités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* et le CPF montrant un petit épaissement des septas interalvéolaires (S) ; C : rats traités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* montrant une architecture normale.

Les dégâts histologiques potentiellement inductibles par le CPF tels que l'élargissement des septas, les infiltrations des cellules mononucléaires, l'hémorragie, les changements emphysémateux, la desquamation de la bordure épithéliale et de la bronchiole terminale (figure 21A) sont neutralisés par l'EBM des graines de la plante *L. sativum*. En revanche, nous avons remarqué que le poumon présentait l'organisation histologique normale avec quelques changements dans le tissu conjonctif qui apparaît un peu épaissi (figure 21B, S).

D'autre part, l'effet de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* sur le stress oxydatif induit par le CPF a aussi été évalué. Nous avons constaté que l'EBM des graines de la plante *L. sativum* semblait apporter une protection contre les radicaux libres formés par la métabolisation du CPF. L'effet de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH après traitement par le CPF ont été quantifiés (figure 22).

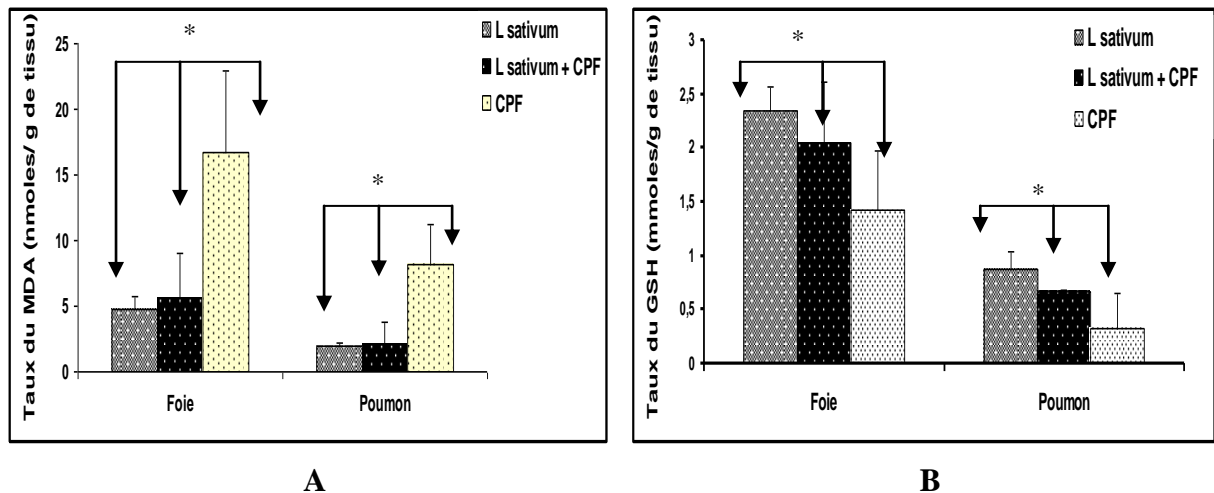


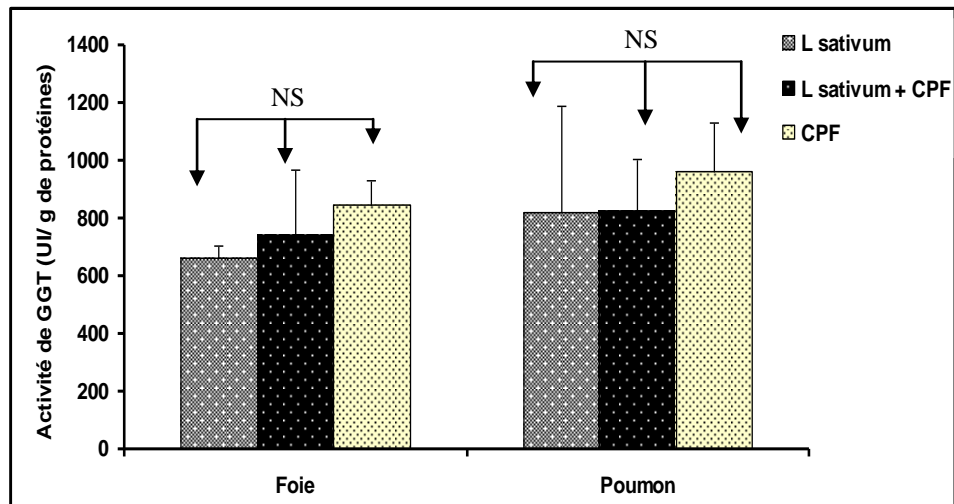
Figure 22. Effets de L'EBM des graines de la plante *L. sativum* sur les taux cytosoliques du MDA et du GSH dans les tissus hépatopulmonaires intoxiqués par le CPF. Les taux ont été mesurés à partir des tissus hépatopulmonaires provenant des rats intoxiqués par le CPF et/ou prétraités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum*, selon, les méthodes d'Okhawa et al [115] et d'Ellman [116]. A : effet sur le MDA ; B : effet sur le GSH. *L. sativum* : rats traités par 100 mg/Kg de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* par voie orale pendant 28 jours ; *L. sativum*+CPF : rats prétraités par 100 mg/Kg l'EBM des graines de la plante *L. sativum* et après une demi heure traités par une dose de 6.75 mg/Kg du CPF par voie orale quotidiennement pendant 28 jours ; CPF : rats traités par une dose de 6.75 mg/Kg du CPF par voie orale quotidiennement pendant 28 jours. * : différence significative.

Nous avons observé une diminution significative du taux du MDA comparativement aux rats traités par le CPF seul (figure 22A). Cette action, pourrait être due à la présence de l'EBM de des graines de la plante *L. sativum* qui empêche l'action des métabolites actifs du CPF sur les lipides membranaires. En revanche, nous avons constaté une augmentation significative du taux du GSH hépatopulmonaire chez les rats traités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* avant leur intoxication par le CPF (figure 22B).

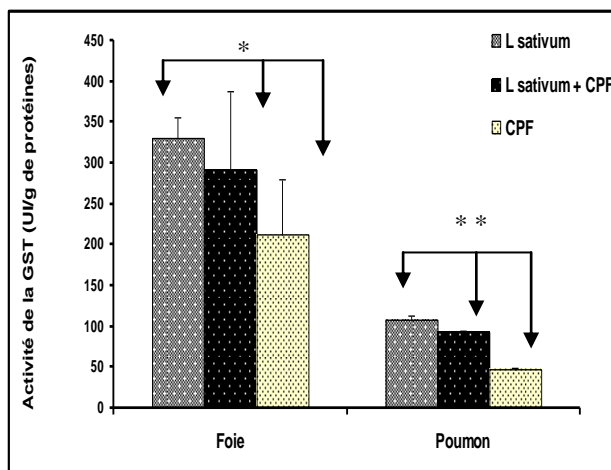
Parallèlement, les activités de GGT, de la GST et de CAT sont conservées à ses niveaux normaux dans le foie et le poumon chez les rats prétraités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum* en comparaison avec les rats traités par le CPF (figure 23). Ces résultats confirment le rôle antioxydant de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* [173].

L'effet protecteur de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* est dû à sa richesse en acides gras. Les acides gras insaturés des membranes cellulaires sont les premiers touchés par les radicaux libres au cours d'un stress oxydatif, ceci ayant pour conséquence une désorganisation des membranes cellulaires et donc un dysfonctionnement des cellules. Cependant, dans une étude menée chez des chiens atteints d'arthrite, l'apport alimentaire d'acides gras essentiels entraîne une augmentation de leur incorporation dans les membranes cellulaires, rendant les cellules moins sensibles au stress oxydant. De plus, chez le rat, il a été montré qu'une supplémentation quotidienne en acides gras oméga 3 augmente de façon significative les concentrations en SOD, enzyme largement impliquée dans la lutte contre les radicaux libres produits par le stress oxydant [174]. En outre, en diminuant les dysfonctionnements cellulaires liés au stress oxydant, les acides gras oméga 3 stabilisent le potentiel électrique des myocytes et diminuent l'incidence des troubles du rythme des cellules cardiaques [175].

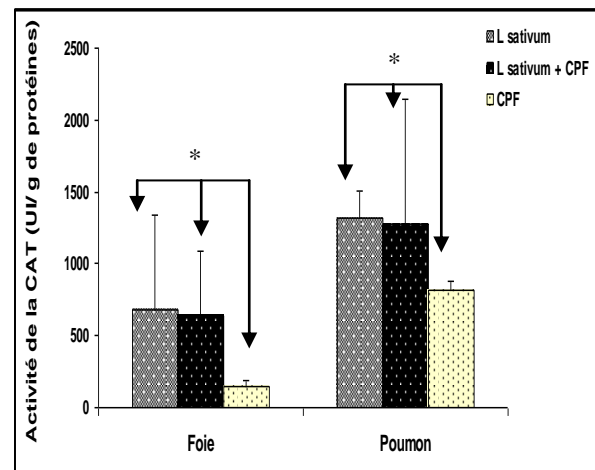
Wang et ses collaborateurs ont montré que l'acide linoléique induit l'expression de l'ARE par l'activation du facteur de transcription Nrf2 ; un facteur qui régule plus de 200 gènes incluant ceux impliqués dans la phase de détoxification et de la défense antioxydante [176]. La voie Nrf2 est considérée comme la voie la plus importante pour protéger les cellules contre un stress oxydatif. En outre, Varady et ses collaborateurs ont démontré que l'administration des des graisse activait le Nrf2 dans le foie des porcs qui reflétait probablement un mécanisme pour empêcher des dommages oxydatifs cellulaires [177].



A



B



C

Figure 23. Effets de L'EBM des graines de la plante *L. sativum* sur les activités cytosoliques de la GGT, de la GST et de CAT dans les tissus hépatopulmonaires intoxiqués par le CPF. Les activités ont été mesurées à partir des fractions cytosoliques des tissus hépatopulmonaires provenant des rats intoxiqués par le CPF et/ou prétraités par l'EBM des graines de la plante *L. sativum*, selon les méthodes de Meister et al [117], de Habig et al [118] et de Clairborne [119]. A : effet sur la GGT ; B : effet sur la GST ; C : effet sur la CAT. *L. sativum* : rats traités par 100 mg/Kg de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* par voie orale pendant 28 jours ; *L. sativum*+CPF : rats prétraités par 100 mg/Kg de l'EBM des graines de la plante *L. sativum* et après une demi heure ils sont traités par une dose de 6.75 mg/Kg du CPF par voie orale quotidiennement pendant 28 jours ; CPF : rats traités par une dose de 6.75 mg/Kg du CPF seul par voie orale quotidiennement pendant 28 jours. NS : différence non significative ; * : différence significative ; ** : différence très significative.

V. Conclusion générale et perspectives

La présente étude a pour objectifs d'évaluer le stress oxydatif et les changements histologiques induits par le B(a)P, un HAP identifié comme étant cancérigène pour l'homme et, le CPF, un des pesticides les plus utilisés en agriculture. Les résultats obtenus ont montré que le système de défense antioxydant (activité de la CAT et de la GST et le taux du GSH) a diminué significativement tant pour le B(a)P que pour le CPF, laissant la place aux prooxydants responsables de la lipopéroxydation et aux changements histologiques au niveau du foie, le lieu du métabolisme des xénobiotiques, et le poumon, le premier organe vital en contact direct avec les substances toxiques.

Nous avons aussi démontré que les extraits bruts de la propolis et des graines de la plante *L. sativum* possèdent un rôle protecteur contre le stress oxydatif induit par le B(a)P et le CPF qui pourrait être dû à leur pouvoir scavenger contre les espèces réactives de l'oxygène. En effet, ces extraits possèdent une activité antioxydante qui est capable de maintenir l'équilibre du statut redox cellulaire en normalisant le taux des systèmes antioxydants des cellules hépatiques et pulmonaires (glutathion, CAT et GST) ce qui empêche une lipopéroxydation excessive.

Notre travail a ouvert un large terrain d'investigations concernant l'étude de l'équilibre prooxydant/antioxydant. Malheureusement, les paramètres que nous avons appréciés dans cette étude ne permettent pas d'expliquer les mécanismes impliqués dans le stress oxydant. Afin, de comprendre la régulation des systèmes antioxydants, nous pouvons envisager de compléter la gamme de paramètres biochimiques évalués par le dosage des activités d'autres enzymes telles que la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et les peroxyredoxines dans un premier temps, et d'étudier les voies de transduction du signal impliquées dans l'induction de ces enzymes dans un deuxième temps. De plus, les protéines du stress (HSP) exercent une protection cellulaire en réponse à des conditions de stress oxydant ; par exemple la HSP72, une protéine inductible par le stress, possède un rôle de protéine chaperonne et participe à la restauration de la fonction des protéines dénaturées par le stress. Par conséquent, il est très pertinent de quantifier cette protéine par immunodétection par western blot ou de la localiser par immunohistologie. Par ailleurs, nous pouvons aussi quantifier les lésions d'ADN comme 8-OHG (8-hydroxyguanine) qui est la lésion la plus généralement fréquente. Le contenu en adduits peut être déterminé par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectroscopie de masse (HPLC/MS). En outre, le gène Nrf2 code pour un facteur de transcription qui active

l'élément de réponse antioxydante pour renforcer le système antioxydant, il est donc nécessaire d'analyser l'effet du B(a)P sur son expression, soit par Western blot au niveau de la protéine, soit au niveau de l'ARNm correspondant par RT-PCR, Northern blot ou hybridation *in situ*. Aussi, nous pouvons mesurer l'activité promotrice du facteur Nrf2, c'est-à-dire sa capacité de liaison à l'ADN (Nrf2-ARE), en utilisant la méthode « gel retard » ou EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*), ou bien la méthode d'empreintes d'ADN (DNA footprinting).

Sur le plan histologique nous avons constaté que le traitement par le B(a)p ou le CPF produit un état inflammatoire. Cependant, nous ne pouvons pas nous prononcer sur le fait que, le stress oxydatif soit une cause ou une conséquence de cette inflammation. Par conséquent, il serait très pertinent de quantifier la réponse inflammatoire induite par le B(a)P ou le CPF, en établissant les cinétiques d'apparition des marqueurs de l'inflammation tels que l'IL-6 et le TNF- α et de diminution de la concentration des antioxydants. En outre, la mesure de la production des ROS au niveau des macrophages pourrait permettre de déterminer, si le stress oxydant consécutif à l'exposition au B(a)P ou CPF est spécifiquement dû aux capacités intrinsèques des macrophages à produire les ROS. Ainsi, il serait nécessaire de mettre au point une technique de mesure de la production des ROS au niveau cellulaire par fluorimétrie, en utilisant par exemple le DCFH (dichlorofluoresceine).

En conclusion finale, nous disons que le stress oxydant est devenu une notion incontournable en Biologie Médicale, porteuse d'espoir thérapeutique, mais qui implique plus de complexité. De nombreuses lacunes demeurent dans l'arsenal thérapeutique contre le stress oxydant. Il faudrait donc chercher, à utiliser les radicaux libres pour activer des substances, permettant une action ciblée aux cellules activées produisant ces radicaux, soit pour réduire l'inflammation, soit déclencher l'apoptose de cellules cancéreuses, et à fabriquer des molécules modulant l'expression des gènes antioxydants.

VI. Références bibliographiques

- [1] Franco R, Sanchez-Olea R, Reye-Reyes EM and Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis. (2009) *Mutat. Res.*, 674: 3-22.
- [2] Tesfai Y, Davis D and reinhold D. Chromiumcan induced the metagenic effects of benzo(a)pyrene diolepoxide in normal human fibroblasts via an oxidative stress mechanism. (1998) *Mutat. Res.*, 146: 159-168.
- [3] Xue W and Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. (2005) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 206: 73-93.
- [4] Ziech D, Franco R, Georgakilas AG, Georgakilas S, Malamou-Mitsi V, Schoneveled O, Pappa A and Panayiotidis MI. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. (2010) *Chem. Biol. Interact.*, 188: 334-339.
- [5] Kamaraj S, Vinodhkumar R, Anandakumar P, Jagan S, Ramakrishnan G and Devaki T. The effect of Quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with Benzo(a)pyrene. (2007) *Biol. Pharm. Bull.*, 30: 2268-2273.
- [6] Bouziani M. L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de la médecine et de la santé. (2007) *Santémaghreb*.
- [7] Radhey SV, Anuya M and Srivastava N. Comparative studies on chlorpyrifos and methyl parathion induced oxidative stress in different parts of rat brain: Attenuation by antioxidant vitamins. (2009) *Pestic. Biochem. Phys.*, 95: 152-158.
- [8] Jeyaratnam J. Acute pesticide poisoning: a major global health problem. (1990) *World. health. Stat.*, 43: 139-144.
- [9] Saulsbury MD, Heyliger SO and Deadre JJ. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. (2009) *Toxicology*, 259: 1-9.
- [10] Gupta RC. Toxicology of organophosphate and carbamate compounds. (2006) *acad. Press*: 294.
- [11] Gutteridge JM and Halliwell B. Comments on review of free radicals in Biology and Medicine. (1992) *Free. Radic. Biol. Med.*, 12: 93-95.
- [12] Farber JL. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. (1994) *Environ. Health. Perspect.*, 102: 17-24.
- [13] Mehta A, Verma RS and Srivastava N. Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. (2009) *Pestic. Biochem. Phys.*, 94: 55-59.
- [14] Plant JA, Bone J, Ragnarsdottir KV and Voulvoulis N. Pollutants, human health and the environment - a risk - based approach. (2011) *Appl. Geochem.*, 26: 238-240.
- [15] Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS and Kerr KJ. Cancer health effects of pesticides: systematic review. (2007) *Can. Fam. Physician.*, 53: 1704-1711.
- [16] Jimenez M, Aranda FJ, Teruel JA and Ortiz A. The chemical toxic benzo(a)pyrene perturbs the physical organisation of phosphatidylcholine membrane. (2002) *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 787-793.

- [17] Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Sotis WA, Yang Y and Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response cell cycle control and apoptosis. (2000) *Biochem. Pharmacol.*, 59: 65-85.
- [18] Shimada T, Inoue K, Suzuki Y, Kawai T, AZuma A, Nakajima T, Shindo M, Kurose K, Sugie A, Yamagishi Y, Fujii-Kuriyama Y and Hashimoto M. Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. (2002) *Carcinogenesis*, 23: 1199-1209.
- [19] Dension MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. (2003) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43: 309-334.
- [20] Lin P, Chang H, Tsai WI, Wu MH, Liao YS, Chen JT and Su JM. Over expression of aryl hydrocarbon receptor in human lung carcinomas. (2003) *Toxicol. Pathol.*, 31: 22-30.
- [21] Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Minura J, Fujii-Kuriyama Y and Ishikawa T. Benzo(a)pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 779-782.
- [22] Shimada T and Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochrome p 450 1A1 and 1B1. (2004) *Cancer. Sci.*, 95: 1-6.
- [23] Burcznski ME and Penning TM. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinone generated by aldo-keto reductases induce cyp1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. (2000) *Cancer. Res.*, 60: 908-915.
- [24] Smith LE, Denissenko MF, Bennet WP, Li H, Amin S, Tang M and Preifer GP. Targeting of lung mutational hot spots by polycyclic aromatic hydrocarbons. (2000) *J. Natl. Cancer. Inst.*, 92: 803-811.
- [25] Burcznski ME, Harvey RC and Penning TM. Expression and characterization of four recombinant dihydrodiol dehydrogenase isoforms: oxidation of trans-7, 8-dihydroxy-7, 8 dihydrobenzo(a)pyrene to the activated o-quinone metabolite benzo(a)pyrene-7, 8-dione. (1998) *Biochemistry*, 37: 6781-6790.
- [26] Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA and Penning TM. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. (2007) *Chem. Res. Toxicol.*, 20: 1331-1341.
- [27] Penning TM. Aldo keto reductases and formation of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones. (2004) *Methods Enzymol.*, 378: 31-67.
- [28] Dertinger SD, Nazarenko DA, Silverstone AE and Gasiewicz TA. Aryl hydrocarbon receptor signaling play a significant role in mediating benzo(a)pyrene and cigarette smoke condensate induced cytogenetic damage in vivo. (2001) *Carcinogenesis*, 22: 171-177.
- [29] Pushparajah DS, Umachandran M, Nazir T, Plant KE, Plant N, Lewis DFV and Ioannides C. Up-regulation of CYP1A/B in rat lung and liver, and human liver precision-cut slices by a series of polycyclic aromatic hydrocarbons; association with the Ah locus and importance of molecular size. (2008) *Toxicology*, 22: 128-145.
- [30] Grove AD, Llewellyn GC, Kessler FK, White KL, Crespi CL and Ritter JK. Differential Protection by Rat UDP-Glucuronosyltransferase 1A7 against Benzo[a]pyrene-3, 6-quinone- versus

Benzo[a]pyrene-Induced Cytotoxic Effects in Human Lymphoblastoid Cells. (2000) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 162: 34-43.

[31] Boysen G and Hecht SS. Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. (2003) *Mutat. Res.*, 543: 17-30.

[32] Balu N, Padgett WT, Nelson GB, Lambert GR, Ross JA and Nesnow S. Benzo(a)pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for ³²P postlabeling analyses: Detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts. (2006) *Anal. Biochem.*, 355: 213-223.

[33] Shimada T. Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. (2006) *Drug Metab. Pharmacok.*, 21 (4): 257-276.

[34] Sugihara N and James MO. Binding of 3-hydroxybenzo(a)pyrene to bovine hemoglobin and albumin. (2003) *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 17: 239-247.

[35] Tarantini, A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Marie C, Ravanat JL and Douki T. Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo(a)pyrene as a pure compound and in complex mixtures. (2009) *Mutat. Res.*, 671: 67-75.

[36] Xin-Hai P, Yoichi N, Koichi T, Freng B and Nobuyuki H. Benzo(a)pyrene activates the human P53 gene through induction of nuclear factor KB activity. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274: 35240-35246.

[37] Biswal S, Maxwell T, Rangasamy T and Kehrer JP. Modulation of benzopyrene induced P53 activity by acrolein. (2003) *Carcinogenesis*, 24: 1401-1406.

[38] Sharovskaya S, Kobliakova I, Solomatina N and Kobliakov V. Effect of some carcinogenic and non carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on gap junction intracellular communication in hepatoma cell culture. (2006) *Eur. J. cell. Biol.* : 388-397.

[39] Goetz ME and Luch A. Reactive species: A cell damaging rout assisting to chemical carcinogens. (2008) *Cancer Lett.*, 266: 73-83.

[40] Penning TM, Ohnishi ST, Ohnishi T and Harvey RG. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon trans dihydrodiol catalysed by dihydrodiol dehydrogenase. (1996) *Chem. Res. Toxicol.*, 9: 84-92.

[41] Kryston TB, Georgiev AB, Pessis P and Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. (2011) *Mutat. Res*: 1-9.

[42] Park JH, Mangal D, Tacka KA, Quinn AM, Harvey RG, Blair IA and Penning TM. Evidence for the aldo-Keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. (2008) *Nat. Acad. Sci. USA.*, 105: 6846-6851.

[43] Lotti M, Moretto A, Bertolazzi M, Peraica M and Fioroni F. Organophosphate polyneuropathy and neuropathy target esterase: studies with methamidophos and its resolved optical isomers. (1995) *Arch. Toxicol.*, 69: 330-336.

[44] Timchalk C, Poet TS and Kousba AA. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. (2006) *Toxicology*, 220: 13-25.

- [45] Roy TS, Andrew JE, Seidler FJ and Slotkin TA. Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. (1998) *Teratology*, 58: 62-68.
- [46] Slotkin TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants; nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. (2004) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 198: 132-151.
- [47] Crumpton TL, Seidler FJ and Slotkin TA. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos in vivo and in vitro: effect on nuclear transcription factors involved in cell replication and differentiation. (2004) *Brain Res.*, 857: 87-98.
- [48] Dam K, Seidler FJ and Slotkin TA. Transcriptional biomarkers distinguish between vulnerable periods for developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: implications for toxicogenomics. (2003) *Brain Res. Bull.*, 59: 261-265.
- [49] Slotkin TA, Seidler FJ and Fumagalli F. Targeting of neurotrophic factors, their receptors, and signalling pathways in the developmental neurotoxicity of organophosphates in vitro and in vivo. (2008) *Brain Res Bull*, 76: 424-438.
- [50] Patnaik KK and Tripathy NK. Farm-garde chlorpyrifos is genotoxic in somatic and germ-line cells of *Drosophila*. (1992) *Mutat. Res.*, 279: 15-20.
- [51] Seidler FJ, Roy TS, Andrews JE and Slotkin TA. Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. (1999) *Teratology*, 58: 62-68.
- [52] Blakley BR, Yole MJ, Brousseau P, Boermans H and Fournier M. Effect of chlorpyrifos on immune function in rats. (1999) *Vet. Hum. Toxicol.*, 41: 140-144.
- [53] Lee WJ, Blair A, Hoppin JA, Lubin JH, Rusiecki JA, Sandler DP, Dosemeci M and Alavanj MCR. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. (2004) *J. Nat. Cancer Ins.*, 23: 1781-1789.
- [54] Vidyasagar J, Karunakar N, Reddy MS, Rajnarayana K, Surender T and Krishna DR. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorus insecticide poisoning. (2004) *Indian J Pharmacol*, 36: 76-79.
- [55] Lukaszewicz-Hussain A. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity. (2010) *Pestic. Biochem. Physiol.*, 98: 145-150.
- [56] Chambers JE, Carr RL, Boone S and Chambers HW. The metabolism of organophosphorus insecticides, handbook of pesticides toxicology. (2001) *Acad. Press.*, 2: 919-927.
- [57] Rahimi R and Abdollahi M. A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. (2007) *Pestic. Biochem. Physiol.*, 88: 115-121.
- [58] Pincemail J, Bonjeau K, Cayeux K and Defraigne JO. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. (2002) *Nut. Clin.*, 16 : 233-239.
- [59] Arousseau A. les radicaux libres dans l'organisme des animaux d'élevage: conséquences sur la reproduction, la physiologie et la qualité de leurs produits. (2002) *INRA. Prod.*, 15: 67-82.
- [60] Chaudire J. Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in ling cell. (1994) *Free. Radic. Damage Control*: 25-65.

- [61] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. (2006) *Chem. Biol Int.*, 160: 1-40.
- [62] Marnett LJ. Lipid peroxidation DNA damage by malondialdehyde. (1999) *Mutat. Res.*, 424: 83-95.
- [63] Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. (1994) *Am. J. Med.*, 97: 5-13.
- [64] Favier A. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. (2003) *Act. Chi* : 108-115.
- [65] Altieri F, Grillo C, Maceroni M and Chichiarelli S. DNA damage and repair from molecular mechanisms to health implications. (2008) *Antioxi. Redox Signal*, 10: 891-930.
- [66] Jiranusornkul S and Laughton CA. Destabilization of DNA duplex by oxidative damage at guanine: implications for lesion recognition and repair. (2008) *J. SOC.*, 5: 191-198.
- [67] Dedon PC. The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. (2007) *Chem. Res. Toxicol*, 21: 206-219.
- [68] Feng Z, Hu W and Tang MS. Mutational spectrum and genotoxicity of the major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient and deficient human cells. (2003) *Biochemistry*, 42: 7848-7878.
- [69] Cadet J, Douki T, Frelon S, Sauvaigo S, Pouget JP and Ravanat JL. Assessment of oxidative damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS/MS measurement. (2002) *Free. Radic. Biol. Med.*, 33: 441-449.
- [70] Thannickal VJ and Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. (2000) *Am. J. Physiol.*, 279: 1005-1028.
- [71] Pelicano H, Carney D and Huang P. Reactive oxygen species induced stress in cancer cells and therapeutic implications. (2004) *Drug Resist.*, 7: 97-110.
- [72] Liu H, Nishitoh H, Ichijo H and Kyriakis JM. Activation of apoptosis signal-regulating Kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. (2000) *Mol. Cell Biol.*, 20: 2198-2208.
- [73] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. (2002) *Physiol. Rev.*, 82: 47-95.
- [74] Shkalr G. Mechanisms of cancer inhibition by antioxidant nutriment. (1998) *Oral Oncol.*, 9: 24-34.
- [75] Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R and Culotta VC. A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276: 38084-38089.
- [76] Sentman ML, Granstrom M, Jakobson H, Reaume A, Basu S and Marklund SL. Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper and zinc containing superoxide dismutase. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281: 6904-6909.

- [77] Mates JM, Perez-Gomez C and Nunez De Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. (1999) *Clin. Biochem.*, 32: 595-603.
- [78] Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T and Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. (2000) *Biochem. J.*, 351: 183-193.
- [79] Powers SK and Lennon SL. Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. (1999) *Proc. Nutr. Soc.*, 58: 1025-1033.
- [80] Huang TT, Carlson EJ, Kozy HM, Mantha S, Goodman SI, Ursell PC and Epstein CJ. Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice. (2001) *Free. Radic. Biol. Med.*, 31: 1101-1110.
- [81] Ji LL, Fu R and Mitchell EW. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. (1992) *J. Appl. Physiol.*, 73: 1859-1859.
- [82] Packer L, Tritschler HJ and Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. (1997) *Free. Radic. Med.*, 22: 359-378.
- [83] Skulachev VP. Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. (1998) *FEBS. Lett.*, 423: 275-280.
- [84] Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. (2000) *Am. J. Clin. Nutr.*, 72: 647-652.
- [85] Hamamouchi M. Medicinal plants in Morocco: traditional use, marketing and strategies of conservation and increasing value. (2002) *Med. Sci.*, 9: 454-458.
- [86] Dutau G and Rancé F. Allergies au miel et aux produits de la ruche. (2009) *Allergology*, 49 : 16-22.
- [87] Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. (2006) *J. Cancer Prev.*, 7: 22-31.
- [88] Hegazi AG. An overview. Congreso internacional de propoleos. Durante los días 1 y 2 de septiembre de 2000 en Buenos Aires. (2000) *Argentina*.
- [89] Ghedira K, Goetz M and Le jeune R. Propolis, phytothérapie (2009), 7 : 100-105.
- [90] Erica Weinstin T, Giuseppina N, Renata M, Dejair M and Antonio S. Plant origin of green propolis: bee behaviour, plant anatomy and chemistry. (2005) *Evid. Bases Complement. Alternat. Med.*, 2: 85-92.
- [91] Moreira L, Dias LG, Pareira JA and Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis sample from Portugal. (2008) *Food. Chem. Toxicol.*, 46: 3482-3485.
- [92] Lahouel M, Boulkour S, Segueni N and Fillastre JP. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. (2004) *Pathol. Bio.*, 52: 314-322.
- [93] Verkerk R, Schreiner M, Krumbein A, Ciska E, Holst B, Rowland I, Schriever RD, Hansen M, Gerhauser C, Mithen R and Dekker M. Glucosinolates in Brassica vegetables: the influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. (2009) *Mol. Nutr. Food. Res.*, 53: 219-265.

- [94] Paranjape AN and Mehta AA. A study on clinical efficacy of *Lepidium sativum* seeds in treatment of bronchial asthma. (2006) *J. Pharmacol. Ther.*, 5: 55-59.
- [95] Gokavi SS, Malleshi NG and Guo M. Chemical composition of garden cress (*Lepidium Sativum*) seeds and its fractions and use of bran as a functional ingredient. (2004) *Plant. Food. Hum. Nutr.*, 59: 105-111.
- [96] Moser BR, Shah SN, Winkler-Moser JK, Vaughn SF and Evangelista RL. Composition and physical properties of cress (*Lepidium sativum*) and field pennycress (*Thlaspi arvense*) oils. (2009) *Ind. Crop. Prod.*, 30: 199-205.
- [97] Justesen U and Knuthsen P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. (2001) *Food Chem.*, 73: 245-250.
- [98] Zhang Y. Cancer preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. (2004) *Mutat. Res*, 555: 173-190.
- [99] Bettach N, Banoub J and Delmas M. Etude comparative des graines de crucifères du genre *Lepidium*, *Eruca*, *Diplotaxis* et *SinapisII*. Caractérisation des stérois. (1997) *Lipides*, 4: 152-156.
- [100] Eddouks M, Maghrani M, Zeggwagh NA and Michel JB. Study of the hypoglycaemic activity of *Lepidium sativum*, aqueous extract in normal and diabetic rats. (2005) *J Ethnopharmacol*, 97: 391-395.
- [101] Maghrani M, Zeggwagh NA and Eddouks M. Antihypertensive effect of *Lepidium Sativum* in spontaneously hyper-tensive rats. (2005) *J. Ethnopharmacol.*, 100: 193-197.
- [102] Conaway CC, Yang YM and Chung FL. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. (2002) *Curr. Drug. Metab.*, 3: 233-255.
- [103] Kassie F, Rabot S, Uhl M, Huber W, Min Qin H, Helma C, Schulte-Hermann R and Knasmüller S. Chemopreventive effect of garden cress (*Lepidium sativum*) and its constituents towards 2-amino 3-methyl-imedazo [4,5-f] quinoline (IQ)-induced genotoxic effect and clonic preneoplastic lesions. (2002) *Carcinogenesis*, 23: 1155-1161.
- [104] Brunton J. Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. (1993) *Lavoisier TEC et DOC* : 268-277.
- [105] Bankova V, Popova M, Bogdanov S and Sabatini AG. Chemical composition of European propolis. (2002) *Z. Naturforsch.*, 57: 530-533.
- [106] Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F and Jiang Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. (2007) *Food. Chem.*, 102: 771-776.
- [107] Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M and Gazin M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. (1996) *Drug. Res.*, 46:1086-1089.
- [108] Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E and Kefalas, P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). (2005) *Food. Chem.*, 89: 411-420.

- [109] Gunning WT, Kramer PM, Lubet RA, Steele VE, Wouters W and Pereira MA. Chemoprevention of benzo(a)pyrene induced lung tumors in mice by the Farnesyltransferase inhibitor R115777. (2003) *Clin Cancer Res.*, 9: 1927-1930.
- [110] Lahouel M, Boutabet K, Kebsa W and Alyane M. Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. (2010) *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 10: 712-720.
- [111] Mansour SA and Mossa AH. Oxidative damage, biochemical alterations in rats exposed to chlorpyrifos and the antioxidant role of zinc. (2010) *Pestic. Biochem. Physiol.*, 96: 14-23.
- [112] Al-Yahya MA, Mossa JS, Ageel AM and Rafatullah S. Pharmacological and safety evaluation studies on *Lepidium sativum* seeds. (1994) *Phytomedicine*, 1: 155-159.
- [113] Iqbal M, Som DS, Yasumasa O, Masayoshi F and Shgero O. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolising enzymes in male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. (2003) *Pharmacol. Toxicol.*, 92: 33-38.
- [114] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. Protein measurements with the folin phenol reagent. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- [115] Okhawa H, Ohishi N and Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric reaction. (1979) *Anal. Biochem.*, 95: 351-358.
- [116] Ellman GL. Plasma antioxidants. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, 82: 70-77.
- [117] Meister A, Tate SS and Griffith OW. Gamma glutamyl transpeptidase. (1981) *Meth. Enzymol.*, 97: 253-273.
- [118] Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.
- [119] Clairborne A. Catalase activity. In: CRC handbook of methods for oxygen radical research. (1985) *Boca Raton: Greenwald RA*: 283-284.
- [120] Martoja R and Martoja MP. Initiation aux techniques de l'histologie animale. (1967) *Ed Masson & Cie* : 345.
- [121] Lin T and Yang MS. Benzo(a)pyrene induced necrosis in the HepG2 cells via PARP1 activation and NAD⁺ depletion. (2008) *Toxicology*, 245: 147-153.
- [122] Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ and Thompson CB. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. (2004) *Genes. Dev.*, 18: 1272-1282.
- [123] Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coomba C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM and Dawson VL. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase 1 dependent cell death by apoptosis inducing factor. (2002) *Science*, 297: 259-263.
- [124] Guichardant M, Bacot S and Lagarde M. Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique oléagineux. (2006) *Lipides*, 13: 31-34.
- [125] Hodges DM, DeLong JM, Forney CF and Prange RK. Improving the thiobarbituric acid reactive- substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. (1999) *Planta*, 207: 604-611.

- [126] Lefèvre G, Beljean-Leymarie M, Beyerle F, Bonnefont-Rousselot D, Cristol JP, Théron P and Torreilles J. Evaluation of lipid peroxidation by measuring thiobarbituric acid reactive substance. (1998) *Ann. Biol. Clin.*, 56: 305-19.
- [127] Steghens JP, Van Kappel AL, Denis I and Collombel C. Diaminonaphtalene, a new highly specific reagent for HPLC-UV measurement of total and free malone-dialdehyde in human plasma or serum. (2001) *Fre.e Radic. Biol. Med.*, 15: 242-9.
- [128] Boutolleau D, Lefèvre G and Etienne J. Glutathione assay with GSH-400 method: interest of derivative spectrophotometry. (1997) *Biol. Clin.*, 55: 592-596.
- [129] Halliwell B and Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. (2007) *Oxford university Press*, 4: 20-31.
- [130] Morin D, Thiery H, Spedding M and Tillement J. Mitochondria as target for antiischemic drugs. (2001) *J. Physiol. Pharmacol.*, 13: 22-67.
- [131] Lin T and Yang MS. Benzo(a)pyrene induced elevation of GSH level protect against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG2 cells. (2007) *Toxicology*, 235: 1-10.
- [132] Pompella A, De Tat V, Paolicchi A and Zunino F. Expression of g-glutamyltransférase in cancer cells its significance in drug resistance. (2006) *Biochem. Pharmacol.*, 71: 231-238.
- [133] Rajpert-De Meyts E, Shi M, Chang M, Robison TW, Groffen J and Heisterkamp N. Transfection with gamma-glutamyltranspeptidase enhances recovery from glutathione depletion using extracellular glutathione. (1992) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 114: 56-62.
- [134] Pompella A, Visvikis A, De Tata V and Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. (2003) *Biochem. Pharmacol.*, 66: 1499-1503.
- [135] Shi M, Gizal E, Choy HA and Forman HJ. Extracellular glutathione and g-glutamyltranspeptidase prevent H₂O₂ induced injury by 2, 3-dimethoxy-1, 4-naphthoquinone. (1993) *Free. Rad. Biol. Med.*, 15: 57-67.
- [136] Stark AA, Zieger E and Pagano DA. Glutathione metabolism by g-glutamyl transpeptidase leads to lipid peroxidation: characterization of the system and relevance to hepatocarcinogenesis. (1993) *Carcinogenesis*, 14: 183-189.
- [137] Marrs KA. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. (1996) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 127-158.
- [138] Delattre J, Beaudeau JL and Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant: Aspect biologiques et pathologiques. (2005) *Tec &Doc Lavoisier*.
- [139] Padmavathi R, Senthilnathan P, Chodon DS and Sakthisekaram D. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7, 12 dimethylbenzo(a)anthracene induced breast cancer in female Sprague dawley rats. (2006) *Life Sci.*, 24: 2820-2825.
- [140] Ramakrishnan G, Raghavendran HR and Devaki T. Suppression of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis by silymarin in rats. (2007) *Chem. Biol. Interact.*, 161: 104-114.

- [141] You A, Nam CW, Wakabayashi N, Yamamoto M, Kensler TW and Kwak MK. Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of Mdm2: An implication of the regulation of P53 signaling by Nrf2. (2011) *Biochem. Biophys.*, 507: 356-364.
- [142] Faraonio R, Vergara P, Di-Marzo D, Giovanna Pierantoni M, Napolitano M, Russo T and Cimino F. P53 supresses the Nrf2 dependent transcription of antioxidant response genes. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281: 39776-39784.
- [143] De Bandt JP. Redox regulation of gene expression and control by nutrients. (2002) *Nut. Clin. Met.*, 16: 240-247.
- [144] Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, Papa S, Jones J, Alvarez K, Jayawardena S, De Smaele E, Cong R, Beaumont C, Torti FM, Torti SV and Franzoso G. Ferritin heavy chain upregulation by NF-KappaB inhibits TNF alpha induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. (2004) *Cell*, 119: 529-542.
- [145] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM and Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? (2010) *Free. Rad. Biol. Med.*, 49: 1603-1616.
- [146] Zama D, Meraihi Z, Tebibel S, Benayssa W, Benayache F, Benayache S and Vlietinck AJ. Chlorpyrifos induced oxidative stress and tissues damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: The protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. (2007) *Indian J. Pharmacol.*, 39: 145-150.
- [147] Ajay G, Vijayta D and Dhawan DK. Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos induced toxicity. (2005) *Chem. Biol. Inter.*, 156: 131-140.
- [148] Chebab S, Belli N, Leghouchi E and Lahouel M. Stress oxydatif induit par deux pesticides: l'endosulfan et le chlorpyrifos. (2009) *ERS.*, 8 : 425-432.
- [149] Gokce Uzun F, Demir F, Kalender S, Bas H and Kalender Y. Protective effect of catechin and quercetin on chlorpyrifos induced lung toxicity in males rats. (2010) *Food Chem. Toxicol.*, 48: 1714-1720.
- [150] Goel A, Dani V and Dhawan DK. Zinc mediate normalization of hepatic drug metabolizing enzymes in chlorpyrifos induced toxicity. (2007) *Toxicol. Lett.*, 169: 26-33.
- [151] Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernster L and Hochstein P. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. (1999) *Free. Radic. Biol. Med.*, 8: 145-152.
- [152] Mansour SA, Mossa AH. Lipid peroxidation and stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect if zinc. (2009) *Biochem. Phisiol.*, 93: 34-39.
- [153] Yumino K, Kawakami I, Tamura M, Hayashi T and Nakamura M. Paraquat and diquat induced oxygen radical generation and lipid peroxidation in rat brain microsomes. (2002) *J. Biochem.*, 131: 565-570.
- [154] Kanuan K and Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. (2000) *Pathophysiol* 7: 153-163.
- [155] Hayes JD, Flanagan JU and Jowsey IR. Glutathione transferases. (2005) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 51-88.

- [156] El-Sharkawy AM, Abdel Rahman SZ, Hassan AA, Gabr MH, El-Zoghby SM and El-Sewedy SM. Biochemical effects of some insecticides on the metabolic enzymes regulating glutathione metabolism. (1994) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 505-510.
- [157] Verma RS, Mehta A and Srivastava N. Comparative studies on chlorpyrifos and methyl parathion induced oxidative stress in different part of rat brain: Attenuation by antioxidant vitamins. (2009) *Pestic. Biochem. Physiol.*, 95: 152-158.
- [158] Goel A, Dani V and Dhawan DK. Protective effects of Zinc on lipid peroxidation antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos induced toxicity. (2005) *Chem. Biol. Interact.*, 156: 131-140.
- [159] Ojha A, Yaduvanshi SK and Srivastava N. Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. (2011) *Pestic. Biochem. Physiol.*, 99: 148-156.
- [160] Ozcan Oruç E. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. (2010) *Pestic. Biochem. Physiol.*, 96: 160-166.
- [161] Bryan RM, Shailesh NS, Jill KW, Steven FV and Roque LE. Composition and physical properties of cress (*Lepidium sativum*) and field pennycress (*Thlaspi arvense* L) oils. (2009) *Crops Prod.*, 30: 199-205.
- [162] Gee JM and Johnson IT. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. (2001) *Current Med. Chem.*, 8: 1-182.
- [163] Amič D, Davidovic-Amic D, Beslo D and Trinajstić N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. (2003) *Croatica Chemic. Acta.*, 76: 55-61.
- [164] Javanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B and Simic MJ. Flavonoids as antioxidants. (1994) *J. Chem.*, 116: 4846-4851.
- [165] Moskaug J, Carlsen H, Myhrstad MCW and Blomhoff. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. (2005) *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 277-83.
- [166] Paganga G, Miller N and Rice-Evans CA. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. (1999) *Free. Radic. Res.*, 30: 62-153.
- [167] Havsteen B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. (2002) *Pharmacol. Ther.*, 96: 67-202.
- [168] Sanchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. (2002) *J. Food Sci. Technol.*, 8: 121-137.
- [169] Lin JK, Weng MS. Flavonoids as Nutraceuticals. (2006) *Sci. flavonoids*: 217.
- [170] Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC and Suchetet M. Mechanisms involved in the chemoprotective of flavonoids. (2000) *Biofactors*, 12: 193-199.
- [171] Kang JN, Shin SH, Lee HJ and Lee KW. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. (2011) *Pharmacol. Ther.*, 12: 1-15.

- [172] Sugata M, Sudeshna M, Anup R, Sukta D and Chinmay KP. Tea polyphenols can restrict benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis by altered expression of P53-associated genes and H-ras, c-myc and cyclin D1. (2009) *J. Nut. Biochem.*, 20: 337-349.
- [173] Abuelgassim A, Nuha HS and Mohammed AH. Hepatoprotective effect of *Lepidium sativum* against carbon tetrachloride induced damage in rats. (2008) *Res. J. Ani. Vet. Sci.*, 3: 20-23.
- [174] Luostarinen R, Wallin R and Saldeen T. Dietary (n-3) fatty acids increase superoxyde dismutase activity and decrease thromboxane production in the rat heart. (1997) *Nutr. Res.*, 17: 163-175.
- [175] Kang JX and Leaf A. Prevention of total cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. (2000) *Am. J. Nutr.*, 71: 202-207.
- [176] Wang R, Kern JT, Ball D and Luesch H. Activation of antioxidant response element by specific oxidized metabolites of linoleic acid. (2009) *Prostag. Leukotr. Ess.*, 81: 53-59.
- [177] Varady J, Gessner DK, Most E, Eder K and Ringseis R. Dietary moderately oxidized oil activates the Nrf2 signaling pathway in the liver of pigs. (2012) *Lipids Health Dis.*, 11: 1-9.

Contribution à la caractérisation histo-biochimique du stress oxydatif hépatopulmonaire induit par le benzo(a)pyrène ou le chlorpyrifos chez le rat. Recherche de l'effet protecteur des extraits bruts de la propolis et des graines de la plante *Lepidium sativum*.

Résumé

La santé humaine est affectée par la dégradation de l'environnement, notamment, liée à la pollution chimique. Parmi les substances chimiques les plus incriminées, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les pesticides, qui sont respectivement représentés par le Benzo(a)pyrène (B(a)P) et le chlorpyrifos (CPF). Le premier, est l'HAP le plus étudié, c'est un produit commun résultant de la combustion incomplète des matières organiques, alors que le second, est un insecticide organophosphoré très utilisé dans l'agriculture. De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre le mécanisme de toxicité de ces deux produits, mais il reste beaucoup à faire, notamment concernant leurs effets au niveau du foie et du poumon. C'est pourquoi, nous avons tenté d'évaluer biochimiquement et histologiquement les conséquences d'une intoxication hépato-pulmonaire induite par le B(a)P ou le CPF. Nous avons évalué le stress oxydatif, en mesurant les paramètres non enzymatiques du stress oxydatif (taux de malondialdéhyde ou MDA et glutathion réduit ou GSH) et enzymatiques (activités de glutathion-S-transférase ou GST, la catalase ou CAT et gamma glutamyl transpéptidase ou GGT). Nous avons constaté que ces deux xénobiotiques généraient un important stress oxydatif qui se caractérisait par une peroxydation lipidique accrue, une réduction des systèmes antioxydants (GSH, GST, CAT) et une augmentation de l'activité de la GGT. De plus, nous avons observé des changements histologiques très remarquables au niveau des tissus hépatopulmonaires par microscope optique.

En parallèle, nous avons étudié l'effet des extraits bruts alcooliques de la propolis et des graines de la plante *Lepidium sativum* sur la neutralisation des effets toxiques du B(a)p et du CPF. Nous avons constaté que les deux types d'extraits ont un effet protecteur hépatopulmonaire contre le stress oxydatif induit par le B(a)p et le CPF respectivement, et qui pourrait être lié à l'abondance des flavonoïdes dans la propolis ou des acides gras dans la plante *Lepidium sativum*.

Mots clés : Benzo(a)pyrène, chlorpyrifos, stress oxydatif, intoxication hépatopulmonaire, enzymes antioxydantes, changements histologiques, propolis, *Lepidium sativum*.

Abstract

Human health is affected by environmental degradation, in particular, a chemical pollution. Among the most accused chemical substances the polycyclic aromatic hydrocarbons (HAP) and the pesticides which are respectively represented by Benzo(a)pyrene (B(a)P) and chlorpyrifos (CPF). The first is the HAP the most studied; it is a common product resulting from the incomplete combustion of organic matter, whereas the second is an organophosphorus insecticide, largely used in agriculture. Many studies have been made to understand the mechanism of toxicity of these two products, but it remains much to make, in particular concerning their effects on the liver and the lung. This is why, we tried to evaluate biochemically and histologically the consequences of a hepatic-pulmonary intoxication induced by B(a)P or CPF. We evaluated the oxidative stress, by measuring the non-enzymatic parameters of oxidative stress (rate of malondialdehyde or MDA and reduced glutathione or GSH) and enzymatic (activities of glutathione-S-transferase or GST; the catalase or CAT; gamma glutamyl transpéptidase or GGT). We noted that these two xenobiotics generated a significant oxidative stress which characterise by a lipidic peroxidation, a reduction of the antioxidant systems (GSH, GST, CAT) and an increase in the activity of GGT. In addition of these biochemical modifications we observed very remarkable histological changes by optical microscopy.

In parallel, we studied the effect of the extracts of the propolis and plant *Lepidium sativum* on neutralization of the effects of B(a)p and CPF. We noted that the two types of extracts have a protective effect against the oxidative stress induced by B(a)p or the CPF respectively, and who could be related to the abundance of the flavonoids in the propolis or of the fatty acids in the plant *Lepidium sativum*.

Keywords: Benzo(a)pyrene, chlorpyrifos, oxidative stress, hepatic-pulmonary intoxication, antioxidants enzymes, histological changes, propolis, *Lepidium sativum*.

ملخص

تتأثر صحة الإنسان بتلوث المحيط، خاصة بالمواد الكيميائية. من بين هذه المواد نجد الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات والمبيدات الحشرية الممثلة بالترتيب بالبانزوبيران و الكلوربيريفوس. الأول يمثل الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات الأكثر دراسة و هونائج عن الحرق غير التام للمواد العضوية، بينما الثاني مبيد حشري مستعمل كثيرا في الزراعة. عدة دراسات أجريت لفهم الية سمية هذه المركبات، و لكن يبقى الكثير لفهمه، خاصة فيما يخص تأثيرها على الكبد و الرئة. لذلك قمنا بتقدير التغيرات البيوكيميائية و النسيجية في الكبد و الرئة بعد التعرض للبانزوبيران و الكلوربيريفوس. قمنا بتقدير الاجهاد التأكسدي بقياس ثوابت غير انزيمية للاجهاد التأكسدي (مستوى المالوندي ألدهيد و الغلوتاتيون) و انزيمية (الغلوتاتيون ترانسفيراز، الكتلانز و الغاما غلوطاميل ترانسبيبتيداز). لقد اكتشفنا أن هذين المركبين يولدان اجهاد تأكسدي كبير ناتج عن الأوكسدة الدهنية و نقص في النشاط المضادة للأوكسدة و ارتفاع في نشاط الغاما غلوطاميل ترانسبيبتيداز، و كذلك التغيرات النسيجية. و من جهة أخرى قمنا أيضا بدراسة الحماية الناتجة عن استعمال مستخلص البروبوليس و لبيديوم ساتيفوم. لقد وجدنا أن هذين المستخلصين يوفران الحماية ضد الاجهاد التأكسدي و التغيرات النسيجية الناتجة عن التعرض للبانزوبيران و الكلوربيريفوس على الترتيب، و الذي هو راجع ربما الى غنى البروبوليس بالفلافونويد و لبيديوم ساتيفوم بالأحماض الدهنية.

الكلمات المفاتيح: البانزوبيران، الكلوربيريفوس، الاجهاد التأكسدي، تسمم الكبد و الرئة، انزيمات مضادة للأوكسدة، التغيرات النسيجية، البروبوليس، لبيديوم ساتيفوم.