



Université Mohammed Seddik Benyahia - Jijel
Faculté de sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Thèse

Présentée par

M^{me} Brihoum Hadjer

En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat 3^{ème} Cycle (LMD)

Spécialité : BIOLOGIE ET SANTÉ

Option : Biochimie et Biologie Moléculaire

**Préparation et étude des mécanismes pharmacologiques de
nouvelles substances pharmaceutiques pour le traitement du cancer
et de l'inflammation pulmonaire**

Soutenue publiquement le : / / 2018

Membres de Jury:

Président : Pr. RECHRECHE Hocine (Université MSB de Jijel)

Rapporteur : Pr. LAHOUEL Mesbah (Université MSB de Jijel)

Examineurs: Pr. KOCEIR Elhadj-Ahmed (Université USTHB d'Alger)

Dr. SEGUENI Narimane (Université de Constantine 3)

Année universitaire: 2017/2018

Dédicaces

A ma maman et mon papa : Vous resterez la plus importante école de ma vie. Vous avez toujours été là pour moi, et à aucun moment vous n'avez cessé de me couvrir d'amour et d'encouragements dans les différentes étapes de ma vie personnelle et professionnelle. C'est à vous que je dois cette réussite.

A mon Mari, pour avoir réussi à me supporter quotidiennement pendant ces années et particulièrement pendant ces derniers mois de rédaction. Une page se tourne et nous en écrivons de nouvelles.

A mes chers frères Ishak et Djihed, qui m'ont soutenue pendant toutes ces années, chacun à leur manière.

A mes très chères sœurs Nour el Houda (Nouna) et la petite adorable Sarah, qui m'ont toujours aidée, écoutée, soutenue et encouragée tout au long de mon parcours ; celles qui ont toujours été présentes pour moi.

A mon petit cœur Mohamed Djiad (Dadou), dont ta naissance et tes sourires sont venus apporter innocence, sens et espoir à ces belles années de thèse

A mes beaux parents et ma belle famille.

Remerciements

Avant d'exposer mes travaux de recherches, il est nécessaire d'exprimer, avec plaisir, ma reconnaissance et mes remerciements à tous ceux qui m'ont aidé à réaliser ce travail et/ou qui m'ont fait l'honneur de les juger.

En tout premier lieu, je remercie **ALLAH** le tout puissant, de m'avoir donné de la santé, ainsi que l'audace, la patience et le courage pour dépasser toutes les difficultés et accomplir ce travail de thèse.

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à mon Directeur de thèse Pr. **LAHOUEL Mesbah**, Professeur à la Faculté de sciences de la nature et de la vie de l'université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel, directeur et chercheur du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire, celui qui m'a permis d'approfondir un des vastes domaines de la Science. Je vous remercie vivement de m'avoir accompagné tout au long de ce parcours, de m'avoir guidé et enseigné les réflexes du bon chercheur. Votre précieux encadrement, vos encouragements, votre disponibilité, votre gentillesse et vos conseils avisés m'ont permis de fructifier ce travail de recherche. Vos qualités scientifiques et humaines ainsi que votre extraordinaire force de travail font de vous un exemple dont j'espère pouvoir longtemps en profiter.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury : d'abord à monsieur **RECHRECHE Hocine**, Professeur à l'Université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel qui me fait l'honneur de présider ce jury, ensuite à monsieur **KOCEIR Elhadj-Ahmed**, Professeur à l'Université des sciences et de la technologie Houari-Boumédiène (USTHB) d'Alger et madame **SEGUENI Narimane**, Docteur à l'Université de Constantine 3, qui ont accepté d'être les examinateurs de ce jury. Je vous remercie d'être présents et accessibles pour évaluer mon travail de thèse, veuillez trouver en ce travail l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je serai toujours reconnaissante et je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Docteur **Jean Marc LOBACCARO**, professeur à l'Université Clermont Auvergne (France), pour m'avoir accueilli dans son équipe au Laboratoire GReD, de m'avoir aidé avec beaucoup de compétences, de l'aide précieuse qu'il m'a apporté, de m'avoir fait bénéficier de ces connaissances scientifiques, de son soutien et de ces qualités humaines. Un grand merci à monsieur **Silvère BARON** maître de conférences de l'Université Clermont Auvergne et chef d'équipe au laboratoire GReD pour m'avoir accueilli dans au sein de son équipe.

Je tiens à remercier vivement le Dr. **Mohamed El Ayeb**, chef du laboratoire Venins et biomolécules thérapeutiques à l'**Institut Pasteur** de Tunis et **Pr. Naziha MARRAKCHI**, Professeur à la Faculté de Médecine de Tunis et chercheur associé à l'**Institut Pasteur** de Tunis, pour m'avoir accueilli au sein leurs équipes. Je remercie aussi Dr. **Maram Morjen**, poste docteur à l'**institut Pasteur** de Tunis pour son aide concernant la culture cellulaire.

Aussi mes sincères remerciement s'adressent à Dr. **Imene chebout**, d'avoir d'accepter de réaliser les coupes histologique et immunohistologique au sein de son laboratoire d'anapathologie à Bejaia, à Dr. **Saliha Bencharef**, médecin anapath du Centre hospitalier de Jijel pour ces explications et pour sa disponibilité.

J'exprime tous mes remerciements à Dr. **Lamia BENGUEDOUAR**, chercheuse associée au Laboratoire de Toxicologie Moléculaire pour son aide et ces explications et pour sa disponibilité. Je remercie aussi **Mr. yahia BOUSDJIRA** et **Noujoud** pour leurs aides et disponibilités au sein du laboratoire LTM à Jijel.

Je ne peux pas passer sans présenter mes chaleureux remerciements à tous les membres du laboratoire GReD et surtout un grand merci à **Laura** pour sa disponibilité et monsieur **Jean Paul SARU** pour son aide concernant le western blot et **Cristelle SOUBEYRAND-DAMON** pour tout son aide en immunohistologie et surtout sa gentillesse et son sourire permanent.

Je remercie très amicalement mes collègues du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire (docteurs et doctorantes) pour leur encouragement : **Ilhem BENCHOUIEB**, **Nesrine LARICHE**, **Salima AISSAOUI**, **Najiba ABBAS**, **Karima RIANE** et **Hamida BOURIDANE**.

Un immense merci à mon mari **Fathi**, qu'il a toujours trouvé les bons mots pour me faire avancer, s'a présence m'a permis souvent de surmonter les journées difficiles.

Je ne saurais terminer sans remercier mes chers parents qui tiennent une place immense dans mon cœur, sources de mes joies, secret de ma force, pour leurs sacrifices, leur amour et tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

Pour finir, j'exprime ma sincère gratitude envers tous ceux et celles qui m'ont accompagné de près ou de loin à la concrétisation de cette thèse.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
I. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1 Le Cancer pulmonaire induit par le Benzo(a)pyrène (B(a)P).....	3
1.1. Epidémiologie descriptive du cancer du poumon	3
1.2. Les risques cancérigènes des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et du B(a)P	5
1.2.1. Structure et voies d'exposition du B(a)P chez l'homme.....	6
1.2.2. Métabolisme et données toxicologiques du B(a)P.....	8
1.3. Implication de la mitochondrie dans le stress oxydatif et dans l'apoptose responsables de la cancérisation du B(a)P	14
1.3.1. Effet dépendant du stress oxydatif.....	14
1.3.2. Effet indépendant du stress oxydatif.....	19
1.3.3. Régulation des protéines apoptotiques.....	21
1.3.3.1. Expression et ciblage des Caspases 3	22
1.3.3.2. Régulation des protéines de la famille Bcl2/Bax.....	23
1.4. Rôle de l'inflammation dans le développement du cancer pulmonaire	25
1.4.1. Lien moléculaire entre l'inflammation et le cancer.....	26
1.4.2. Implication du facteur de transcription NF- κ B et de Cyclooxygénase COX-2 dans la voie de signalisation.....	27
1.5. Traitement du cancer pulmonaire par la chimiothérapie	30
1.5.1. Caractéristique pharmacologique du FEC (5-fluorouracile, éprubicine et cyclophosphamide)	31
1.5.2. Toxicité du FEC.....	33
I.2. Les polyphénols de la Propolis	35
2.1. Origine, composition chimique et caractère physicochimique de la propolis...	35
2.2. Propriétés biologiques et thérapeutiques de la propolis.....	38
2.2.1. Les flavonoïdes de la propolis Algérienne.....	40
2.2.2. Effet antioxydant.....	45
2.2.3. Effet anti-inflammatoire.. ..	47
2.2.4. Effet cytotoxique et anticancéreux.....	47
2.2.5. Effets chimiopréventif et protecteur contre la toxicité des médicaments anticancéreux.....	49

II. MATERIEL ET METHODES

II. 1. Matériel	51
1.1. Récolte et préparation des extraits éthanoliques de propolis pour les études in vivo et in vitro	51
1.2. Produits chimiques.....	51
II. 2. Traitement des animaux.....	52
2.1. Espèce animale utilisée et conditions d'hébergement des animaux.....	52
2.2. Induction de la pathologie expérimentale : le cancer pulmonaire.....	52
2.3. Traitement des animaux par la propolis et les anticancéreux.....	52
2.4. Prélèvement des tissus et liquides biologiques.....	53
II. 3. Etude in vitro.....	54
3.1. Mesure du stress sur mitochondrie isolée.....	54
3.1.1. Isolement des mitochondries pulmonaires.....	54
3.1.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976)	54
3.1.3. Mesure de la production d'O ₂ ⁻ par la mitochondrie.....	55
3.1.4. Mise en évidence de l'ouverture de PTP: gonflement mitochondriale (swelling).....	55
3.2. Etude chimique de la propolis : Activité anti-radicalaire par le test au DPPH°.....	55
3.3. Etude de l'effet de l'extrait éthanolique de la propolis sur les cellules pulmonaires	56
3.3.1. Culture cellulaire et entretien de la lignée cellulaire	56
3.3.2. Test de viabilité cellulaire (MTT)	58
3.3.3. Test de prolifération cellulaire	58
3.3.4. Test d'adhésion cellulaire	59
3.3.5. Test de viabilité cellulaire pré-incubé au B(a)P	59
II.4. Etude in vivo.....	60
4.1. Dosage sérique: mesure des marqueurs enzymatiques : LDH et GGT.....	60
4.2. Dosages tissulaires: Evaluation de l'état du stress oxydatif	60
4.2.1. Mesure des capacités antioxydantes enzymatiques.....	60
4.2.1.1. Extraction de la fraction cytosolique.....	60
4.2.1.2. Dosage de l'activité de la (SOD).....	60
4.2.1.3. Dosage de l'activité de la catalase (CAT).....	61
4.2.1.4. Dosage de la glutathion-S-transférase cytosolique (GST).....	62
4.2.2 Mesure des capacités antioxydantes non enzymatiques : glutathion (GSH).....	62
4.2.3. Mesure des dégâts oxydatifs cellulaires : dosage du MDA.....	63

4.3. Détermination de l'expression des protéines apoptotiques dans le tissu pulmonaire.....	63
4.3.1. Préparation de l'extrait de protéine cytosolique.....	63
4.3.2. Immunodétection des protéines par western-blot.....	64
4.3.3. Immunohistochimie.....	64
4.4. Examen anatomopathologique.....	65
4.4.1. Examen macroscopique des poumons.....	65
4.4.2. Examen microscopique des poumons.....	65
4.5. Traitement statistique.....	66
RESULTATS & DISCUSSION.....	67
CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	130
ANNEXES.....	157

Table des illustrations

Liste des Figures

Figure 1 : Formule chimique du benzo(a)pyrène.....	6
Figure 2 : Principales voies de métabolisation du B(a)P.....	9
Figure 3 : Les étapes de métabolisation du B(a)P en métabolites réactifs sous l'action des enzymes de phase I et de phase II.....	9
Figure 4 : Induction des gènes de métabolisme du benzo(a)pyrène CYP1A1 et CYP1B1.....	10
Figure 5 : Formation du radical cation.....	11
Figure 6 : voie d'activation du B(a)P en diol-époxydes.....	12
Figure 7 : Voie des quinones.....	13
Figure 8: Les principales enzymes antioxydantes.....	19
Figure 9 : Schéma simplifié de la structure des protéines de la famille Bcl-2.....	24
Figure 10: Voies de signalisation impliquées dans le cancer induit par l'inflammation....	27
Figure 11: Un résumé illustratif de la voie d'activation du facteur nucléaire NF-κB.....	28
Figure 12 : Structure de base chimique des différentes classes de flavonoïdes.....	41
Figure 13 : Métabolisme et distribution des flavonoïdes chez l'homme.....	43
Figure 14 : Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité élevée de piégeage des radicaux libres.....	46
Figure 15 : Protocole et durée du traitement des animaux.....	53
Figure 16 : Evolution de l'activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique de la Propolis (EEP) et de la Quercétine en fonction de la concentration.....	71
Figure 17 : Variation des concentrations du MDA dans les différents groupes traités.....	73
Figure 18: Variation des concentrations du GSH dans les différents groupes traités.....	75
Figure 19: Variation des concentrations de la SOD dans les différents groupes traités....	77
Figure 20: Variation des concentrations de la CAT dans les différents groupes traités....	78
Figure 21: Variation des concentrations du GST dans les différents groupes traités.....	81

Figure 22: Examen macroscopique des poumons des différents groupes.....	83
Figure 23: Photomicrographie de l'examen histopathologique des poumons des rats (hématoxyline & éosine).....	84
Figure 24 : Effet de la propolis sur le marqueur général de prolifération Ki-67.....	87
Figure 25 : Expression du PCNA dans le tissu pulmonaire mesuré par <i>western blot</i>	88
Figure 26 : Effet de l'EEP et du B(a)P sur l'accumulation des protéines Bcl-2/Bax dans le tissu pulmonaire de rat.....	90
Figure 27 : Effet de l'EEP et du B(a)P sur l'expression des protéines Caspase 3 clivée par analyse par <i>western blot</i> des poumons des différents groupes d'animaux.....	94
Figure 28: Effet de l'EEP sur l'expression de la protéine NOS 3 dans le tissu pulmonaire de rat	96
Figure 29 : Effet de l'EEP et du B(a)P sur l'expression des protéines Caspase 3 clivées analysées par <i>western blot</i> des poumons	99
Figure 30: Variations des taux du MDA cytosolique des rats traités par le B(a)P, les anticancéreux et la propolis.....	105
Figure 31 : Variations des taux de la GSH cytosolique de rats traités par le B(a)P, les anticancéreux et la propolis.....	108
Figure 32: Variations des taux des antioxydants enzymatiques des rats traités par le B(a)P, les anticancéreux et la propolis.....	109
Figure 33 : Examen macroscopique des poumons des différents groupes.....	111
Figure 34: Photomicrographie de l'examen histopathologique des poumons des rats (hématoxyline & éosine) (x100).....	112
Figure 35: Production de l'anion superoxyde par les mitochondries pulmonaires en présence du B(a)P à différentes concentrations.....	114
Figure 36 : Effet <i>in vitro</i> du B(a)P à différentes concentrations sur le gonflement mitochondrial pulmonaire.....	116
Figure 37: Production de l'anion superoxyde par les mitochondries pulmonaires en présence de l'extrait éthanolique de propolis à différentes concentrations.....	118
Figure 38 : Effet <i>in vitro</i> de l'EEP à différentes concentrations sur le gonflement mitochondrial pulmonaire	118
Figure 39 : Effet de différentes concentrations de l'extrait éthanolique de propolis sur la viabilité cellulaire des A549 à 24h et 72h de traitement.....	120

Figure 40 : Photomicrographie des cellules A549 après incubation pendant 72h avec l'extrait éthanolique de propolis à différentes concentrations.....	123
Figure 41 : Effet de l'EEP sur la viabilité de cellule A549 pré-traitées par le B(a)P.....	124
Figure 42 : Effet de l'EEP sur l'adhésion des cellules A549.....	126

Liste des tableaux

Tableau1: Classification histologique des tumeurs pulmonaires épithéliales	4
Tableau 2: Concentrations du B(a)P détectés dans différents échantillons.....	7
Tableau 3: Les types de propolis les plus répandus: origine des plantes et leurs constituants majeurs.....	38
Tableau 4 : influence de l'administration de l'extrait éthanolique de propolis sur le poids des poumons et sur le poids corporelle	67
Tableau 5: effet de la propolis sur l'activité des marqueurs enzymatiques du sérum des différents groupes.....	69
Tableau 6 : influence de l'administration de l'extrait éthanolique de propolis sur le poids des poumons et sur le poids corporelle.....	101
Tableau 7: effet de la propolis sur l'activité des marqueurs enzymatiques du sérum des différents groupes.....	103

Liste des abréviations

ADNmt	ADN mitochondrial
AHH	Aryle Hydrocarbone Hydrolase
AhR	Aryle hydrocarbone Receptor
AKR	Aldo-kéto réductases
ARNT	Aryl hydrocarbon nuclear translocator
B(a)P	Benzo(a)pyrène
BPDE	B(a)P 7,8-diol-9,10-époxyde
CAPE	Caffeic Acid Phenethyl Ester
CASPASE	Cystéines Asp protéases
CAT	Catalase
CBPC	Carcinomes bronchiques à petites cellules
CBNPC	Carcinomes broncho-pulmonaire non à petite cellules
Coll I	Collagène I
COX-2	Cyclo-oxygénase-2
CP	Cyclophosphamide
DPPH	2.2 diphenyl 1 picryl hydrazyl
EH	Epoxyde hydrolase
EPI	Epirubicine
FG	Fibrinogène
GR	Glutathion réductase
GRx	Glutathion peroxydase
GST	Glutathion S-transférases
GGT	Gamma glutamyl transpeptidase
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCC	Carcinomes hépatocellulaires
HSP	Heat Shock Protein
H₂O₂	Péroxyde d'hydrogène
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IHC	Immunohistochimie
IκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IKK	IκB kinase

iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
LDH	Lactate déshydrogénase
LPO	peroxydation lipidique
MDA	Malondialdéhyde
MEC	Matrice extracellulaire
MPTP	Perméabilité du pore de transition de la mitochondrie
MOMP	Membrane externe mitochondriale
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Oxyde nitrique
NOS	Oxyde nitrique synthase
NSCLC	Carcinome pulmonaire non à petites cellules
PCNA	Antigène nucléaire de prolifération cellulaire
PL	poly-L Lysine
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive Oxygen Species
ROW	Poids relative des poumons
RPMI	Roswell Park Memoriel Institute
SOD	Superoxyde dismutase
TBARS	Substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VDAC	Voltage-dependent anion channels

Le cancer est une maladie redoutée, souvent perçue comme « la pire des maladies ». Il existe plus d'une centaine de variétés de cancer, qui peuvent se loger dans différents tissus et organes. Le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer chez les deux sexes dans le monde (Tao et al., 2016) avec un taux de 1,38 million et d'environ 1,8 million de nouveau cas enregistré chaque année (Nie et al., 2016).

Différentes études ont démontré que l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et notamment le benzo(a)pyrène (B(a)P) peut augmenter le risque d'apparition du cancer pulmonaire. Le B(a)P, un cancérigène issu de phénomènes de combustion (ex tabagisme, charbon et pétrole utilisés en industrie) est une substance pro-cancérigène importante. Son activation métabolique principalement par le cytochrome P450 génère 7,8-diol-9,10-époxy-benzo(a)pyrène, qui est considéré comme le métabolite cancérigène ultime de B(a)P. Au cours des processus métaboliques, ce dernier peut être directement ou indirectement métabolisé en radicaux libres.

Le cancer pulmonaire peut être traité par la chirurgie, par la radiothérapie ou par la chimiothérapie. L'utilisation des médicaments anticancéreux qui vise à détruire les cellules en division pour éviter la prolifération des cellules tumorales, est limitée en raison de leurs effets secondaires puisqu'elle ne cible pas seulement les cellules tumorales mais touchent toutes les cellules en cours de prolifération et qui retentissent directement sur la qualité de vie des patients. Ainsi, les nouvelles études sont orientées vers la recherche de molécules biologiquement actives afin de développer de nouveaux traitements anti-cancéreux et d'améliorer les traitements conventionnels.

Avec cette approche nous nous sommes intéressés à un composé issu des produits de l'abeille qui est la propolis, révélé utile dans la thérapie et la prévention du cancer. Ce produit naturel apicole connu depuis l'antiquité, est un complexe de composés chimiques bioactifs, dont plusieurs sont avérés des inhibiteurs de la tumorigénèse (Banskota et al., 2001) et des puissants antioxydants, parmi lesquelles on peut distinguer les polyphénols, spécifiquement les flavonoïdes, ainsi que les acides phénoliques et certains composés terpénoïdes.

L'origine géographique et le lieu de la collecte ainsi que la disponibilité de différentes sources végétales utilisées par les abeilles, influent considérablement la composition chimique de la propolis. Deux différents types de propolis algérienne ont été trouvés, directement liés à leurs constituants: type polyphénol, riche en composés polyphénoliques, et le type diterpène, source abondante en diterpènes (Piccinelli et al., 2013). Notre propolis jjiilienne figure dans le premier type, caractérisé par des quantités relativement élevées de flavonoïdes et une faible teneur en diterpène.

Les flavonoïdes ont été largement étudiés surtout pour leur richesse en antioxydants et leurs capacités à prévenir la formation des radicaux libres. Il a été montré dans une étude préalablement réalisée par notre équipe de recherche, que la propolis jijilienne possède des effets antioxydants et antiprolifératifs contre le mélanome (Benguedouar et al., 2016) et contre le carcinome prostatique, mais pas encore sur le cancer bronchique.

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer l'effet de l'extrait éthanolique de la propolis Algérienne de la région de Jijel, sur le cancer bronchique au cours de différents protocoles de traitement in vivo et in vitro.

Dans la première partie, nous avons sélectionné un modèle de cancer pulmonaire adapté à notre étude sur les rats Wistar albinos en utilisant du B(a)P et dont les résultats permettant de nous renseigner sur l'effet pro-oxydant et génotoxique de ce dernier. Nous avons tenté de déterminer l'activité antioxydante et protectrice de notre extrait de propolis sur les tissus pulmonaire contre un stress oxydatif induit par le B(a)P et/ou par les médicaments anticancéreux : le 5-Fluorouracil, l'épirubicine et le cyclophosphamide et ce en explorant les systèmes de détoxification antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Nous avons aussi étudié les mécanismes apoptotique en ciblant les protéines de l'apoptose Bcl2/Bax et les Caspase Clivé 3 afin d'essayer de comprendre l'effet de notre complexe apicole sur l'inhibition d'induction du cancer et du processus de transformation néoplasique par le carcinogènes B(a)P. les médiateurs pro-inflammatoire ont été aussi étudié dans notre thèse afin de mettre en évidence la chimioprévention de la propolis par modulation des mécanismes inflammatoires à travers un certain nombre de voies, conduisant à l'inflammation qui joue un rôle critique dans le processus de cancérogenèse et de progression tumorale.

Nous allons, dans la deuxième partie évaluer l'effet de différentes concentrations de la propolis de Jijel et celui du B(a)P sur les mitochondries pulmonaires isolées en élaborant l'apoptose par la mesure du gonflement mitochondriale ainsi que la production de RLO (O_2°). Dans la dernière partie, nous allons rechercher un effet toxique éventuel de notre propolis sur des cellules d'adénocarcinome bronchique humain (A549), un effet qui pourrait contribuer à l'efficacité thérapeutique de ce produit naturel, par la mesure de la viabilité et de la prolifération des cellules A549 en présence ou non de différentes concentrations de l'extrait éthanolique de la propolis sans ou en présence du B(a)P. Nous allons aussi évaluer l'effet des concentrations croissantes de la propolis sur l'adhésion cellulaire qui est une étape crucial de l'angiogénèse et de la progression du cancer, en utilisant des protéines de la matrice extra cellulaire (MEC) purifiées à savoir le fibrinogène (Fg), le collagène I (Coll I) et la poly-L Lysine(PL)

I.1. Cancer pulmonaire induit par le Benzo(a)pyrène (B(a)P)

1.1. Epidémiologie descriptive du cancer du poumon :

Le cancer du poumon, connu aussi sous le nom de cancer broncho-pulmonaire ou carcinome pulmonaire est un type de tumeur maligne du tissu pulmonaire (Yang et al., 2016), considéré comme l'une des maladies les plus importantes en médecine respiratoire (Silva et al., 2007) et comme la principale cause de décès par cancer chez l'homme et la femme dans le monde (Feng et al., 2016; Tao et al., 2016) avec environ 1,8 million de nouveau cas enregistré chaque année (Nie et al., 2016).

Une classification des tumeurs du poumon ; tous issues du conduit bronchique mais qui peuvent différer par certaines caractéristiques cliniques ou histologiques; est basée sur une nomenclature dont les termes ont été établis en 1967 et réactualisé par l'organisation mondiale de la santé (OMS). Pour la classification de ces tumeurs (tableau 1) (Travis et al., 2004), les carcinomes bronchiques à petites cellules (CBPC) et les carcinomes broncho-pulmonaire non à petite cellule (CBNPC) avec ces trois principales catégories : carcinome épidermoïde ou squameux (Sq), les adénocarcinomes (AC), les carcinomes à grandes cellules (CPGC) sont les quatre sous-types histologiques qui représentent plus de 90% des cas de cancer pulmonaire. La majorité des patients ont un CBNPC avec un pourcentage de 85-90% des cancers broncho-pulmonaires (Lehman, 2016; Nie et al., 2016; Tao et al., 2016) et environ 30% de ces patients représentent un cancer de stade III (Tokito et al., 2016).

Considéré comme l'un des cancers les plus meurtriers avec un faible taux de survie ; uniquement 15% des patients atteints, peuvent survivre pour 5 ans (Tao et al., 2016) et plus de 85% meurt après 1 à 2 ans du diagnostic ; à cause d'une dissémination extrathoracique (Rivera et al., 2011) et des métastases au niveau du foie, des ganglions lymphatique, des glandes surrénales, des os et du cerveau (Zhang et al., 2016).

Le cancer du poumon est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué au monde avec un taux de 29% de tous les cancers. Depuis 1985, l'incidence globale de la mortalité liée au cancer du poumon a dépassé celles de tous les autres cancers. En 2010, il a été classé comme le cinquième en termes de fréquence de décès à l'échelle mondiale, devant le VIH (sixième), la tuberculose (10), et le paludisme (11) (Rodin et al., 2016) avec 1,38 million de décès, qui représente 19% de tous les décès liés au cancer (Harir et al., 2015).

Tableau1 : Classification histologique des tumeurs pulmonaires épithéliales

Tumeurs bénignes	Papillome*	
	Adénome*	
Tumeurs malignes	Carcinome épidermoïde	-Papillaire -A cellules claires -A petites cellules -Basaloïde
	Carcinome à petites cellules	-Carcinome à petites cellules composite
	Adénocarcinome	-Acineux -Papillaire -Bronchiolo-alvéolaire* -Adénocarcinome solide à sécrétion mucineuse -Mixtes
Tumeurs malignes	Carcinome à grande cellule*	
	Carcinome adénoquameux	
	Carcinome sarcomatoïde ou avec éléments sarcomateux*	
	Tumeur carcinoïde*	
	Carcinome de type glandes salivaires*	
	Carcinomes inclassables	

NB : * la classification supplémentaires est non rapportés dans ce tableau

Le taux d'incidence est généralement plus élevé dans les pays développés, et plus faible dans les pays sous-développés (Cheng et al., 2016). Dans le monde arabe les taux d'incidence et de mortalité sont encore faibles par rapport au Etats-Unis ou le cancer pulmonaire est devenu la première cause de décès par cancer chez les deux sexes (Harir et al., 2015). Les taux de mortalité les plus élevés dans le monde arabe ont été estimés dans les pays arabes d'Afrique du Nord, l'incidence en Algérie est moins faible que celle de la Tunisie et du Maroc. Cette incidence était plus au moins stable de 1986 jusqu'au 2003, puis une augmentation à été enregistré ces dernière années puisqu'elle est passé de 1,7 pour 100000 en 2003 à 4 pour 100000 en 2010 (Hamdi Cherif et al., 2014).

En plus de la région géographique de résidence, le taux d'incidence varie aussi en fonction de l'âge et du sexe (Cheng et al., 2016). La courbe de progression du nombre de cas est d'abord apparue chez les hommes, pour ensuite augmenter aussi chez les femmes (représente 17% et 9% de tous les cancers chez les hommes et les femmes, respectivement). Dans la population arabe, un pourcentage de 83 % chez les hommes et 16,5 % chez les femmes à été enregistré parmi les 15421 de mort par cancer du poumon (Harir et al., 2014).

En Algérie le taux d'incidence brute est estimé de 14,9/100000 alors que l'incidence standardisée est de 22,7/100000, chez l'homme. Cette incidence est 6 fois supérieure à celle de la femme (Hamdi Cherif et al., 2014), cependant elle n'est pas la même dans toutes les régions d'Algérie car dans l'ouest, le sex-ratio est près de 11,86: 1 qui est l'un des plus élevés au monde (Harir et al., 2014). En Algérie l'âge moyen chez l'homme est de 61 ans (est le cancer le plus commun entre l'âge de 50 et 70 ans) (Hamdi Cherif et al., 2014).

1.2. Les risques cancérigènes des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et du B(a)P:

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que l'exposition aux HAP peut augmenter le risque d'apparition de plusieurs cancers comme celui du poumon, de la peau et de la vessie.

Les HAPs sont des molécules constituées de carbone et d'hydrogène dont la structure comporte de 02 à 08 cycles aromatiques condensés (Fujimori and Fujino, 2013), ils forment une famille chimique comprenant plus de 400 composés et dérivés (Cai et al., 2016) et constituent l'un des importants polluants ubiquitaires environnementales issus de la combustion incomplète de la matière organique. Les principales sources d'exposition de la population aux HAP avec un taux de 90% sont les sources anthropiques (sources domestiques, sources industrielles) et les sources naturelles (les éruptions volcaniques et les feux de forêts).

Les HAP sont des molécules biologiquement actives, ils se transforment en époxydes (composés très toxiques) dans les tissus de l'organisme, responsable de l'effet cancérigène dont le poumon est la cible principale. Certains membres de famille des HAP ont été classés par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) comme cancérigènes exemple du benzo(a)pyrène (B(a)P), tandis que d'autres ont été classés comme cancérigènes probables, possible ou non cancérigène pour l'homme (IARC, 2010).

Les études ont montrées que la plupart des HAP qu'on respire proviennent de la fumée de tabac qui contient une soixantaines d'éléments cancérigènes dont ces HAPs (Hecht, 2002). Le tabagisme qui selon des études échelonnées sur plusieurs années, continue d'être la principale cause des tumeurs cancéreuses du poumon dans le monde entier. Pour les hommes et les femmes, le tabagisme provoque plus de 90% et 70% des décès par cancer du poumon, respectivement, dans les pays développés, tandis que dans le restes des pays, il est d'environ 65% chez les hommes et 25% chez les femmes (Cheng et al., 2016).

L'impacte prédominant au risque de développer un cancer du poumon est la durée du tabagisme au quel s'ajoute la quantité cumulée, l'âge au début de la consommation et le type du produit consommé (Rogot et Murray, 1980). L'OMS estime que l'indice global augmente

d'un taux de 0,5% par an en raison de la propagation d'épidémie de tabagisme dans les pays en développement (Hamdi-Cherif et al., 2014). L'incidence est largement déterminée par la prévalence et la durée du tabagisme, cette prévalence chez les hommes africains est 5 à 10 fois plus élevée que chez les femmes en Afrique (Cheng et al., 2016) alors qu'en Algérie, entre 1978 et 2005 la prévalence a augmenté de 7,7 % à 28,6 % (Hamdi-Cherif et al., 2014).

1.2.1. Structure et voies d'exposition du B(a)P chez l'homme :

Le B(a)P est le plus connu parmi les centaines d'HAP et le plus étudié dans la population humaine (Kasala et al., 2016), avec un poids moléculaire de 252.32 g/mol, un point de fusion de 181,1°C et une densité de 1,351 g/cm³. Il présente une faible solubilité dans l'eau alors qu'il est très soluble dans les solvants organiques comme le benzène, toluène et le xylène.

Ce composé chimique est formé de cinq noyaux aromatiques (benzène) (figure 1) sa formule brute est C₂₀H₁₂ et est considéré comme étant très réactive avec ces deux régions ou sites de réactions chimiques : la région k comprise entre le quatrième et cinquième carbone et la région baie comprise entre le neuvième et le douzième carbone. Le carbone 10 est considéré comme le centre actif (α -carbone) en tant que son emplacement se trouve dans la position benzylique à haute réactivité (Miller et Ramos, 2001).

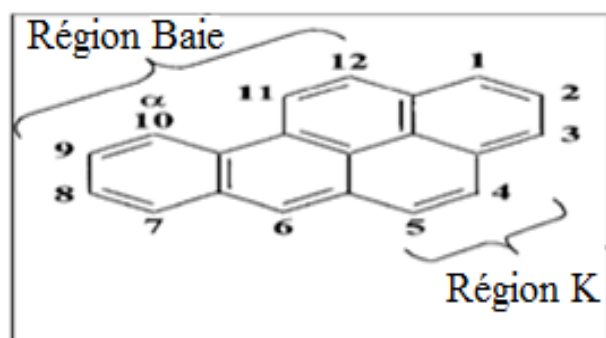


Figure 1 : Formule chimique du benzo(a)pyrène (Miller et Ramos, 2001).

Le B(a)P est le membre prototypique et le mieux caractérisé des HAP, il est omniprésent dans l'environnement puisqu'il provient de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de différentes sources organiques, naturelles ou anthropiques. Les incendies de forêt, les éruptions volcaniques (Gerger and Weber, 2015) ainsi que le dépôt du B(a)P sur des sédiments, font partie des sources naturelles. Outre cette origine naturelle, les activités de l'homme tels que les effluents urbains, échappement des automobiles, les déversements et les opérations pétrolière (raffinage du pétrole et du schiste) (Gerger and Weber, 2015), le transport maritime (Cai et al., 2016), l'incinération des déchets municipaux (Xia et al., 2016) et les produits de l'industrie métallurgique, la fabrication et utilisation des électrodes, les

cokeries, fabrication de charbon, nettoyage des fours et tuyauteries, revêtements des routiers et toute source d'énergie et de chaleur (chauffage domestique) conduisent à la combustion des sources anthropiques. Le tableau 2 donne un aperçu du contenu du benzo(a)pyréne dans différents échantillons.

Tableau 2: Concentrations du B(a)P détectés dans différents échantillons (Juhasz et Naidu, 2000).

Type d'échantillon	Concentration du B(a)P
Air :	
ville	1 – 500 ng/m ³
industrie niveau moyen	100 – 1000 ng/m ³
industrie niveau élevés	> 10 000 ng/m ³
sol	100 – 55000 ug/kg
sédiments	0,07 – 1100 mg/kg
l'eau de robinet	2,5 – 9 ng/ L
organismes marins :	
moules	3 – 329 ng/g
poissons	7 – 22 ng/g
algues	2 – 64 mg/g
aliments	100 – 20000 ng/kg

Les trois voies d'expositions à cette HAP sont la voie digestive et la voie respiratoire qui sont les plus importantes ainsi que la voie cutanée qui est occasionnel. Chez les non fumeurs la principale source du B(a)P est la voie digestive, caractérisée par l'ingestion d'eau et d'aliments contaminés par les effluents de combustion (Wakx et al., 2016). Une forte accumulation du B(a)P dans les aliments par dépôt sur les espèces végétales et animales ou encore au cours de la cuisson de ces derniers et de leurs transformation (tels que les viandes et poissons grillés près de la flamme ou fumés artisanalement) (Kazerouni et al., 2001). Les produits alimentaires tels que les produits céréaliers, le café torréfié et le thé, la croûte carbonisée du pain et des biscuits contribue aussi à l'exposition quotidienne au B(a)P. Une personne ingère en moyenne environ 76 ng /jour de B(a)P (Kasala et al., 2015).

La voie respiratoire ; autre voie d'exposition à prendre en compte, elle concerne beaucoup plus les fumeurs du fait que la fumée du tabac contribue substantiellement à l'exposition sachant qu'une personne fumant une cigarette par jour absorbe en moyenne 9 ng de B(a)P

quotidiennement (Kasala et al., 2015). La pollution atmosphérique fait partie aussi de l'exposition par cette voie. Plusieurs sources peuvent être la cause d'air pollué comme les émissions anthropiques : la fumée d'incinération des déchets domestiques, de chauffage résidentiel, des feux de décharge, des feux de forêts et des incendies de bâtiments.

Enfin, la voie cutanée qui est relativement restreinte, est considérée comme principale voie d'exposition aux toxiques non ou peu volatiles comme le cas du B(a)P, ce dernier va migrer à partir d'air et des surfaces exposées vers les lipides de la surface de la peau après il traverse la couche cornée et l'épiderme pour se retrouver ensuite dans les organes et tissu corporel bien irrigués en quelques minutes (Weschler and Nazaroff, 2013).

1.2.2. Métabolisme et données toxicologique :

- **Absorption et distribution :**

Etant donné que le B(a)P est liposoluble, il est rapidement absorbé par l'organisme quelle que soit la voie de contact : digestive, pulmonaire ou cutanée.

Par voie orale un pourcentage de 30 à 50% de B(a)P sont facilement absorbé chez le rat (Withey et al., 1991). Lorsque le B(a)P se présente sous forme de soluté dans les lipides alimentaires, son absorption sera facile par tractus gastro-intestinale et cela du fait de la présence de sel biliaire dans la lumière intestinale. Le B(a)P semble traverser la paroi intestinale par diffusion passive. Après l'inhalation du B(a)P une absorption rapide et une distribution dans les divers organes a été reporté. Cette absorption dépend du solvant utilisé pour l'administration et de la taille des particules. Une absorption par la peau a été démontrée chez les souris et les rats ainsi que chez les humains (Kao et al., 1985).

Sa distribution dans tout l'organisme est rapide et sa répartition est similaire quel que soit le mode et la voie d'administration chez les rats et souris. Etant très liposoluble et non polaire, le B(a)P une fois dans le corps peut se concentrer dans les organes riches en lipides comme le foie, là où se trouvent les taux les plus élevés de cette HAP, il peut aussi être stocké dans les tissus mammaires et autres tissus adipeux (Modica et al., 1983) pendant plusieurs années, pour ensuite être progressivement relargué dans la circulation sanguine.

Il est évident qu'après une exposition respiratoire au B(a)P, il sera stocké dans le poumon. Ce dernier peut le stocker même après une injection intraveineuse étant donné qu'il reçoit la totalité du débit cardiaque et donc sera le premier à être en contact avec la dose intraveineuse après le cœur (Marie et al., 2010).

- **Activation :**

Après l'absorption du B(a)P dans l'organisme par les différentes voies, il est pris en charge par le système enzymatique de métabolisation. Une fois dans la cellule, le B(a)P est

biotransformé et activé (figure 2) générant un grand nombre de métabolites sous l'action des enzymes des phases I et II (Figure 3): époxydes, phénols, hydrodiols, des métabolites conjugués au glutathion, à l'acide glucuronique et au sulfate.

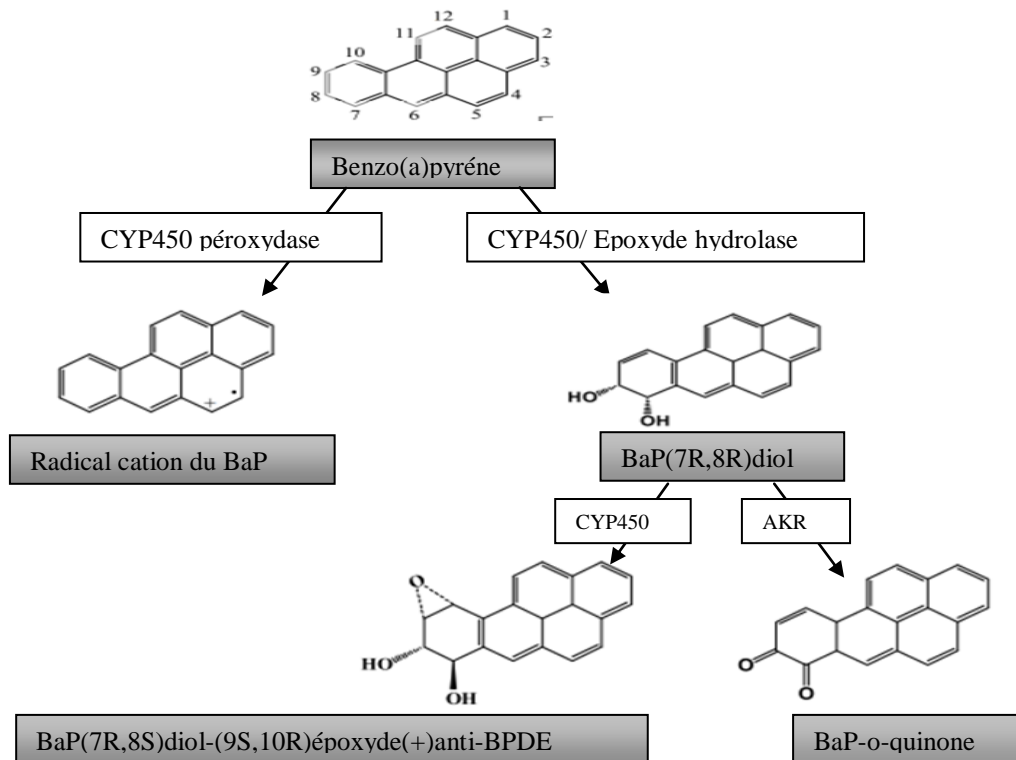


Figure 2 : Principales voies de métabolisation du B(a)P

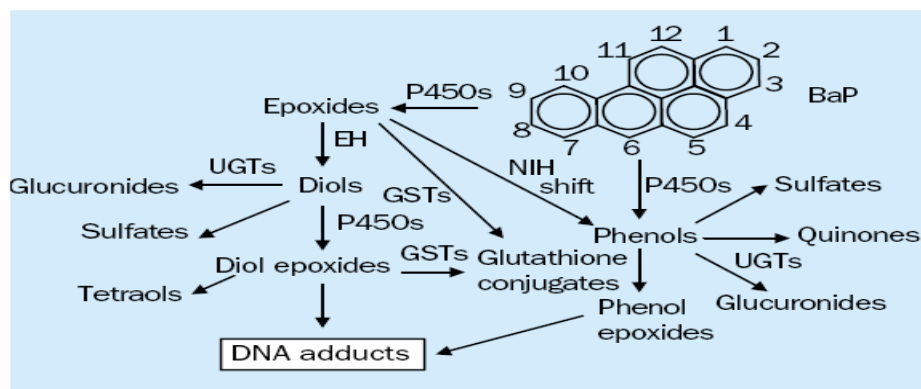


Figure 3 : Les étapes de métabolisation du B(a)P en métabolites réactifs sous l'action des enzymes de phase I et de phase II (Hecht, 2002)

Le processus de métabolisation est initié par une induction des enzymes de métabolisation (figure 4). lorsque le B(a)P entre dans la cellule en traversant la membrane plasmique, il se lie directement à son récepteur Ah (Aryl hydrocarbon) qui est un récepteur nucléaire faisant partie de la famille bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix/Per-Arnt-Sim) (Billiard et al., 2002), cette liaison va engendré la dissociation de l'AhR des protéines chaperonnes du type HSP90

et l'induction de la translocation du complexe AhR-B(a)P dans le noyau, pour former un hétérodimère avec l'ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator). Ce dernier va se lier à l'XRE (élément de réponse aux xénobiotiques) dans les promoteurs de gènes cibles codant pour plusieurs enzymes des phases I et II de métabolisation (Hakura et al., 1998).

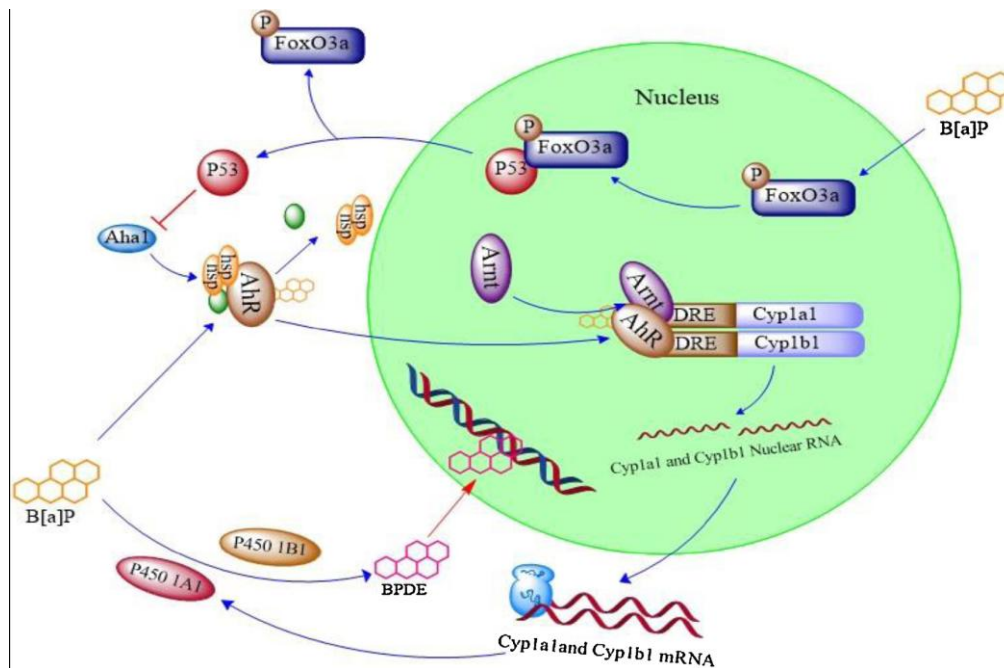


Figure 4 : Induction des gènes de métabolisme du benzo(a)pyrène CYP1A1 et CYP1B1 (Xia et al., 2016)

Cette induction est suivis des voies de métabolisation qui sont au nombre de trois:

1) la voie du radical cation :

Egalement appelée voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases ou encore voie du carbocation, cette voie aboutit à la biotransformation du B(a)P par des peroxydases dépendantes des CYP450 en radical cation du B(a)P et cela par un mécanisme chimique basé sur l'arrachement d'un électron au carbone 6 (le carbone le plus électrophile) via une oxydation mono-électronique (Penning et al., 1999). Ce radical cation électrophile est très réactif c'est-à-dire capable d'interagir avec l'ADN et former des adduits. La configuration géométrique ainsi que la localisation de la charge sur ce radical le rend plus réactive vis à vis l'ADN qui est nucléophile, et permet leur intercalation et formation de liens covalents. Il est également instable chimiquement (Xue et Warshawsky, 2005) (figure 5).

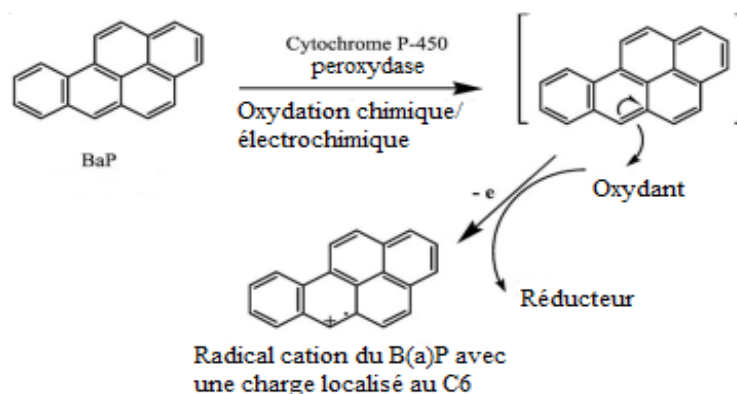


Figure 5 : Formation du radical cation (Tarantini, 2010)

2) la voie des diol-époxydes :

Cette voie est considérée comme majoritaire dans le cas du B(a)P (Xue et Warshawsky 2005). Une formation des époxydes : 2,3- 4,5-, 7,8- et 9,10-époxyde B(a)P suite à une oxydation d'une double liaison catalysée par les CYP450 est initié (Jacob and Grimmer, 1996). Ces époxydes, par la suite subissent soit une hydratation sous l'action de l'époxyde hydrolase (EH) pour produire les 4,5 -, 7,8 - (Levin et al., 1977) et 9,10-trans-dihydrodiols, soit ils subissent une conversion en intermédiaires phénoliques (1-OH, 3-OH (formé majoritairement), 6-OH, 7-OH, et 9-OH B(a)P isomères) par le biais d'une réaction spontanée non enzymatique (Pelkonen and Nebert, 1982).

Les enzymes du CYP 450 catalysent une seconde oxydation de la double liaison adjacente à la fonction diol du 7,8 trans-dihydrodiols-B(a)P sur le C9 et C10 pour générer le B(a)P 7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE). Ce dernier qui est le carcinogène ultime du B(a)P est considéré comme très réactifs vis-à-vis de l'ADN car il peut conduire à des dommages à l'ADN (Douki et al., 2008) ou par la formation d'adduits (Chen et al., 1996). Le BPDE peut également être hydrolysé en tétraols inactifs (Xue et Warshawsky, 2005) (figure 6).

L'activation du B(a)P est plutôt catalysée par le cytochrome P450 1B1 (CYP1B1), tant dis que le CYP1A1 est plutôt impliqué dans la détoxification du B(a)P (Uno et al., 2006). Ces deux isoformes de CYP 450 sont exprimé particulièrement dans les organes extra-hépatiques

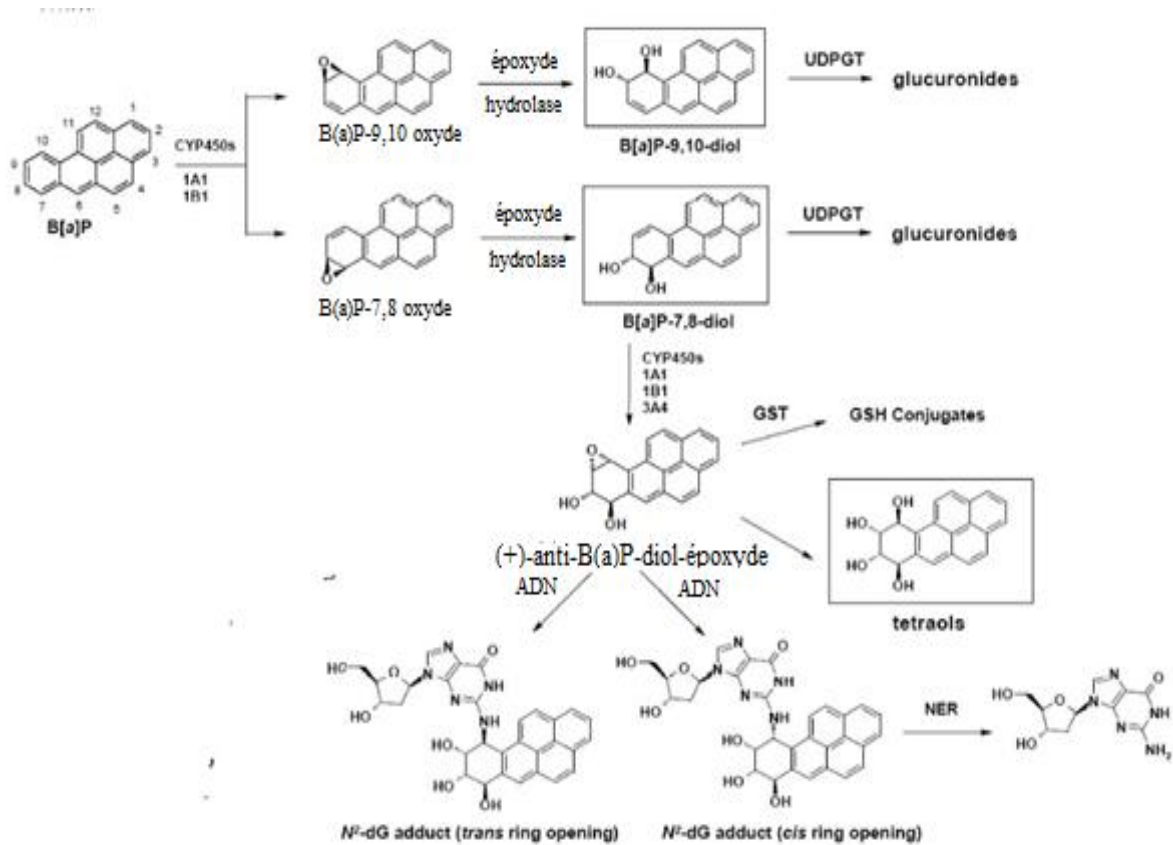


Figure 6 : voie d'activation du B(a)P en diol-époxydes (Trushin et al., 2012)

3) la voie de formation des o-quinones :

Cette voie met en jeu des dihydrodiol déshydrogénases qui appartiennent à la famille des aldo-kéto réductases (AKR). Les étapes de formation de ces o-quinones sont en commun avec celles de la voie des diol-époxydes jusqu'à l'obtention du 7,8-dihydrodiol-B(a)P. Ce dernier sera donc métabolisé en catéchol par les AKR1A1 et AKR1C1-1C4, par la suite deux réactions d'oxydation transforme ce catéchol en BaP-7.8-dione ou BaP-o-quinone, espèce électrophile réactive vis-à-vis de l'ADN par la génération de bases oxydées notamment au niveau de la guanine : 7,8-dihydro-8-oxo-guanine. Cette voie métabolique entraîne la formation des adduits à l'ADN mais peut également être à l'origine d'une production des espèces réactive oxygénés (Xue et Warshawsky 2005) (Figure 7).

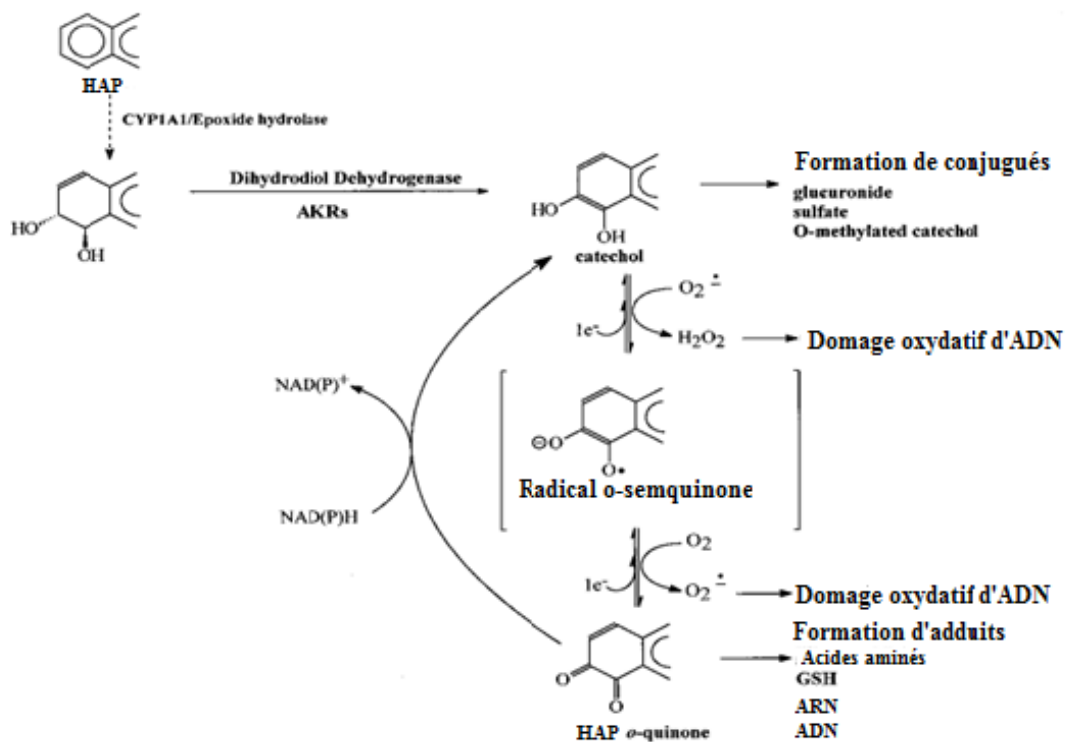


Figure 7 : Voie des quinones (Burczynski and Penning, 2000)

- **Excrétion :**

Des réactions de conjugaison catalysées par l'action d'enzymes de phase I, introduisent ou modifient les groupements fonctionnels au niveau des HAP par des réactions d'hydrolyse ou d'oxydation afin qu'ils puissent s'éliminer dans les fèces, la bile et les urine en devenant plus hydrosoluble. Indépendamment de la voie d'administration, l'élimination par les fèces et par le système hépatobiliaire sont les principales voies par lesquelles le B(a)P et ces métabolites quitte le corps (Wiel et al., 1993). L'excrétion urinaire est une autre voie d'excrétion mais qui reste mineure (70 à 75% d'élimination dans les fèces contre 4 à 12 % dans les urine) (Yamazaki and Kakiuchi, 1989) alors qu'il n'existe pas une élimination de cette HAP via l'air expiré. Selon Kao et al., 1985 46% du B(a)P a été retrouvé dans les fèces et urine après 5 jours chez les rats. L'élimination est plus rapide dans les tissus richement perfusés comparée à ceux faiblement perfusés (Bartosek et al., 1984).

- **Effets toxiques :**

Le B(a)P est principalement connu pour ses effets mutagènes, génotoxiques et cancérigènes. Il provoque chez les rongeurs (rats, souris et hamsters) l'apparition de tumeurs de l'estomac, de l'œsophage, du larynx ou des poumons (Tung et al., 2014) pour cela il a été classé comme cancérigène de groupe 1 par le CIRC et comme cancérigène de catégorie 2 par l'Union Européenne. Cette dernière a également classé le B(a)P en catégorie 2 comme ayant des effets toxiques sur la reproduction des rongeurs (Wyrobek *et al.*, 1983). Outre ces deux

effets le B(a)P a été classé dans la liste des molécules à suivre (classe 3) dans le cadre de perturbateur endocrinien (PE) manifesté par une diminution de la testostérone plasmatique après exposition par inhalation de rats au B(a)P (Inyang et al., 2003).

1.3. Implication de la mitochondrie dans le stress oxydatif et dans l'apoptose responsables de la cancérisation du B(a)P :

Le B(a)P est un cancérigène complet puisque qu'il est classé comme promoteur et inducteur de tumeur. Parmi les cellules qui entrent en contact avec le B(a)P : les cellules épithéliales respiratoires. Des études ont montré que 60% des cancers du poumon sont dus aux mutations causées par le B(a)P et autres HAP (Hecht, 1999).

1.3.1. Effet dépendant du stress oxydatif :

Les dégâts provoqués par le B(a)P et notamment le cancer pulmonaire peuvent être expliqué par un stress oxydatif qui est le résultat d'un déséquilibre entre les agents antioxydants et les ERO en favorisant ces derniers. Les produits de la métabolisation du B(a)P se font par la voie de cytochromes et principalement par la voie de quinone lors du cycle redox de quinone, produisent facilement les ERO qui participe à la destruction des macromolécules contenues dans les cellules (ADN, ARN, Lipide et protéines) et jouer un rôle important dans le processus de cancérisation (Kim and Lee, 1997).

Une étude menée sur des cellules épithéliales des voies respiratoires humaines (A549) exposé au B(a)P a montré que celui-ci provoque un stress oxydatif par l'induction d'une perturbation de l'effet des enzymes antioxydantes en altérant l'expression de certaines protéines ainsi qu'en induisant un dysfonctionnement au niveau de la mitochondrie (Min et al., 2011).

- Dommages oxydatifs à l'ADN :

L'oxygène (O_2) est l'une des pierres angulaires du vivant puisqu'il est au centre de la respiration de nombreux êtres vivants. Grace à une réaction de réduction qui aboutit à la synthèse de l'ATP, cet O_2 peut être convertis en molécules d'eau (H_2O) et cela par un processus mené par la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, presque 1 à 2% d'oxygène totale consommé quotidiennement est transformé en anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) mitochondriale qui est l'un des ERO (Cadenas and Davies, 2000). Ces derniers peuvent être produits lors de la biotransformation des HAP, au cours des réactions de phase I.

Les principales ROS parmi plusieurs sont décrites ci-dessous :

- **L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$):** résultant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$, sa production a lieu essentiellement au niveau des complexes I (15%) et III (85%) de la mitochondrie (Cadenas et Davies, 2000). il est

impliqué dans la formation des o-quinones à partir des dihydrodiols, ainsi il permet de reproduire un cycle car il peut être régénéré en fin de la production. il peut être produit lors du métabolisme des quinones (1,6 et 3,6-dione-BaP) (Burdick et al., 2003).

- **L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$):** c'est la forme excitée de l'oxygène moléculaire O_2 , il joue un rôle important, au cours de la bioactivation du B(a)P, dans le stress oxydatif induit par le BPDE en présence de rayonnements UV (Gao et al., 2005).
- **Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2):** il est obtenu lors de la réduction de $\text{O}_2^{\bullet -}$: $\text{O}_2^{\bullet -} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$, ou par la réduction bivalente de l'oxygène par les oxydases : $\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. Il est faiblement réactif mais son potentiel de diffusion est très important (il a la propriété de traverser les membranes biologiques). il est notamment produit lors de la formation des quinones et o-quinones (Burdick et al., 2003) lors de la biotransformation des HAP.
- **Le radical hydroxyle (OH^\bullet):** peut être formé à partir du $\text{O}_2^{\bullet -}$ et du H_2O_2 par la réaction d'Haber Weiss. Il a une très grande réactivité et est à l'origine de nombreux dommages à l'ADN (Cadet et al., 1999). L' OH^\bullet est le radical libre le plus toxique en biologie puisque c'est un oxydant extrêmement puissant
- **Les radicaux organiques (alkyle) (R^\bullet):** une des formes radicalaires dites « secondaires » formés en présence du radical hydroxyle à partir d'un xénobiotique.
- **Les alkoxyles (RO^\bullet) et les alkyl peroxyles (ROO^\bullet):** ils sont des produit générés à la suite de l'action oxydante des RLO «primaires» sur les chaînes d'acides gras polyinsaturés, participant à la lipoperoxydation des membranes cellulaires, sur les glucides, les protéines ou les acides nucléiques. Ces radicaux sont plus sélectifs que les radicaux primaires. Ils peuvent diffuser à travers les membranes, atteindre et endommager l'ADN (Niki, 2009).

Les processus énergétiques recouvertes par les mitochondries afin d'exploiter la valeur des aliments sous forme d'ATP, ne sont pas sans danger puisque quelques fuites peuvent être produites au cours de la chaîne de transport d'électrons. L' $\text{O}_2^{\bullet -}$ est généré directement lors d'une réaction de la chaîne du transport d'électron avec l' O_2 qui va subir une dismutation pour former le H_2O_2 , qui peut encore réagir pour former le OH^\bullet . Ainsi, il est admis que la génération mitochondriale d' $\text{O}_2^{\bullet -}$ représente la principale source intracellulaire de radicaux oxygénés produit dans des conditions physiologiques à partir de l' O_2 utilisé par la chaîne respiratoire mitochondriale, avec une estimation de 1 % à 2 % (Cadenas et Davies, 2000). En plus de ces réactions toxiques de chaîne de transport électronique de la membrane mitochondriale interne, l'enzyme monoamine oxydase de la

membrane externe mitochondriale peut catalyser la désamination oxydante des amines biogéniques qui est une source importante d' H_2O_2 , contribuant à une augmentation des concentrations des espèces réactives à l'intérieur de la matrice mitochondriale et du cytosol.

Le taux physiologique de la production mitochondriale de $\text{O}_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 associé à la chaîne respiratoire, dépend de l'état du métabolisme mitochondrial selon la disponibilité en ADP: l'état 4 (de repos) caractérisé par un taux de respiration relativement faible et aucune disponibilité d'ADP, cet état est associé à une production relativement élevée de $\text{O}_2^{\cdot-}$ et d' H_2O_2 , qui est due à l'état hautement réduit des composants de la chaîne respiratoire (transporteurs). Cet état est l'inverse du 3 caractérisé par un taux élevé de consommation d'oxygène avec une disponibilité suffisante d'ADP, conduisant à une production relativement faible d' O_2 et de H_2O_2 due à l'état hautement oxydé des composants de la chaîne respiratoire. Enfin, dans l'état anoxique 5, avec une limitation de l'apport d' O_2 et un manque de respiration, aucune réduction d' O_2 en $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou H_2O_2 ne se produit (Cadenas et Davies, 2000).

Si et après toutes ces données, la mitochondrie est considérée comme le site subcellulaire le plus important de la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 dans les organes de mammifères, elle est surtout la principale cible. Une étude a montré qu'au niveau d'ADN mitochondrial isolé des cellules pulmonaires traités par le B(a)P, les dommages étaient plus importantes que dans l'ADN nucléaire et cela est due au fait que l'ADN mitochondrial est fragile car il est dépourvu d'histone et ne semble pas avoir un système de réparation aussi efficace comme celui de l'ADN nucléaire (Balansky et al., 1999).

Les acides nucléiques sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux libres formés lors du métabolisme du B(a)P. Il est considéré comme mutagène, la présence de bases oxydées de l'ADN. En effet, si la formation de 8-oxodGuo, qui est considérée comme une lésion pro-mutagénique, n'est pas réparée avant la réplication de l'ADN, cela peut entraîner un mésappariement de l'adénine avec la 8-oxodGuo, générant une transversion (passage d'une base purique à une base pyrimidique $G \rightarrow T$ et $A \rightarrow C$) (Xue et Warshawsky, 2005).

Le OH^{\cdot} ainsi que d'autres comme $\text{O}_2^{\cdot-}$ sont impliqués dans les mécanismes d'oxydation des bases de l'ADN qui peut entraîner des mutations (Cadet et al., 1999 ; Marnett, 2000).

La guanine (G) est la base purique la plus sensible aux oxydations par le OH^{\cdot} , $l^1\text{O}_2$ et les oxydants à $1e^-$ (Cadet et al., 1999). L'attaque de l'ADN par l' OH^{\cdot} ou l'hydratation du radical cation peut se produire en plusieurs positions de la guanine. Lorsqu'elle est en position C8 entraînent la formation du radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl (radical 8-yl) qui a leur tour va être oxydé pour donner la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxodGuo), un biomarqueur du stress (Breen et Murphy, 1995). L'attaque peut également se faire en position C4 ou C5.

L'adénosine (A), de la même façon peut être attaquée par le radical hydroxyle en position C8 et en C4. Cette dernière est majoritaire et facilement réversible, tandis que l'oxydation en C8 abouti à la formation de la 8-oxodAdo qui est minoritaire par rapport à la formation de la 8-oxodGuo qui peut être aussi formé lors de l'addition de radical alkyl peroxyde (ROO^\bullet) à la guanine en C8.

L'attaque de la base pyrimidique thymine (T) par le OH^\bullet se fait principalement en C5 qui est plus favorable aux réactions avec ce dernier (60%), entraînant la génération d'un radical réduit centré en C6. Une conversion des radicaux produits en ROO^\bullet correspondants se produit par réaction avec l'oxygène moléculaire. Ces ROO^\bullet sont ensuite pour la moitié d'entre eux réduits en hydro-péroxydes instables. L'oxydation de la cytosine (C) par le OH^\bullet se fait également principalement en C5 (87%) et en C6 (10%). Une formation de site abasique est favorisée par l'oxydation de la double-liaison 5,6 de la cytosine qui rend la liaison glycosidique labile (Burrows et Muller, 1998).

la 8-oxodGuo entraîne des mutations lors de la transcription tandis que la thymine oxydée a la capacité d'interrompre la réplication et la transcription de l'ADN (Larsen et al., 2004). L'apoptose peut être engendré à cause des effets de l'oxydation sur la transcription, la traduction et la réplication. Les cassures de brins de l'ADN, peuvent engendrer des instabilités génomiques telles que les remaniements chromosomiques et peuvent également jouer un rôle important dans la cancérogénèse (Cooke et al., 2003) surtout lorsque la réparation des cassures double-brins de l'ADN, qui sont létales et qui entraînent un arrêt du cycle cellulaire, n'est pas complète. De plus, lors de la réparation des cassures de brins de l'ADN, des mutations peuvent apparaître, cela peut conduire à de graves conséquences sur la transmission de l'intégrité du patrimoine génétique

- Péroxydation lipidique :

Parmi les composants cellulaires qui peuvent être une cible privilégiée des ROS outre l'ADN, sont les acides gras insaturés, qui constituent 30 à 50% des membranes cellulaires. L'attaque radicalaire de ces derniers déclenche une réaction appelée lipoperoxydation membranaire pouvant conduire à la destruction de l'épithélium pulmonaire. La lipoperoxydation est une réaction en chaîne déroulant en trois étapes : une initiation donnant naissance à un radical alkyle (R^\bullet) par arrachement d'un atome d'hydrogène d'un acide gras, par la suite une propagation qui se traduit par une réaction entre le radical (R^\bullet) et une molécule d'oxygène triplet ($^3\text{O}_2$) formant un radical peroxyde ROO^\bullet qui est capable d'abstraire un atome d'hydrogène à un autre acide gras (RH) devenant un peroxyde ROOH . Enfin l'étape de

terminaison qui se caractérise par une diminution de la vitesse d'oxydation pour donner des produits non radicalaires par une liaison des radicaux lipidiques (Cillard et Cillard, 2006).

Les sous-produits de la peroxydation lipidique comme les aldéhydes, F2 isopropanes et le 4-hydroxynonéal sont utilisés en biologie clinique comme des marqueurs de cette peroxydation. Parmi ces sous-produits d'aldéhydes formés, le plus connu est le malondialdéhyde (MDA), bien que ce dernier peut également être formé à partir de composés non lipidiques tels que l'acide ascorbique, les acides aminés, le désoxyribose ou le saccharose lorsqu'ils sont exposés à l'action des radicaux hydroxyles (Janero, 1990).

Le MDA altère les protéines car il peut se combiner aux groupements aminés libres des ces dernières (essentiellement les résidus lysines), conduisant à l'altération des propriétés biologiques des protéines concernées, il peut endommager aussi ADN, ARN et d'autres biomolécules (Selvendiran et al., 2004).

Il est également génotoxique puisque qu'à l'état physiologique, il est capable de réagir avec les bases d'ADN. Il peut induire des substitutions des paires de bases ainsi que des mutations séquence-dépendantes dans les cellules des mammifères. Il est aussi capable de créer des ponts au sein de l'ADN, entre l'ADN et certaines protéines ainsi qu'entre l'ADN et les histones. Cette génotoxicité va aboutir à des mutations et par conséquent à différentes pathologies notamment les cancers (Haj Mouhamed et al., 2012).

plusieurs études *in vivo* sur le cancer pulmonaire ont montré une lipoperoxydation hautement significative, soit cellulaire (Kamaraj et al., 2007) ou mitochondrial (Anandakumar et al., 2008) et qui peut être due à la production excessifs des radicaux libres par la métabolisation du B(a)P.

- oxydation protéique :

Les protéines peuvent être la cible de l'électron non apparié des radicaux libres générés pendant la métabolisation de B(a)P dans le poumon (Kim et Lee, 1997), aboutissant à leurs oxydation et donnant comme résultat une fragmentation, une formation de ponts entre protéines ou encore une dénaturation de ces derniers.

L'une des réactions directes des RLO sur les protéines est l'introduction d'un groupe carbonyle dans ces dernières donnant lieu à des conséquences majeures tels que la perte de leur fonction catalytique et structurelle, un changement de leur stabilité thermique et une augmentation de la sensibilité aux protéases (dégradation protéolytique) (Stadtman et Levine, 2000). Des études ont montré que l'oxydation protéique, évalué par la formation du groupe carbonyle, est associé à plusieurs conditions tel que la consommation du tabac (Reznick et al., 1992). Les résidus méthionines des protéines sont particulièrement sensibles à l'oxydation par

les différents types de RLO, ce résidu méthionine peut être converti en dérivé sulfoxyde de méthionine (Levine, 2002).

Pour maintenir un niveau non cytotoxique des RLO, l'organisme a besoin d'un système antioxydant qu'il soit enzymatique ou non-enzymatique. Ces antioxydants peuvent empêcher l'oxydation des substrats ou de la retarder donc elle entre en compétition avec ces substrats oxydables. Cependant des dommages tissulaires peuvent être engendrés en cas d'un dysfonctionnement ou d'un déficit de ce système.

La première ligne de défense de notre organisme contre les ROS est les antioxydants enzymatiques comme la superoxyde dismutase (SOD), La catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférases (GST). En plus du glutathion réduit (GSH), les vitamines A, C, et E et certains éléments minéraux comme le sélénium et le zinc, qui peuvent piéger de façon non-enzymatique certaines ERO en protégeant les cellules contre le $\cdot\text{OH}$ et $\text{O}_2\cdot^-$ et en inhibant la peroxydation lipidique notamment au niveau des membranes cellulaires.

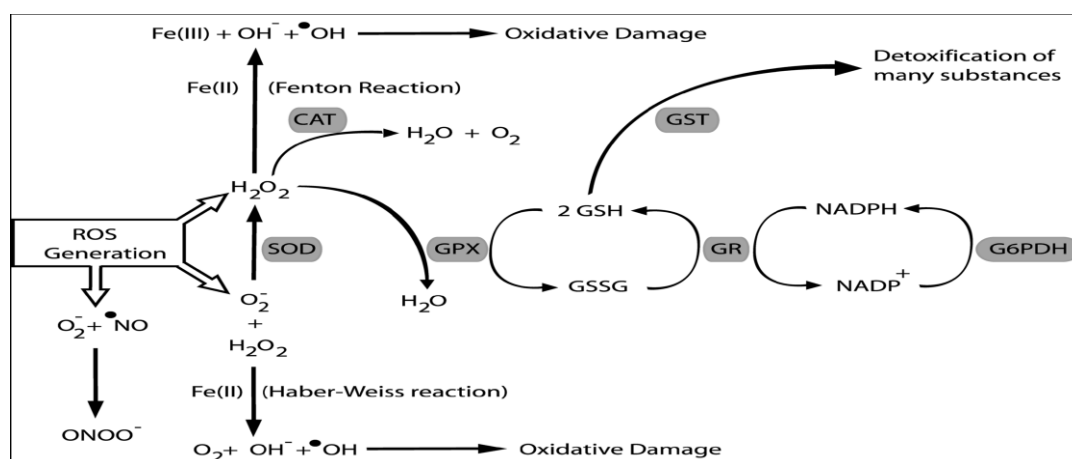


Figure 8: Les principales enzymes antioxydantes (Hermes-Lima, 2005)

Un stress oxydatif s'établit aux dépens de l'intégrité cellulaire lors d'une surproduction des ERO ou lorsque les systèmes de défenses anti-radicalaires sont dépassés. Cependant, Plusieurs HAP peuvent induire la production des ROS en quantités trop importantes, qui ne peut pas être prise en charge par les défenses anti-oxydantes, générant ainsi un stress oxydatif.

1.3.2. Effet indépendant du stress oxydatif :

Le B(a)P est un procarcinogène, mais peut agir comme un carcinogène complet chez les animaux après son activation par la métabolisation et provoque des mutations dans les gènes cruciaux en se liant à l'ADN, cette étape est appelée «initiation» de la tumeur, cependant

l'étape suivante marquée par le développement de cellules transformées de façon irréversible est appelée «promotion» de tumeur.

L'initiation de la tumeur: une bataille entre la formation d'adduits à l'ADN et leurs éliminations. Il existe plusieurs voies par lesquelles le B(a)P induit des mutations au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs qui peuvent toutes contribuer à la conversion de cellules normales en cellules tumorales (phénomène appelé initiation tumorale dans la carcinogénèse). Théoriquement, le B(a)P peut être métabolisé en quatre différents stéréoisomères (BPDE) dont l'initiateur tumoral le plus prédominant et le plus puissant est le (+)-anti-isomère (Gelboin, 1980). Cet isomère peut se lier de manière covalente à l'ADN, préférentiellement à la position N2 du nucléotide guanine, ce qui entraîne la formation de (+)-trans-anti-BPDE-N2-dG qui est un adduit d'ADN hautement mutagène. Cet adduit est très résistant à la réparation par excision nucléotidique (NER) qui est le mécanisme de réparation principal pour les adduits volumineux et les lésions de distorsion d'hélice causées par le B(a)P (Gillet et Schärer, 2006). Par conséquent, ces adduits (volumineux) qui ne sont pas éliminés durant la réplication et la traduction de l'ADN conduisant à l'induction de transitions de paires de bases $G \rightarrow T$ (Zhang et al., 2002). L'échec dans la réparation des dommages peut entraîner l'apoptose ou des changements de la transcription, tandis que la mutation acquise dans le processus de réparation de l'ADN conduit à la croissance irrégulière des cellules donc au cancer.

Le BPDE induit des transversions G à T dans la p53 ou K-ras qui est impliquées dans le développement du cancer du poumon (Pfeifer et al., 2002). La phosphoprotéine nucléaire p53 est produite par le gène suppresseur de tumeur p53. Dans le cancer pulmonaire humain, la mutation du gène p53 est le changement génétique le plus fréquemment identifié (Iggo et al., 1990). Les adduits du BPDE peuvent viser les codons 157, 158, 248 et 273 du gène p53.

Alors que pour le gène ras dans les tumeurs pulmonaires, des études ont montré que les adduits d'ADN induit par le BPDE s'effectuent dans les codons 12 et 14 du gène muté K-ras qui est le plus fréquent par rapport aux deux autres gènes ras mutés : la N et H-ras (Feng et al., 2002).

Les données de la littérature ont révélé que moins de 20% des fumeurs sont sensibles au développement du cancer du poumon et cela dépend en partie de l'équilibre entre l'activation métabolique et la désintoxication du cancérogène chez les fumeurs (Hecht, 1999).

Promotion et progression tumorales: création d'un microenvironnement pour la croissance tumorale:

Les cancérogènes tel que le B(a)P sont capables de favoriser le développement des cellules transformées et de contribuer à la génération de masses tumorales visibles (phénomène appelé promotion des tumeurs dans la carcinogenèse). Le B(a)P aide à la promotion des tumeurs par la transduction du signal médié par un récepteur d'aryl hydrocarbure (AhR). Des études chez l'animal ont montré une corrélation significative entre l'induction de l'activité arylhydrocarbon hydroxylase et la carcinogenèse pulmonaire induite par B(a)P (Ross et al., 1995).

L'AhR joue aussi un rôle vital dans l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire. son activation conduit à l'induction de l'hydroxylase d'hydrocarbure aryle (AHH) produisant des métabolites réactifs de cet HAP (phénols, dihydrodiols, quinines et époxyd), qui contribuent à l'apoptose et à d'autres lésions cellulaires dans le système biologique (Nebert et al., 2000). Des niveaux élevés d'AHH ont été induits dans les tissus pulmonaires et dans le sérum des animaux exposés au B(a)P.

1.3.3. Régulation des protéines apoptotiques:

Avec la découverte de l'effet Warburg dans les années 20, les altérations de la fonction mitochondriale ont été liées au développement des maladies cancéreuses (House et al., 1956). Plusieurs études par la suite portant sur l'influence des mitochondries sur la santé humaine élaborant le rôle de leurs fonctions dans la carcinogenèse ont été effectués.

La vie de la cellule épithéliale bronchique normale nécessite l'expression équilibrée de gènes prolifératifs, favorisant le déroulement de la division ou de la différenciation cellulaire (proto-onco-gènes), et de gènes antiprolifératifs (gènes suppresseurs de tumeur ou antioncogènes), freinant le cycle cellulaire ou induisant l'apoptose. Le cancer bronchique, découle de la transformation de cette cellule épithéliale bronchique, sous l'effet des carcinogènes de la fumée de tabac, par la rupture de cet équilibre physiologique.

L'apoptose, appelée également mort cellulaire programmée, est un phénomène dans lequel la cellule participe à son autodestruction sous le contrôle de divers signaux internes et externes.

Une cellule épithéliale bronchique normale peut être « poussée au suicide » (entrer en apoptose) par trois grands types de stimuli qui sont l'absence de facteurs de survie (EGF, platelet derivated growth factor (PDGF),...), la stimulation de récepteurs membranaires de type « récepteurs de mort » par leurs ligands: les récepteurs Fas, le récepteur au TNF- α , les récepteurs aux facteurs TRAIL (DR4/R1 et DR5- killer/R2) et enfin par un stress cellulaire.

L'ensemble des signaux proapoptotiques aboutit aux mitochondries, avec pour effet principal une perméabilisation de la membrane mitochondriale (Costantini et al., 2000). Cette perméabilité est normalement sous le contrôle d'un complexe multiprotéique (PTPC); pour

permeability transition pore complex; comprenant entre autres, un récepteur périphérique des benzodiazépines sur la membrane externe, un canal ionique à travers les membranes interne et externe de la mitochondrie, plusieurs protéines de la famille Bcl2/Bax, et une protéine p53AIP dont la synthèse est induite par p53. C'est l'ouverture de ce canal qui va permettre le passage du cytochrome C dans le cytoplasme, qui entraîne une cascade irréversible de clivages protéolytiques aboutissant à l'activation d'une nuée de protéases qui, en dégradant des centaines d'autres protéines cellulaires, sont à l'origine de la mort cellulaire (Johnston et al., 2002).

Les mutations des protéines apoptotiques, des protéines anti-apoptotiques, dysfonctionnement mitochondrial ainsi des mutations de l'ADN mitochondrial dans les cellules cancéreuses sont parmi les moyens pour s'échapper à l'apoptose (Solaini et al., 2011). les carcinogènes environnementaux, tels que le tabac provoque des mutations au niveau de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (Chatterjee et al., 2011) où la majorité des mutations de l'ADNmt identifiées ciblent principalement le complexe I de la chaîne respiratoire qui lorsque il est muté, il ne peut pas interagir avec le complexe III, ce qui se traduit par le transfert incorrect d'électrons aboutissant à la production de ROS, l'augmentation de la prolifération cellulaire, l'invasion dans les cellules cancéreuses du poumon (Dasgupta et al., 2013).

1.3.3.1. Expression et ciblage des Caspases 3:

Les caspases, considéré comme les régulateurs centraux de l'apoptose, sont des cystéines protéases qui clivent spécifiquement leur substrat après un motif peptidique contenant un aspartate d'où le terme c-Asp-ases pour cystéines Asp protéases ou caspases (Alnemri, 1997). Actuellement, 15 membres de la famille des caspases ont été identifiés chez les Mammifères dont 12 enzymes humaines sont connues. Ils sont souvent utilisés comme marqueur pour étudier l'apoptose forment la famille des endoprotéases qui fournissent des liens critiques dans les réseaux cellulaires régulateurs contrôlant l'inflammation et la mort cellulaire (McIlwain et al., 2013).

Les caspases, appelés aussi effecteurs terminaux de la mort cellulaire, médient les deux formes de l'apoptose: la voie extrinsèque (qui est activé par la voie des récepteurs de mort) de la signalisation apoptotique et la voie intrinsèque (qui est activée par le stress et contrôlées par les mitochondries). Par ailleurs, les deux voies apoptotiques communiquent, convergeant au final à la mitochondrie où s'en suit l'activation des caspases effectrices (caspases-3, -6, -7) qui sont les principales protéases impliquées dans la dégradation de la cellule.

Comme de nombreuses protéases, les caspases sont exprimées sous une forme zymogénique (pro-enzyme) inactive qui contient trois domaines. Les caspases effectrices (caspases-3, -7, -

6) sont appelées ainsi car elles participent activement à la destruction de la cellule apoptotique en clivant spécifiquement différents substrats cytosoliques et nucléaires.

Les caspases ont la capacité à s'auto-activer ou à être activées par d'autres caspases. Les caspases effectrices sont activées de manière hiérarchique, en cascade, par d'autres caspases appelées caspases initiatrices (caspases -2, -8, -9, -10). Ainsi, le clivage protéolytique de la pro-caspase-3 survient sous l'effet direct des caspases-8 ou -9 activées. La liaison de la caspase-9 à Apaf-1 via leurs domaines CARD et la libération du cytochrome c qui se lie à son tour à Apaf-1 possiblement dans sa région répétée WD, conduit à un clivage et une activation de la caspase-9, entraînant l'activation de la caspase-3. Cette dernière activée, clive et active le facteur de fragmentation internucléosomale de l'ADN (DFF) aboutissant finalement à l'apoptose (Allen et al., 1998).

Au cours de l'apoptose, les caspases inactivent au moins deux protéines nécessaires pour l'intégrité du génome, la PARP (Poly-(ADP Ribose Polymerase)) qui est une enzyme de réparation nucléaire, est la cible majeure du clivage protéolytique par les caspases effectrices qui l'inactivent. L'autre cible est la protéine kinase C delta (PKC δ). Son clivage par la caspase-3 entraîne une accumulation du domaine catalytique de PKC δ , ce qui constitue le signal d'entrée en apoptose de la cellule.

Les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) et autres inhibiteurs de caspases empêcheraient les conséquences de l'activation accidentelle ou spontanée des caspases en établissant un seuil à partir duquel les caspases peuvent dégrader la cellule.

Les caspases sont cytosoliques mais peuvent également se localiser dans l'espace intermembranaire mitochondrial (caspase-2, -3 et -9), dans le noyau (caspase-2 et -3) ou dans l'appareil de Golgi (caspase-2). Par exemple, dans certaines lignées de NSCLC, les caspases effectrices cytosoliques comme la caspase-3 doivent franchir la membrane nucléaire pour directement dégrader les substrats nucléaires (Joseph et al., 2001).

1.3.3.2. Régulation des protéines de la famille Bcl2/Bax:

Parmi les protéines qui jouent un rôle important dans la régulation de l'apoptose, on distingue (figure 9) celles de la famille des Bcl-2. Cette famille contient plus d'une quinzaine de protéines dans les cellules de mammifères. Elles ont tous 1 à 4 domaines homologues connus comme « bcl-2 homology domain » (BH1 à BH4). Le domaine BH4 a un effet anti-apoptotique. Les domaines BH1, BH2 et BH3 sont nécessaires à la dimérisation avec d'autres protéines de la famille Bcl-2. Cette famille est habituellement divisée en 3 sous-groupes sur la base des caractéristiques fonctionnelles et structurales. Le premier regroupe les protéines anti-

apoptotiques comme Bcl-2 lui-même, Bcl-Xl, ou Mcl-1 qui possèdent les régions d'homologie BH1, BH2, BH3 et BH4. Le second regroupe les protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bok, et Bcl-Rambo caractérisées par la présence de plusieurs régions d'homologie BH1, BH2 et BH3, à l'exception notable de BH4. Enfin, le dernier sous-groupe appelé le groupe des protéines «BH3-only» est constitué d'un nombre croissant de protéines comme Bad, Bid, Bik, Bim, HRK (Harakiri), Noxa, Puma, Bmf, Bcl- G... composées d'une unique région d'homologie BH3.

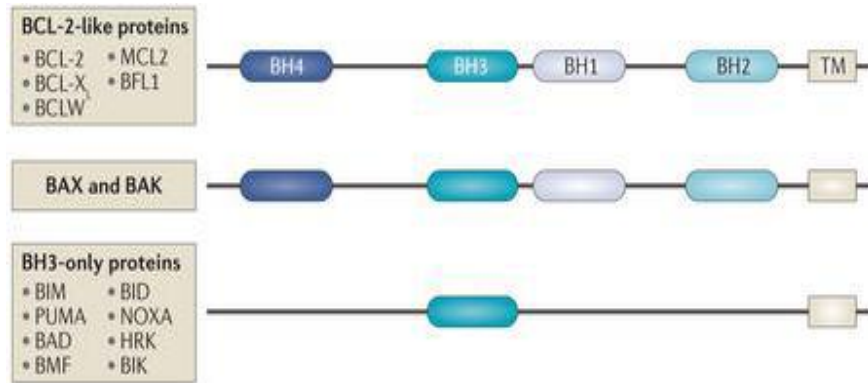


Figure 9 : Schéma simplifié de la structure des protéines de la famille Bcl-2 (Delbridge et al., 2016)

Le principal site d'action des protéines de la famille Bcl-2 est la membrane mitochondriale.

Bax et Bak sont essentiels pour l'induction de l'apoptose puisque les cellules déficientes à la fois en Bax et en Bak sont résistantes à la perméabilisation de la MME induite par de nombreux stimuli pro-apoptotiques (Wei et al., 2001).

Les protéines de la famille Bcl-2 s'hétérodimérisent par le domaine commun, BH3, dans des complexes dont l'effet peut être proapoptotique ou au contraire antiapoptotique en stabilisant ou au contraire en déstabilisant le complexe de pores de transition de perméabilité (PTPC) mitochondrial (Costantini et al., 2000; Johnstone et al., 2002).

Le ratio entre ces différents complexes détermine la résultante pro- ou antiapoptotique. la surexpression des Bcl-2 inhibe l'apoptose cellulaire et augmente le risque de la transformation maligne (Gu et al., 2013).

La Bcl2 a été caractérisé comme le gène constitutivement surexprimé essentiel dans le processus d'apoptose parce qu'il réprime l'initiation de ce dernier par l'inhibition de la perméabilité du pore de transition de la mitochondrie (MPTP), elle agit pour maintenir ce dernier inactif par son interaction avec le canal anionique voltage-dépendants (VDAC). Lorsque le MPTP est activé, Bax s'associe avec le VDAC et permet l'afflux des solutés ; le calcium et autre; de la matrice, favorisant ainsi la transition de perméabilité mitochondriale

par dépolarisation de la membrane mitochondriale. Cela conduit à une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) et la libération subséquente de protéines comme le cytochrome C de l'espace intermembranaires.

Une surexpression protéique de Bcl2, dont le mécanisme et la signification restent obscurs a été décrite dans 20 à 30 % des cancers bronchiques non à petites cellules et jusqu'à 80 % des cancers bronchiques neuroendocrines (Pezzella et al., 1993).

La p53 induit la synthèse de plusieurs membres proapoptotiques de cette famille (Noxa, PUMA, Bax), ce qui rend compte d'une partie de son effet proapoptotique (Costantini et al., 2000; Johnstone et al., 2002).

1.4. Rôle de l'inflammation dans le développement du cancer pulmonaire :

L'inflammation est un processus physiologique normal dans la réponse immunitaire innée, qui se produit généralement en réponse à une lésion tissulaire. Bien que bénéfique, elle peut devenir un état pathologique lorsqu'elle est soutenue et devient chronique. Ceci est basé sur un large éventail de preuves provenant d'études épidémiologiques à des études moléculaires chez les animaux de laboratoire, en effet Virchow (1862) a émis l'hypothèse que l'inflammation chronique était probablement déterminante dans la progression du cancer, il y a déjà un siècle après ses observations sur des tumeurs qui étaient infiltrées par des cellules immunitaires. Les découvertes récentes confirment ses observations, en montrant que plusieurs maladies humaines sont associées à une inflammation chronique par exemple, pour l'athérosclérose (Mallika et al., 2007) et l'arthrite rhumatoïde (Hannawi et al., 2007). Ces pathologies sont toutes reliées à une inflammation chronique qui détruit les tissus en favorisant une infiltration de cellules immunocompétentes et en altérant le comportement des cellules environnantes. On estime que 15 à 20% des décès par cancer sont liés à des réponses inflammatoires (Tan et al., 2011).

Une inflammation aiguë sur le site de la lésion entraîne une augmentation de l'apport sanguin, une plus grande perméabilité vasculaire et une migration des globules blancs. Les cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles, les éosinophiles et les phagocytes mononucléaires, sont stimulées et induisent des enzymes générant des oxydants et de radicaux libres dans le but de combattre les agents pathogènes envahissants et les corps étrangers et d'éliminer le tissu infecté de l'hôte (Ohshima et al., 2005), tandis que des médiateurs solubles tels que des protéines de phase aiguë, des eicosanoïdes et des cytokines sont également produits.

L'inflammation aiguë module l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Cependant, dans l'inflammation chronique, lorsque la cause de la lésion n'est pas résolue rapidement, les

rôles sont souvent inversés, la réponse immunitaire adaptative entraînant une activation excessive et continue des cellules immunitaires innées (De Visser et al., 2006).

1.4.1. Lien moléculaire entre l'inflammation et le cancer :

Les liens entre l'inflammation chronique et la transformation néoplasique sont multiples.

Cependant, les modulateurs clés, qui dirigent l'inflammation vers le cancer (figure 10), comprennent divers facteurs de transcription tels que NF- κ B, TNF- α , IL-6, COX-2, Nrf2, oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), NFAT, les transducteurs de signal et les activateurs de la transcription (Murtaza et al., 2015).

Les mécanismes moléculaires par lesquels l'inflammation favorise le développement de cancer sont basés sur la perturbation et l'altération des processus biologiques normaux. La phase initiale du développement tumoral semble impliquer des produits des cellules inflammatoires telles que l'azote (ERN) générer par des enzymes oxydants comme l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et les ERO. En effet, la présence de ces derniers favorise l'apparition de mutations dans l'ADN (Marnett, 2000), des modifications d'ordre épigénétiques ; l'activation d'oncogènes (Cooke et al., 2003) et même des altérations post-traductionnelles qui engendrent des altérations néfastes pour le fonctionnement des protéines. Elles peuvent affecter la régulation de certains gènes codant pour des facteurs de transcription (tel que NF- κ B), des protéines de signalisation et médiateurs de l'inflammation comme la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) ou même des facteurs suppresseurs de tumeurs (tels que p53 et les protéines du système de réparation de l'ADN) (Fig...). Ces phénomènes conduisent à la perte de contrôle de la prolifération cellulaire et des mécanismes d'apoptose. La progression tumorale va ensuite être favorisée par les chémokines (telles que IL-1 et IL-17) et les cytokines (telles que l'IL-6 et le TNF- α) libérés par les cellules de l'immunité. Ces médiateurs de l'inflammation constituent des facteurs de croissance et de survie pour les cellules précancéreuses et amplifie la libération d'ERO par les cellules inflammatoires (Tan et al., 2011). La perte de l'architecture tissulaire suite à sa destruction ainsi que son remodelage excessif couplée aux altérations de l'ADN, causées par la réponse immunitaire innée ou adaptative, entraînent également un risque accru de développement du cancer (De visser et al., 2006).

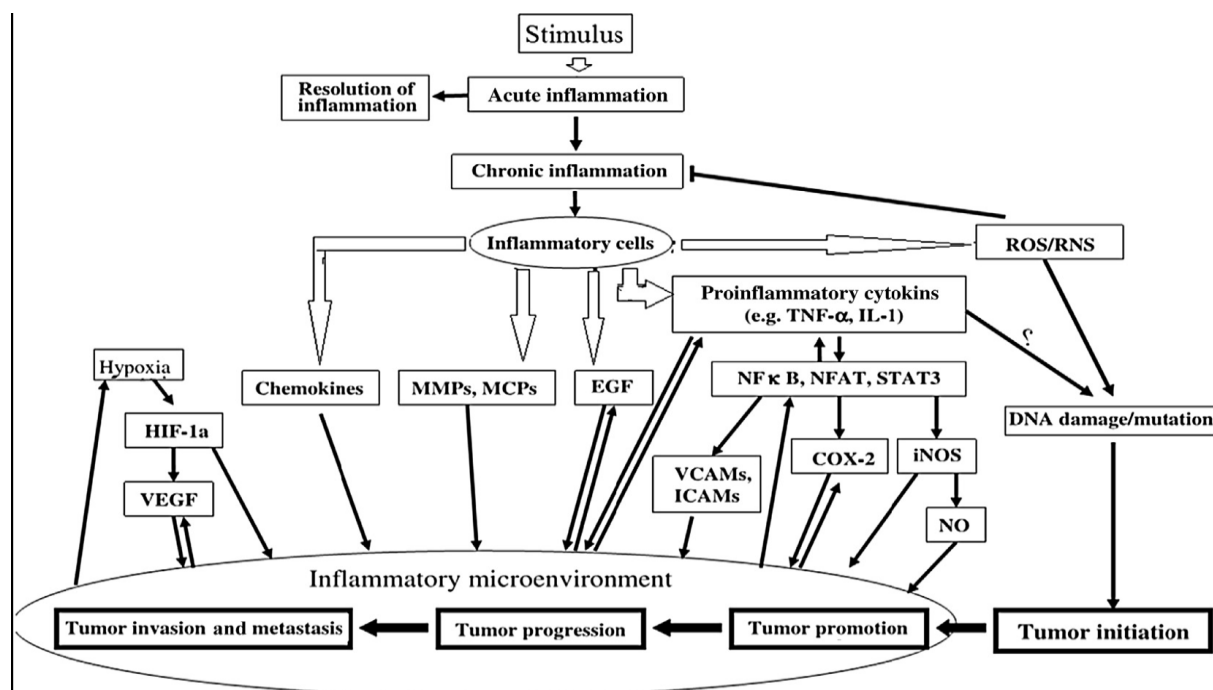


Figure 10: Voies de signalisation impliquées dans le cancer induit par l'inflammation (Murtaza et al., 2015).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens connu pour réduire le risque de développer certains cancers et la mortalité associée (Balkwill et Mantovani, 2001). On a montré qu'une administration chronique d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) diminuait de beaucoup le risque de développer certains cancers y compris celui du poumon (Olsen et al., 2008). Une explication possible est que les AINS, inhibant la COX, diminuent l'exposition des cellules aux prostaglandines, réduisant ainsi la tendance à l'inflammation.

1.4.2. Implication du facteur de transcription NF- κ B et de Cyclooxygénase COX-2 dans la voie de signalisation:

Le NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) est un facteur de transcription nucléaire jouant le rôle régulateur majeur dans l'inflammation, il a été découvert dans le noyau des cellules B par Baltimore et ses collaborateurs en 1986 comme un facteur qui se lie à la chaîne légère kappa des immunoglobulines (Sen et Baltimore, 1986). Il a été démontré qu'il est exprimé de façon omniprésente dans le cytoplasme de tous les types cellulaires des êtres vivants, de la drosophile à l'homme. Il ne migre vers le noyau que lorsqu'il est activé, où il régule l'expression de plus de 200 gènes immunitaires, de croissance et d'inflammation.

NF- κ B est un terme collectif faisant référence à des facteurs de transcription hétérotrimériques pro-inflammatoires, une famille de cinq protéines ayant un domaine Rel.

Ces protéines, y compris NF- κ B1 (ou p50), NF- κ B2 (ou p52), Rel A (ou p65), Rel B, et c-Rel, restent inactives sous l'influence des protéines I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , bcl-3, p105 et p100 qui ont un domaine d'ancrage (Murtaza et al., 2015).

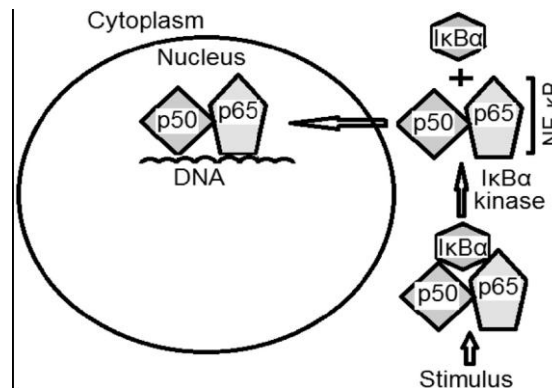


Figure 11 : Un résumé illustratif de la voie d'activation du facteur nucléaire NF- κ B (Murtaza et al., 2015).

Lorsque le NF- κ B n'est pas stimulé, il reste dans le cytoplasme, séquestré et inactif. Il est activé après phosphorylation et élimination de I κ B α par I κ B α kinase (les IKK). La famille IKK comprend trois enzymes (IKK α , IKK β et IKK γ) dont IKK β est impliquée dans l'activation de NF- κ B par les cytokines (les facteurs de nécrose tissulaire (TNF), les IL-6, les facteurs de croissance et de différenciation) et de nombreuses autres carcinogènes et promoteurs de tumeurs. Le traitement de cellules avec divers stimuli de stress oxydatif et d'inflammation active le complexe, l'I κ B α subit une phosphorylation, une ubiquitination et une dégradation, libérant ainsi l'hétérodimère p50-p65 pour la translocation vers le noyau (Anto et al., 2002) (figure 11). Le NF- κ B actif, en physiologie normale, contrôle l'expression de nombreux gènes qui régulent les caractéristiques immunitaires, de croissance et d'inflammation de la cellule après sa liaison à son site particulier constitué de 10 paires de bases, GGGPuNNPyPyCC. En revanche, son activation excessive et incorrecte peut intervenir l'inflammation et la tumorigenèse. En outre, NF- κ B agit comme un lien entre l'inflammation et le cancer puisque ce dernier est considéré comme une maladie pro-inflammatoire.

Le microenvironnement des tumeurs, ainsi que différents agents inflammatoires tel que les cytokines, les ROS comme le H₂O₂, les carcinogènes et promoteurs tumoraux peuvent activer le NF- κ B (Aggarwal, 2004). En effet, il est activé à la fois par des stress environnementaux, tels que les métaux lourds ou les constituants de la fumée de cigarette comme le B(a)P, et par des médicaments thérapeutiques, y compris divers agents chimiothérapeutiques (Pahl, 1999).

Shishodia et al. (2003) ont démontré que le facteur de nécrose tissulaire (TNF) était le plus puissant activateur de NF- κ B, sous l'influence duquel les cellules tumorales prolifèrent, envahissent, métastasent et suppriment l'apoptose (Shishodia et al., 2003).

NF- κ B, est cependant impliqué dans le contrôle de la transcription de nombreux gènes dont les fonctions s'étendent au-delà de la réponse immunitaire immédiate. Par conséquent, plutôt que d'être un médiateur central de la réponse immunitaire, il représente un régulateur du stress. Dans ce contexte, il apparaît, qu'une grande variété de gènes de réponse au stress tels que l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la cyclo-oxygénase (en particulier des formes inductibles de COX-2), sont à leur tour activés par NF- κ B (Murtaza et al., 2015). Outre l'activation de ces deux gènes, il contrôle également diverses cytokines inflammatoires telles que l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . Le NF-KB est également important dans les mécanismes anti-apoptotiques, du cycle cellulaire, angiogéniques et d'invasion et métastatiques, il constitue de ce fait l'un des composants les plus importants du lien entre l'inflammation et le cancer. il s'est avéré constitutivement présent dans diverses tumeurs, fournissant des preuves à l'appui de son rôle crucial dans la cancérogenèse. Il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires dans la promotion et le développement de la cancérogenèse. On ne pense pas que NF-KB lui-même joue un rôle significatif dans la mutation de l'ADN ou dans l'initiation du cancer; cependant, il est significativement lié à la promotion et à la progression cancérogène puisque il contrôle la transcription de divers facteurs anti-apoptotiques tels que les inhibiteurs cellulaires de l'apoptose (cIAPs), la protéine inhibitrice FLICE-like cellulaire (c-FLIP), les Bcl- XL, les facteurs du cycle cellulaire tels que les cyclines, les facteurs angiogéniques tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et l'IL-8 et les facteurs d'invasion et métastatiques tels que les métalloprotéinases matricielles (MMP)-2 et MMP-9 (Tan et al., 2011) et les activateurs du plasminogène (tPA) de type urokinase (uPA) (Murtaza et al., 2015).

Les COXs sont des enzymes limitant le taux de la synthèse des prostanoides, qui convertissent l'acide arachidonique en prostaglandine (PG) H₂, un substrat spécifique des PG synthases. Deux isoformes de COX ont été isolées et caractérisées: la COX-1 exprimée de façon omniprésente et la COX-2 inductible, également connue sous le nom de prostaglandine (PG) H synthase.

Des études sur des cancers humains ont révélé une surexpression fréquente de la COX-2 dans diverses tumeurs malignes, y compris les cancers du poumon (Sandler et Dubinett, 2004 ; Kim et al., 2011).

Divers stimuli, tels que le lipopolysaccharide, les cytokines pro-inflammatoires (par exemple IL-1 et TNF) et des facteurs de croissance (comme le facteur de croissance épidermique (EGF)), ont été impliqués dans l'expression de COX-2, qui catalyse la formation de prostaglandines par oxydation et cyclisation de l'acide arachidonique (Karabin et al., 2015), les médiateurs cruciaux de l'inflammation. De plus, la COX-2 est surexprimée dans le cancer (Murtaza et al., 2015) d'où cette surexpression est associée à la prolifération cellulaire, à l'inhibition de l'apoptose, à l'invasion et à l'angiogenèse, et reconnue comme une cible potentielle de chimioprévention pendant la pathogenèse du cancer (Kamaraj et al., 2010)a.

En fin de compte, ces deux protéines peuvent fournir des cibles moléculaires qui aideront à la prévention, la détection précoce et le traitement des cancers associés à l'inflammation (Tan et al., 2011).

1.5. Traitement du cancer pulmonaire par chimiothérapie :

Plusieurs méthodes sont utilisées pour le traitement de multiples malignités tel que la chirurgie, la radiothérapie (incluant la photothérapie), la thérapie biologique (comprenant l'immunothérapie et la thérapie génique) et la chimiothérapie. Cette dernière est considérée comme une thérapeutique systémique au contraire de la chirurgie et de la radiothérapie qui sont considérées comme des traitements locaux. Son mode d'action vise à détruire les cellules en division ainsi que lors de la dissémination métastatique pour éviter la prolifération des cellules tumorales en agissant sur l'ADN, sur l'ARN ou sur les protéines des cellules.

Le traitement du cancer du poumon est en fonction du type histologique et du stade de développement de la tumeur. Les SCLC font partie des tumeurs les plus chimio- et radio-sensibles. A l'inverse, le traitement des NSCLC qui est plus délicat. La chirurgie reste la thérapie privilégiée comme traitement des patients atteints de NSCLC au stade précoce. En effet, les NSCLC sont résistants à la plupart des chimio- et radio- thérapies conventionnelles, et une réponse complète aux traitements est donc très rare (Gallego et al., 2008).

Cependant, l'utilisation des médicaments chimiothérapeutiques en thérapie est limitée en raison de leurs effets secondaires puisqu'elle ne cible pas seulement les cellules tumorales mais touchent toutes les cellules en cours de prolifération et qui retentissent directement sur la qualité de vie des patients.

De nombreux agents anticancéreux sont utilisés pour le traitement du cancer du poumon, comme le cyclophosphamide (CTX ou CP) (Li et al., 2016), l'épirubicine (EPI) et le 5-fluorouracil (5-FU) (Wang et al., 2015). Plusieurs études suggèrent que la combinaison de

médicaments anticancéreux ou la polychimiothérapie montre des taux plus élevés de réponse par rapport à la monothérapie, dans le traitement du cancer du poumon (Lebeau et al., 2010).

1.5.1. Caractéristique pharmacologique du FEC (5-fluorouracile, épirubicine et cyclophosphamide) :

Bien que le 5-fluorouracile, l'épirubicine et le cyclophosphamide soient des médicaments cytotoxiques conventionnels, l'utilisation d'un traitement rassemblant les trois médicaments n'a débuté que récemment. La réponse clinique à cette thérapie a été significative avec une fréquence des effets secondaires cardiaques et hématologiques inférieure à celle de l'utilisation unique de médicaments chimiothérapeutiques conventionnels (Chow et al., 2005). Le 5-fluorouracile (5-FU) est un médicament cytostatique de la famille des antimétabolites, largement utilisé dans le traitement des tumeurs solides notamment les cancers des voies aérodigestives, du sein, de la tête, du cou et du poumon, cependant il est connu comme un médicament cytotoxique sur les tumeurs solides (Ogata et al., 2011). C'est un analogue de l'uracile qui se caractérise par un atome fluorine au C-5 à la place de l'hydrogène (Zhang et al., 2008). Il a été synthétisé en 1957 par Heidelberger et Duschinsky sur des bases rationnelles à partir de la constatation que les cellules tumorales utilisaient plus d'uracile que les tissus sains.

Les effets pharmacologiques du 5-FU sont exercés par l'incorporation de ses métabolites dans l'ARN et l'ADN entraînant des dommages létaux à l'ADN (Qiao et al., 2011), ainsi que son inhibition de la thymidylate synthase qui est une enzyme limitant la vitesse dans la synthèse de l'ADN, elle est la principale cible de l'activité antitumorale des fluoropyrimidines et est considérée comme le principal candidat pour le déterminant de la réponse des tumeurs au 5-FU (Ogata et al., 2011).

En effet son activation nécessite au préalable un métabolisme intracellulaire médié par trois voies anaboliques expliquant sa cytotoxicité, la première voie utilise l'uridine kinase alors que la deuxième utilise une phosphoribosyltransferase pour la conversion du 5-FU en un ribonucléotide 5-fluorouridine-5'-monophosphate (FUMP). La troisième voie utilise la thymidine phosphorylase (TP) et la thymidine kinase pour la conversion du 5-FU en desoxyribosynucleotide FdUMP (5-fluoro-2β-désoxyuridine-5β-monophosphate). Cette dernière étant l'inhibiteur de la thymidylate synthase (TS) (Ogata, 2011). le FdUMP forme un complexe stable avec la TS qui inhibe la production du desoxythymidinemonophosphated TMP, essentiel à la réplication et la réparation de l'ADN, sa déplétion conduit à d'importantes cytotoxicités (Zhang et al., 2008).

Le cyclophosphamide (CP) est un promédicament anticancéreux et immuno modulateur, qui a montré ses effets antinéoplasiques pendant les années 1940 et il a été introduit dans les protocoles de chimiothérapie. C'est un agent alkylant bifonctionnel de type oxazaphosphorine appartenant à la famille des moutardes azotées (Jain et Jain, 2012). Il est inactif comme un agent alkylant et antinéoplasique, il doit être convertie par des enzymes cellulaires ; les phosphatases et les phosphoramidases qui ont été trouvés plus élevés dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales.

Le cyclophosphamide exerce son effet par une réaction d'alkylation. Cette réaction consiste à la greffe par une liaison covalente d'une chaîne hydrocarbonée sur un radical accepteur. Les propriétés électrophiles de ces alkylants leur permettent de réagir avec des molécules comme les acides nucléiques, les protéines cellulaires ou extracellulaires (le système glutathion) possédant des radicaux nucléophiles.

La moutarde phosphoramidate génère des formes aziridium qui peuvent former des liaisons intra ou intercaténares d'ADN et des liaisons avec l'ADN et les protéines, ce qui résulte un blocage des processus fonctionnels et la mort cellulaire par apoptose en inhibant la réplication, la transcription et la synthèse des protéines.

Pour son efficacité thérapeutique, le cyclophosphamide doit subir une bioactivation par le NADPH et l'oxygène dans le foie mais également dans la moelle osseuse, les reins. Le métabolisme implique deux voies d'activation.

La première voie la 4hydroxylation donne un métabolite actif le 4hydroxycyclophosphamide (4-OH-CPA). Chez l'homme, elle est effectuée par le CYP2B6. Le 4-OH-CPA diffuse dans la cellule donnant l'aldophosphamide qui se décompose par la suite pour former la moutarde phosphoramidate, responsable de l'effet antitumorale et le métabolite toxique l'acroléine, responsable des cystites hémorragiques. La deuxième voie alternative est une N-déchloroéthylation médiée par le CYP3A4 donnant un sous-produit, le chloroacétaldéhyde qui a des effets toxiques sur le système nerveux et l'appareil urinaire.

Le CP est majoritairement métabolisé en 4-hydroxy-CP et seulement 5-10 % de sa dose thérapeutique est métabolisé en CAA par la N-déchloroéthylation (Zhang et al., 2005). Ils sont éliminés par les urines (30-60%) alors que 4% est excrétée par la bile.

Les anthracyclines sont classées parmi les médicaments anticancéreux les plus efficaces parmi eux l'épirubicine (4'-épidoxorubicine, EPI) est un stéréoisomère de l'anthracycline doxorubicine, il ne diffère du composé parent que par l'épimérisation du groupe hydroxy en position C-4 de la fraction sucre. Des doses équitoxiques d'EPI induisent une activité antitumorale égale ou légèrement meilleure dans un certain nombre de systèmes tumoraux

animaux. est un substrat de la P-gp, MRP1 et MRP2. L'EPI présente un puissant effet apoptotique contre les cellules tumorales via la voie de signalisation mitochondriale intrinsèque (Lo et Wang, 2013).

Il a été démontré que l'activité de l'EPI augmente de façon significative en utilisant des doses plus élevées, et/ou lorsqu'elle est appliquée en chimiothérapie en combinaison avec d'autres médicaments

1.5.2. Toxicité du FEC :

Le stress oxydatif est l'un des mécanismes les plus importants impliqués dans la toxicité des agents chimiothérapeutiques (Wu et al., 2016). Cette toxicité touche les cellules non cancéreuses, conduit à une réduction de la dose et à une diminution de l'efficacité anticancéreuse. Il a été démontré que le traitement par les agents antinéoplasiques conduit à l'augmentation des concentrations intracellulaires des ROS chez les patients. Ces radicaux libres conduisent à la peroxydation des lipides et aux dommages membranaires et peuvent alors être l'un des mécanismes responsables des effets toxiques de la thérapie antinéoplasique (Conklin, 2004).

En effet l'utilisation clinique du 5-FU est limitée par sa toxicité en particulier hépatique et rénale. Il est métabolisé au niveau du foie d'où l'importante hépatotoxicité causé par cet anticancéreux, qui se caractérise par l'augmentation de l'activité des aminotransférases, LDH et la bilirubine avec une diminution des concentrations des protéines et l'albumine. D'autre les effets secondaires typiques du 5-FU sont la myélosuppression, la nausée, le vomissement, la diarrhée et la stomatite. Il a aussi des effets toxiques directs sur l'endothélium vasculaire qui impliquent l'oxyde nitrique synthase (NO) endothélial et entraîne des spasmes coronariens et une vasoconstriction indépendante de l'endothélium via la protéine kinase C. Ils peuvent également induire des lésions cardiocytaires par le déclenchement d'un programme apoptotique qui pourrait être dû à l'induction de l'augmentation des ROS intracellulaires (Lamberti et al., 2012).

CP est bioactif à des espèces toxiques dans divers tissus. Les toxicités communes d'un traitement par cet anticancéreux sont : des nausées, des vomissements, alopecie, des immunosuppressions ainsi que des lésions pulmonaires et celle de la vessie, qui se produisent chez l'homme et chez l'animal, limitant sa dose. La cystite hémorragique est la principale caractéristique de l'urotoxicité induite par le CP avec une incidence atteignant 78% chez les patients recevant de fortes doses (200 mg / kg). Bien que l'incidence de la toxicité pulmonaire médiée par CP soit plus faible comparée à la cystite hémorragique, la pneumonie interstitielle

et la fibrose pulmonaire surviennent chez les animaux expérimentaux et chez les humains traités avec de fortes doses (Datta et al., 1998). Il a été rapporté que la perturbation de l'équilibre redox induite par le stress oxydatif après une exposition à la CP génère des perturbations biochimiques et physiologiques. Plusieurs études suggèrent que la supplémentation en antioxydants peut influencer la réponse à la chimiothérapie ainsi que le développement des effets secondaires indésirables qui résultent du traitement avec des agents antinéoplasiques (Jain et Jain, 2012).

L'un des effets secondaires graves du médicament EPI sont la myélosuppression, la cardiotoxicité et la neurotoxicité. Plusieurs études ont suggéré que l'hépatotoxicité induite par l'EPI est également liée à des radicaux libres d'oxygène produits au cours du métabolisme du EPI. De plus, EPI a pu activer la voie PI3K / Akt, qui à son tour active la voie NF-kB (Wu et al., 2016), cependant la cardiotoxicité de l'EPI semble être due à la formation de radicaux libres et au métabolisme de l'alcool cardiotoxique entraînant une lésion cardiaque directe (De Azambuja et al., 2015).

I.2. les polyphénols de la propolis

2.1. Origine, composition chimique et caractère physicochimique de la propolis:

Depuis très longtemps l'homme s'est intéressé à l'apithérapie qui correspond à l'utilisation des produits de la ruche. Parmi ces produits la propolis, beaucoup moins anciennement connue que le miel et la gelée royale.

La propolis a été utilisée dans l'antiquité en Egypte par les prêtres dans la médecine, la chimie et l'art de la momification et de l'embaumement des cadavres (Makashvili, 1978) ainsi dans des préparations ophtalmologiques (Ghedira et al., 2009).

Elle fut très certainement utilisée à l'époque de la Grèce antique, Aristote (4^{ème} siècle avant J-C) dans son «*Historia animalium* » la signale comme un remède aux affections de la peau, plaies et suppurations et les médecins de cette époque l'utilisaient pour la fabrication de baumes alors que Alexander de Tralles (6^{ème} siècle après J-C) a montré son intérêt dans les affections du foie et d'estomac (Ghedira et al., 2009). Les légionnaires romains portaient au combat avec un morceau de propolis pour cicatriser leurs futures plaies et soigner leurs blessures, elle était aussi connue comme apaisante de douleurs nerveuse, alors que les Incas en Amérique du Sud durant la même période, l'utilisaient comme antiseptique.

Le médecin Galien (2^{ème} siècle après J-C) l'a mentionné dans ses traités ainsi que le philosophe et médecin Abu Ali bin Sina (Avicenne) (11^{ème} siècle) distingue deux sortes de cire dans son œuvre bien connue la cire propre et la cire noire, il est évident que cette dernière désigne la propolis.

L'un des miracles scientifiques dans le Coran et la Sunna qui fait allusion à la propolis, est le verset : 68-69 de Sourate : L'abeille «Ton Seigneur a inspiré aux abeilles : Prenez des demeures dans les montagnes, les arbres et ce qu'ils (les hommes) érigent (comme treillages et ruches) et mangez de tous les fruits (et fleurs) et suivez humblement les chemins que vous fraie votre Seigneur. De leur ventre sort un liquide aux couleurs variées, dans lequel se trouve une guérison (et un remède) pour les hommes. C'est un signe (à faire connaître DIEU) pour ceux qui réfléchissent»

A la fin du 19^{ème} siècle, la propolis était en plein essor grâce à ses vertus médicinales mais c'est surtout à l'occasion de la guerre des Boers en Afrique du Sud (dans les années 1900) et notamment pendant la seconde guerre mondiale qu'elle connaît son apogée d'utilisation grâce aux excellent résultats en matière de désinfection et de cicatrisation (Lotfy, 2006) et de nos jours, elle est utilisée dans le monde entier.

Le mot propolis signifie "pro" : en avant et "polis" : cité, en se référant aux observations des grecs (-700 à -600 ans avant J-C) qui voyaient cette résine à l'entrée de la ruche "devant la

citée" (Castaldo and Capasso, 2002). Elle est appelée aussi colle de l'abeille (bee glue), désigne une substance naturelle, résineuse, aromatique, gommeuse, balsamique, de consistance visqueuse que les abeilles ouvrières spécialisées (les butineuses) élabore (Ghedira et al., 2009).

La propolis a plusieurs rôles dans la ruche, le premier rôle est structurelle : les abeilles l'utilisent pour colmater les interstices et fissures (Al-ghamdi et al., 2017), et réparer tout ce qui semble fragilisé par le climat ou l'apiculteur. Le deuxième rôle est de défense : utilisé pour éviter au maximum l'entrée d'intrus de la ruche alors que le troisième rôle est hygiénique : les abeilles enduit l'intérieur de son habitat (l'intérieur des alvéoles) avec un mastic à base de propolis pour se protéger des agressions microbiennes ce qui laisse penser que le mot propolis viendrait aussi du verbe latin propolire qui veut dire enduire. elle est responsable de la faible incidence des bactéries et moisissures à l'intérieur de la ruche (Challem, 1995), ainsi les ennemis trop volumineux après être tués, seront momifiés en étant recouvert de propolis associée à la cire avant d'être évacués hors de la ruche, empêchant de la sorte une éventuelle décomposition et donc d'un éventuel développement de micro-organismes (Soltani et al., 2017).

Un autre rôle, qui est le maintien de la température en évitant ainsi l'entrée d'air froid par la réduction de la taille du trou d'envol durant la période la plus froide de l'année, tout cela va permettre un maintien du microclimat et une isolation thermique de la ruche (Burdock, 1998). La composition chimique de la propolis est très complexe, elle est variable selon l'origine géographique, l'espèce d'abeille (Kurek-Górecka et al., 2014) ainsi que des arbres et des végétaux se trouvant dans son écosystème (Marcucci, 1995). Sa composition, de part ses origines végétales diverses, subit des variations importantes mais de manière constante et relativement stable, elle contient de la résine végétale et le baume (50%), la cire (30%), les huiles essentielles aromatiques (10%), le pollen (5%) et matières diverses organiques et minérales. Parmi ces dernières, on retrouvera beaucoup de dérivés phénoliques et leurs esters ainsi que des flavonoïdes, des vitamines et des minéraux comme le calcium, fer, cuivre, magnésium, zinc, potassium, manganèse dont le pollen contenu dans la propolis en est la principale source (5%) (Cirasino et al., 1987, Al-ghamdi et al., 2017).

La résine et les huiles essentielles, proviennent des sécrétions des plantes butinées lors de la collecte de la propolis, alors que la cire est sécrétée par les abeilles. Quant aux vitamines, sont essentiellement les vitamines du groupe A et B (B1, B2, B3, B6, B8 et B12) et en petites quantités les vitamines C, E, H et la vitamine P (Marcucci, 1995 ; Lotfy, 2006).

La consistance de la propolis est variable suivant la température: dure et friable en dessous de 15°C, elle devient gluante et molle entre 30° et 60°C jusqu'à fondre en moyenne vers 60°-70°C ou plus. Sa couleur est variable selon sa provenance (situation géographique) allant du jaune clair au brun très foncé, en passant par toute la gamme des bruns. Elle a une odeur spécifique et variable selon son origine botanique et selon l'origine de plusieurs molécules dont les aldéhydes aromatiques (vanilline et isovanilline), les alcools et les cétones (Kolankaya et al., 2002; Kurek-Górecka et al., 2014) avec un goût âcre et pimenté.

Les substances disponibles pour la fabrication de la propolis sont présentes dans différentes parties de plantes. Les abeilles récoltent des résines, des mucilages, des gommes, des latex et des matières lipophiles présentes sur les feuilles et les bourgeons de certains arbres et arbustes prévues pour les protéger contre les attaques des insectes et des micro-organismes (Bankova et al., 2000).

Il existe une grande liste de plantes considérées comme origine végétale de propolis dans le monde entier. De nombreux chercheurs ont étudiés cette liste, ils ont procédé à des analyses microscopiques du pollen et des fragments de feuilles trouvés dans la propolis, d'autres ont observé les abeilles dans leurs vols, puis récolté les fleurs visitées qui seront ensuite analysées par méthode chromatographique afin de déterminer le profil des composés phénoliques pour être comparé avec celui de la propolis (Valcic et al., 1999) car la fraction polyphénolique est très différente d'une propolis à une autre et constitue ainsi une sorte d'empreinte spécifique qui permet d'identifier son origine botanique (Cardinault et al., 2012).

La propolis contient également des métabolites végétaux secondaires, mais ils ne sont pas les mêmes partout dans le monde. Il existe plusieurs types de propolis selon la ou les principales sources végétales mentionnées dans le tableau 3 (Sforcin et Bankova, 2011).

Les résultats d'une étude chimique menée sur des échantillons représentatifs de propolis algérienne du nord ont indiqué la présence de deux types différents de propolis. La première, a montré comme marqueurs une série de composés polyphénoliques typiques de la propolis produite à partir de résines de Peuplier, alors que les composés marqueurs du deuxième type étaient des diterpènes labdane et clerodane, ces derniers sont caractéristiques des sécrétions de feuilles de *Cistus* spp. Les deux genres de plante semblent être une source végétale de composés isolés de la propolis du nord algérien (Piccinelli et al., 2013).

Type de propolis	Origine géographique	Origine botanique
Peuplier	Europe, Amérique du Nord, régions non tropicales de l'Asie, Nouvelle-Zélande, Algérie.	Populus spp. le plus souvent <i>P. nigra</i> L
Verte du Brésil	Brésil	Baccharis spp. le plus souvent <i>B. dracunculifolia</i> DC
Bouleau	Russie	<i>Betula verrucosa</i>
Propolis rouge	Cuba, Brésil, Mexique	<i>Dalbergia</i> spp.
“Clusia”	Cuba, Venezuela	<i>Clusia rosea</i>
Méditerranéenne	Sicile, Grèce, Malte, Crête, Turquie	Famille : Cupressacea
Pacifique	Zone pacifique (Taïwan, Okinawa, Indonésie)	<i>Macaranga tanarius</i>

Tableau 3 : Les types de propolis les plus répandus: origine des plantes et leurs constituants majeurs (Sforcin et Bankova, 2011 ; Seguenia et al., 2016).

Les différentes sources de plantes, influencent sur la composition chimique de la propolis et donc sur ses propriétés et activités biologique, d'où l'intérêt de connaître cette origine qui est d'une grande importance (Piccinelli et al., 2013 ; Bazmandegan et al., 2017).

La propolis est récoltée durant tout l'été jusqu'à la fin de l'automne, par un nombre limité d'abeilles ouvrières butineuses. Ces dernières sont très spécialisées dans cette activité vue qu'elle n'effectue pratiquement aucun autre travail au sein de la ruche. L'abeille fait d'abord usage de ses antennes pour situer sa source (résine et autres) ensuite elle détache la particule saisie en l'attaquant avec ses mandibules. Enfin elle attrape la résine avec ses pattes avant (3ème paire pattes postérieures) et après remodelage (accumulation d'une pelote) elle place la propolis au niveau de ses pattes arrière afin de faciliter le transport jusqu'à la ruche dans leur panier à pollen (P5).

Une fois rapportée à la ruche, la butineuse de propolis est déchargée de sa récolte par d'autres ouvrières qui vont étirer cette pelote pour en faire un fil. Elles vont y ajouter de la cire et des sécrétions salivaires pour obtenir la propolis qui va être utilisé dans la ruche. La durée de cette opération est considéré comme longue, elle peut aller d'une à plusieurs heures.

L'homme peut obtenir de la propolis par raclage et grattage des cadres et parois de la ruche qui y sont recouverts (Valcic et al 1999).

2.2. Propriétés biologiques et thérapeutiques de la propolis :

Malgré l'existence de différents types de propolis dans le monde entier, elles ont des caractéristiques communes qui déterminent leurs effets thérapeutiques. Ces derniers sont en rapport avec la composition chimique, dont les plus importants et les mieux connus sont

l'activité antimicrobienne : La propolis possède un spectre bactérien large avec un effet inhibiteur sur les souches Gram+, Gram- et les bactéries anaérobies. En outre, ses activités antimicrobiennes ont habituellement été attribuées aux flavonoïdes (Seydi et al., 2016 ; Soltani et al., 2017). Leur mode d'action a été l'objectif de plusieurs études, il semblerait que la propolis stimule l'activité bactériophage des phagocytes (Al-Waili et al., 2012) et inhibe la division cellulaire et la destruction de la paroi bactérienne . De plus, la propolis possède des propriétés antivirales notamment sur les adénovirus, les poliovirus et les virus de l'herpès, VIH et de la grippe H1N1 (Takemura et al., 2012), antifongiques sur les différents espèces de *Candida*, de *Trichophyton* et de *Microsporium*, ainsi une propriétés antiparasitaire sur *Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia* et *Trypanosoma cruzi* (Banskota et al., 2001).

La propolis a aussi des propriétés cicatrisantes et régénératrices en exerçant un effet réparateur en stimulant le métabolisme cellulaire et circulatoire ainsi que la synthèse du collagène, d'élastine et des facteurs d'élasticité de la peau et cela grâce aux flavonoïdes ainsi qu'à des acides phénoliques et certains acides aminés comme l'arginine, la choline et la proline conduisant au renouvellement du tissu (Ghisalberti, 1979), anesthésiantes, antiallergiques, immuno-modulatrices, antihypertensives et hypoglycémiantes. Elle est également connue pour ses actions anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses dont on va développer dans les paragraphes suivants.

Les données sur la toxicité aiguë de la propolis dans la littérature sont peu nombreuses et lorsqu'elles existent, elles sont variable du fait qu'il n'existe pas jusqu'à ce jour la une méthode standardisée pour sa préparation et son extraction (choix du solvant et pourcentage utilisé) (Burdock, 1998). La valeur de DL50 d'un extrait éthanolique de propolis administré oralement chez la souris était supérieure à 2000 mg/kg, alors qu'elle est selon une autre étude de 1440 mg/kg chez le même animale (Burdock, 1998). Chez le rat Wistar, Ghedira et al. (2009) ont montré que cette DL50 est supérieure à 15 g/kg. D'autre ont suggéré que la concentration sûre pour les humains pourrait être de 70 mg / jour (Burdock, 1998). Les résultats d'une étude aigue de la propolis rouge du Brésil mené sur des rats, montrent que la DL50 était supérieure à 300 mg / kg avec peu de signes toxiques. Alors que la classification basée sur « les lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques » suggère un avertissement contre la toxicité subaiguë après une administration d'une dose supérieures à 100 mg/kg (da Silva et al., 2015). La faible toxicité des extraits de la propolis peut être expliquée par leurs richesses en flavonoïdes, molécules connues pour leurs faibles effets toxiques.

Mohammadzadeh et al. (2007), n'ont trouvé aucun effet toxique après l'ingestion de propolis iranienne. Cuesta et al. (2005) n'ont pas observé d'altération de la mortalité ou du taux de croissance après l'apport quotidien de propolis dans l'alimentation pendant 6 semaines.

La présence de particules radioactives dans des échantillons de propolis a été étudiée, car ces particules peuvent être concentrées dans le sol, contaminant ainsi les plantes, les insectes et les humains aussi. Parmi ces particules radioactives, le potassium 40 (^{40}K) et le béryllium 7 (^7B) ont été trouvées. Ces données suggèrent que la propolis peut être étudiée en tant qu'indicateur de contamination environnementale afin de comprendre la chaîne sol-plante-abeeille-propolis (Orsi et al., 2005).

2.2.1. Les flavonoïdes de la propolis Algérienne :

La propolis possède un énorme pouvoir antioxydant, due à la présence des polyphénols, spécifiquement les flavonoïdes (Marcucci et al., 2000; da Silva et al., 2006; Campos et al., 2015; Mouhoubi-tafinine et al., 2016), ainsi que les acides phénoliques et certain composés terpénoïdes (da Silva et al., 2006).

Jusqu'à présent, environ 300 composés ont été identifiés dans la propolis, parmi eux les composés phénoliques, qui constituent le groupe le plus nombreux en ce qui concerne la quantité et le type (Mouhoubi-Tafinine et al., 2016).

Étant trouvé dans tous les fruits et légumes, les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires largement répandues dans le règne végétal (plus de 8000 ont été identifiés), ils possèdent au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : ether, ester, hétéroside. Parmi ces composés, en se référant d'une part sur la structure du squelette de base et d'autre part sur le nombre d'atomes constitutifs, on trouve : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les aldéhydes phénoliques, les phénols et leurs esters, les cétophénols, les coumarines, les tanins et lignines et d'autres composés, y compris l'eugénol, l'anéthole, l'hydroquinone, le ptérostylbène, le naphthalène, etc. (Kurek-Górecka et al., 2014). Ils présentent de puissantes propriétés antioxydantes, qui dépendent de leur structure.

La classe la plus abondante et la plus étudiée des polyphénols est la classe des flavonoïdes avec plus de 10000 composés identifiés (Leyva-lópez et al., 2016) et trouvés de manière générale dans tous les fruits, les légumes, les herbes et autres produits tels que la propolis, avec au moins 38 différents flavonoïdes signalés dans cette dernière (Aldahmash et al., 2016). Ces métabolites secondaires produisent par les différentes plantes comme mécanisme de défense contre les conditions de stress biotique (agents pathogènes, blessures, symbiose) et

abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température, carences), sont des composés naturels possèdent le même élément structural de base. Ils comprennent 15 atomes de carbone formant une structure C6-C3-C6 commune contenant deux noyaux aromatiques reliés par un pont de trois atomes de carbone, généralement organisée sous la forme d'un cycle hétérocyclique oxygéné (Figure 12) (Petruşa et al., 2013).

Ces flavonoïdes diffèrent les uns des autres par la position des substitutions sur les noyaux A et B, et la nature de C pour former les différentes classes des flavonoïdes qui sont principalement: les flavones et les flavonols (les plus abondants) tel que le kamphérol et la quercétine ces derniers possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres, il y a aussi les flavanols (flavan-3-ols) tel que la catéchine, la proanthocyanidine et l'épicatéchine, les flavanones comme la naringénine, l'héspéridine et l'ériodictyol, les isoflavonols exemple de la daidzéine et enfin les anthocyanes qui sont des pigments naturels responsables de la coloration de certaines fleurs et fruits et connu par leur aptitude antioxydante, parmi eux il y a le cyanidine et la pélagonidine (Saito et al., 2013; Leyva-lópez et al., 2016). Les quatre premiers constituent les flavonoïdes de la propolis ainsi que les chalcones. Ces molécules se trouvent à la fois sous forme libre, mais très souvent sous forme hétérosidique constitués d'une partie phénolique aglycone (génine) associée à un sucre. Ces aglycones sont plutôt présents sous forme de cire dans les feuilles, les écorces et les bourgeons (Havsteen, 2002), et ils ont notamment un puissant pouvoir antioxydants par rapport à leurs formes glycosidiques liées (glycosylation à la position C-3 diminue les capacités antioxydantes) (Pietta, 2000).

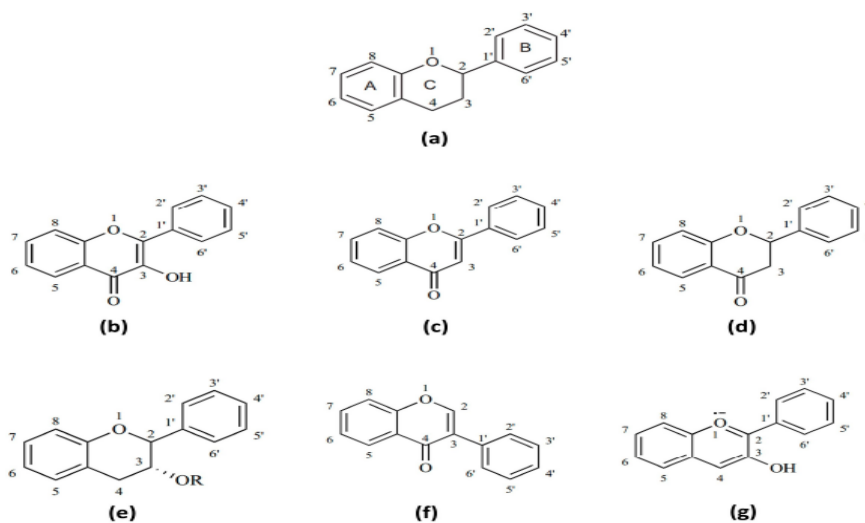


Figure 12: Structure de base chimique des différentes classes de flavonoïdes

(a) squelette basique des flavonoïdes; (b) les flavonols; (c) des flavones; (d) les flavanones; (e) des flavanols; (f) des isoflavones et (g) des anthocyanines.

Au cours des 20 dernières années, des données significatives concernant les effets potentiels des flavonoïdes sur la santé contre un certain nombre de maladies chroniques ont été démontré. Parallèlement, une compréhension de la biodisponibilité de ces flavonoïdes, dont la propolis est très riche, constituera un outil précieux pour comprendre les mécanismes par lesquels ils exercent ces effets bénéfiques *in vivo*.

Les étapes cruciales du métabolisme des flavonoïdes chez l'être humain se déroulent au niveau du foie. Tout d'abord, les flavonoïdes nutritionnels sont absorbés par le tractus gastro-intestinal. Après hydrolyse des liaisons hétérosidiques (reliant la génine à la chaîne sucrée) dans l'environnement acide de l'estomac et des cellules épithéliales de l'intestin grêle, une libération des glycosides de l'aglycone qui est la forme est la seule susceptible d'être réabsorbé, sera effectué. Environ 15% des aglycones sont absorbés sous forme de micelles (en présence de la bile) par les cellules épithéliales, ils seront liés à l'albumin (Kuhnle et al., 2000) et transmis à la lymphe puis le foie par la veine porte hépatique (Havsteen, 2002).

Environ 80 % des flavonoïdes sont captés par le foie lors de leur premier passage et les réactions les plus courantes dans cette organe sont les réactions de conjugaisons qui forment des glucuronates de flavonoïdes, des sulfates et des dérivés O-méthylés, ainsi que les réactions de transformations oxydantes catalysées par des enzymes du cytochrome (Karabín et al., 2015).

Les flavonoïdes ne sont ni accumulés ni stockés par le foie. Dans les hépatocytes, ils sont transportés vers l'appareil de Golgi et aussi vers les peroxysomes où ils seront dégradés par oxydation. Les flavonoïdes conjugués et non convertis résultants sont distribués par le système circulatoire vers les différents tissus et transformés par le métabolisme intracellulaire. Cependant, tous les flavonoïdes ne sont pas capables d'être absorbés dans tous les types de tissus, par exemple les formes méthylées de quercétine sont capables d'entrer dans les cellules, tandis que leurs glucuronides ne le sont pas. De plus, dans les tissus ces flavonoïdes se conjuguent avec le glutathion (Karabin et al., 2015).

On sait peu de choses sur la capacité des flavonoïdes à surmonter la barrière hémato-encéphalique qui est un filtre hautement sélectif qui sépare le sang circulant du liquide extracellulaire du cerveau et contrôle l'entrée des xénobiotiques dans le cerveau (Bicker et al., 2014). Après une administration orale d'épicatéchine, des flavanones, des flavonols et des anthocyanidines, leurs concentrations augmentent dans les cellules du cerveau. On suppose que la capacité à traverser cette barrière est basée sur la polarité et donc les composés lipophiles sont plus absorbés au niveau du cerveau que les sulfates hydrophiles et les glucuronides.

Les produits de la décomposition des flavonoïdes sont complètement excrétés avec l'urine alors que les formes conjuguées sont excrétés dans la bile. Le reste des flavonoïdes sont excrétés avec les fèces et certains dans l'urine (Havsteen, 2002). Un schéma décrivant des stades individuels du métabolisme des flavonoïdes, et leur localisation dans le corps, est montré à la Figure 13.

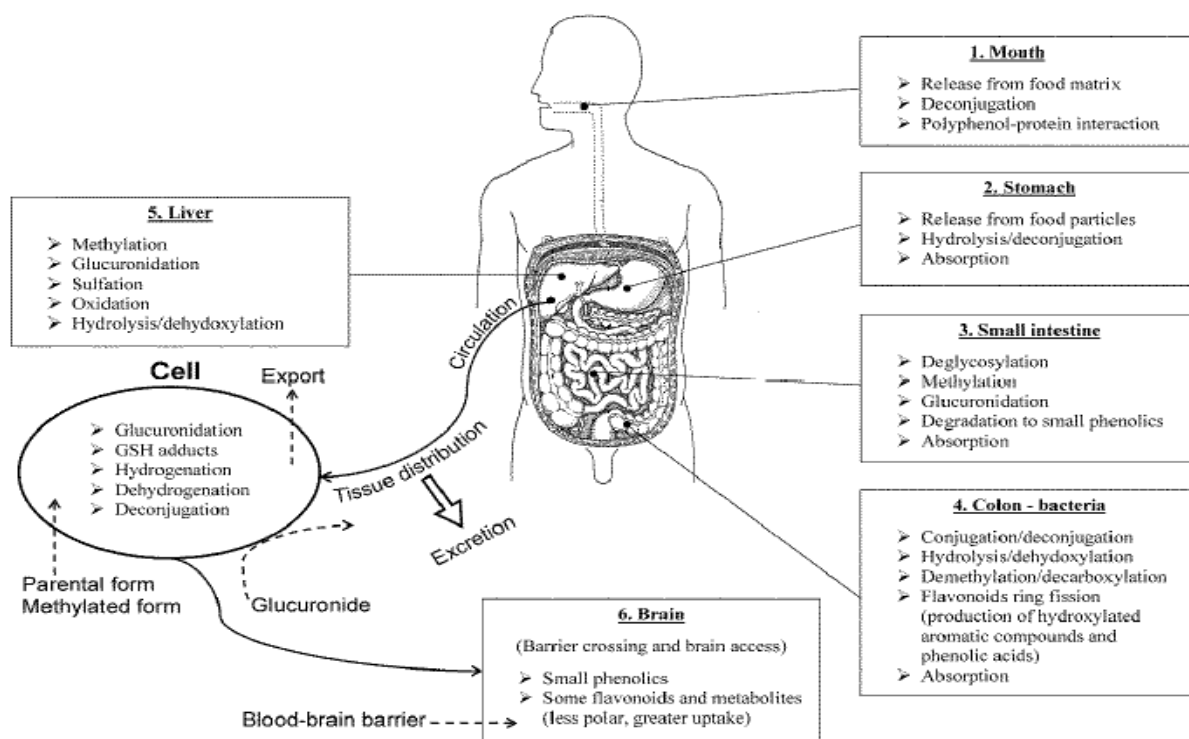


Figure 13: Métabolisme et distribution des flavonoïdes chez l'homme (Karabin et al., 2015)

Des études comparatives de différente propolis du monde ont révélé que, bien qu'elles puissent avoir une composition chimique différente, toujours elles ont des activités biologiques très élevées. Pour cette raison, l'analyse chimique de la propolis est à tout moment nécessaire. L'Algérie, ce grand pays est doté d'une grande variété de paysages et de zones écologiques, qui lui confère un patrimoine naturel très riche. Considéré par beaucoup comme le pays naturel le plus unique de la Méditerranée avec sa morphologie, son bioclimat, sa faune et sa flore distinctifs contribuent à sa grande biodiversité (Soltani et al., 2017).

Peu d'étude sur la composition chimique de la propolis algérienne sont trouvée dans la littérature par rapport à celle de différents pays, qui ont été largement étudiées.

Velikova (2000) a étudié la composition chimique de la propolis de M'Sila située au centre d'Algérie. Les flavonoïdes de la propolis trouvés dans cette région sont la Chrysin, la Galangin, la Sakuranetin, la Pinocembrin, la Pinobanksin et la Pinobanksin. Cette propolis affiche le modèle typique de la «propolis de type populaire» car elles contiennent une

combinaison de métabolites secondaires caractéristiques des bourgeons de *Populus* spp. de la section *Aigeiros* (Velikova et al., 2000).

Une autre étude sur la propolis du nord algérien de la ville de Jijel a révélé la présence des principaux flavonoïdes qui sont la pinostrobin chalcone, la pinocembrine, la galangine (flavanon), la naringénine (flavanon) et la chrysin et tectochrysin (flavone) (Lahouel et al., 2010). Par la suite la propolis de la même région a été étudié en utilisant des techniques spectroscopiques (UV-visible, RMN 1H, RMN 13C, ...etc.), a montré la présence de 5 composants de flavonoïdes de la classe des flavones qui sont la pectolinarigénine (5,7-dihydroxy-6,40-diméthoxy-flavone), la pilosin (5, 7, 8-trihydroxy-6,40-diméthoxyflavone), ladanein (6,7-dihydroxy-7,4-diméthoxyflavone), la chrysin (5,7-dihydroxyflavone) et l'apigénin (5,7,4-trihydroxyflavone) (Segueni et al., 2016).

Piccinelli et al. a démontré que certains échantillons de propolis Algérienne collectés dans différentes régions du nord du pays, ont montré une composition polyphénolique différente à celle de la propolis recueilli à Jijel où deux différents types, directement liés à leurs constituants, ont été identifiés: propolis algérien de type polyphénol (PAP), riche en composés polyphénoliques, et propolis algérien diterpène (DAP), source abondante en diterpènes. Les principaux métabolites secondaires de ces deux types ont été ensuite identifiés par des procédures chromatographiques préparatoires suivies d'analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectrométrie de masse (MS) suivie de deux méthodes HPLC-MS / MS spécifiques aux marqueurs PAP et DAP ont été développées pour étudier et comparer la composition chimique des ces échantillons de propolis.

Deux flavones (chrysin et apigénin), deux flavonols (kaempferol et galangin) et trois flavanonols (pinobanksin, pinobanksin 3-acétate et pinobanksin) ont été identifiés. Ces composés ont été préalablement isolés à partir de propolis de différentes origines, principalement produites dans les régions tempérées. De plus, ces composés ont également été signalés dans *Populus* spp, ce qui suggère que ces plantes peuvent être l'une des plus abondantes dans les sites de sa collecte dans le nord algérien (Piccinelli et al., 2013).

La teneur en flavonoïdes des échantillons de propolis prélevés de différentes régions du nord d'Algérie : Adekar, Bejaia, Oued ghir et Elkseur est comprise entre 124,76 mg/100 g et 4946,53 mg/100 g (Mouhoubi-tafinine et al., 2016). Ces valeurs sont supérieures à ceux obtenus dans une autre étude à partir de propolis de différentes régions algériennes (Nedji and Loucif-ayad, 2014) et même à ceux obtenus dans la propolis iranienne (Mohammadzadeh et al., 2007) et celle du Brésil aussi (da Silva et al., 2006).

Une récente étude a montré que la propolis algérienne présente une ressemblance à la propolis du centre et du nord de la Grèce, ainsi que celle de la Croatie, caractérisés par des quantités relativement élevées de flavonoïdes et une faible teneur en diterpène. Les flavonoïdes trouvés étaient la pinocébrine, le pinobanksin, le pinobanksin-3-O-acétate, la chrysin et la galangine qui sont les mêmes trouvés dans la propolis européenne de type peuplier où leur source est l'exsudat des bourgeons des arbres du genre *Populus*, principalement *P. nigra* (Graikou et al., 2015). Selon Soltani et al. parmi les différents composants trouvés dans la propolis de l'est d'Algérie à Sétif, les flavonoïdes tel que la chrysin et le 2'-O-methylcajanone (isoflavonoïdes) (Soltani et al., 2017).

Ces différents données sur la composition chimique en flavonoïdes de la propolis algérienne, montrent clairement que l'origine géographique et le lieu de la collecte, ont une grande influence et que la disponibilité de différentes sources végétales utilisées par les abeilles pour la production de propolis reflète sur cette teneur en flavonoïdes.

2.2.2. Effet antioxydant :

Les flavonoïdes peuvent agir contre l'oxydation selon deux mécanismes: soit en empêchant la formation ou piègent les ROS responsables de l'initiation de l'oxydation et dans ce cas les flavonoïdes sont dits préventifs (ou retardateurs), soit par l'interromptions de la phase de propagation de l'oxydation des radicaux, les flavonoïdes sont dits briseurs de chaîne.

✓ Effet préventif du stress : par chélation des ions métalliques :

De nombreux composés flavonoïdes peuvent chélater les ions métalliques de transition, principalement le fer et le cuivre, qui exercent des fonctions physiologiques dans l'organisme (cofacteurs d'enzymes et des composants des protéines) et est responsable de la création des radicaux libres en catalysant la réduction de H_2O_2 en radical hydroxyle (OH) très réactif.

✓ Effet briseur de chaîne ou chain breaking : par piégeage des radicaux libre :

La neutralisation des radicaux libres par les flavonoïdes peut être engendrée en donnant un électron ou un atome d'hydrogène, avec une activité antioxydante étroitement liées à leur structure chimique (figure ...), idéale pour le piégeage des radicaux libres:

- Dans le cycle C, la double liaison stabilisatrice entre le carbone C-2 et le carbone C-3 conjuguée avec le groupe 4-céto est la raison de la délocalisation des électrons du noyau B. cette dernière est la responsable de l'activité antiradicalaire. Lors de la réaction des composés avec les radicaux libres, des radicaux phénoxy ($AO\cdot$) sont créés et stabilisés par l'effet de la résonance électronique du noyau aromatique.

- la présence du groupe o-dihydroxy (structure des catéchol) dans le noyau aromatique B, qui présente une capacité significative de "piégeage" des radicaux

d'oxygène (ROS) et de radicaux azotés (RNS) et assure la stabilité élevée du radical phénoxy créé et donc une difficulté à initié une nouvelle réaction en chaîne, ainsi que la présence des groupes hydroxyle (3',4'-dihydroxy) dans ce noyau qui sont des donateurs d'électrons et d'hydrogène aux radicaux libres.

- Dans les cycles A et C, les groupes hydroxyle près du carbone C-3 et C-5 en présence de groupes 4-céto génèrent un maximum d'effet de piégeage des radicaux libres (Heim et al., 2002 ; Gülçin, 2012 ; Kurek-Górecka et al., 2014).

Les flavonoïdes, en raison de leur faible potentiel redox, sont thermodynamiquement capables de réagir avec des formes d'oxygène hautement réactives R^\bullet comme $l'O_2^\bullet$, $l'OH^\bullet$, alkoxydes (RO^\bullet) et les ROO^\bullet en donnant un atome d'hydrogène : $FL-OH + R^\bullet \rightarrow FL-O^\bullet + RH$

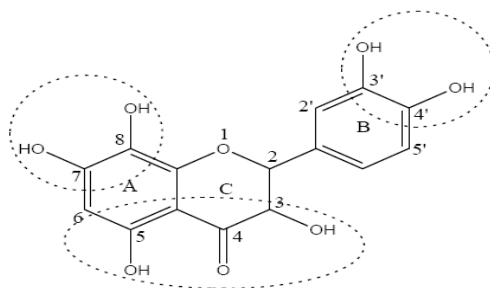


Figure 14: Les caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité élevée de piégeage des radicaux libres (Amić et al., 2003)

✓ Inhibition enzymatique :

Les flavonoïdes ont la capacité d'interagir si fortement avec les protéines en raison de la présence de multiples fonctionnalités phénol (Handique et Baruah, 2002). Les phénomènes d'interaction flavonoïdes-protéines ont été largement étudiés *in vitro*. Des études ont été réalisées sur l'effet des flavonoïdes sur l'oxydation de l'acide linoléique ou acide arachidonique en acides gras polyinsaturés par une lipoxygénase (LOX), afin de préciser le mécanisme d'action de l'activité inhibitrice. Les auteurs ont constaté que ce mécanisme d'inhibition ne serait pas dû à une oxydation ou à une complexation du Fe^{2+} , mais plutôt à une inhibition irréversible résultant de liaisons covalentes entre l'enzyme et les dérivés oxydés de ces flavonoïdes.

Certains sont des inhibiteurs compétitifs de la xanthine oxydase, une oxydase de la NADPH, enzyme clé du stress oxydatif responsable de l'apparition du radical d'anion superoxyde et cela grâce à la double liaison C2-C3. Ils inhibent également d'autres enzymes, notamment la protéine kinase C, l'acide ascorbique oxydase, la cyclooxygénase (COX-1 et COX-2), la lipoxygénase (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX) (Kurek-Górecka et al., 2014).

Les propriétés antioxydantes sont également diminuées par la présence de groupes méthoxy dans la position C-3 des flavonoïdes. Les propriétés antioxydantes les plus puissantes sont représentées par des flavon-3-ols (par exemple : quercétine, myricétine et morine), flavan-3-ols-catéchines (Gallate d'épicatéchine, gallate d'épigallocatechine, épigallocatechine et catéchine) anthocyanidines (cyanidine) (Heim, 2002).

2.2.3. Effet anti-inflammatoire :

L'une de propriétés médicinales bénéfiques de la propolis est son effet anti-inflammatoire (Banskota et al., 2001). L'inhibition de la synthèse de NO, de prostaglandines et des cytokines inflammatoires par ces flavonoïdes, lui confère cette action. Song et al. ont indiqué que l'extrait éthanolique de propolis inhibait non seulement l'activité catalytique du monoxyde d'azote, plus précisément de l'un de ces trois isoformes qui est le NO inductible (i-NOS), mais aussi l'expression de son gène au niveau de la transcription par la suppression de l'activation de NF- κ B (nuclear factor-kappa B) (Song et al., 2002). Il stimule l'activité chimiotactique des neutrophiles à différentes concentrations (Sampietro et al., 2016).

Il a été démontré que les monomères de flavonol suppriment la production d'autres agents pro-inflammatoires qui participent à la régulation des réponses immunitaires et des réactions inflammatoires, notamment les cytokines interleukine (IL)-1 β et IL-6. Le traitement par la quercétine a bloqué (de plus de 80%) la libération du facteur de nécrose tumorale (TNF- α) qui est un contributeur significatif aux réponses inflammatoires chroniques (Karabin et al., 2015).

2.2.4. Effet cytotoxique et anticancéreux:

Des activités anticarcinogènes des composés polyphénoliques de la propolis ont été signalé dans de nombreux travaux scientifiques réalisés sur des modèles de tumeurs murines, et cela au cours de tous les stades de développement du cancer. Au stade avancé, les flavonoïdes ont montré une capacité de supprimer le processus tumoral en inhibant la synthèse de l'ADN, en inhibant l'angiogenèse et en induisant l'apoptose des cellules tumorales.

Des études in vitro et in vivo ont montré la capacité de l'apigenin, kaempferol et la quercetin, a augmenté nettement l'apoptose en modulant l'expression et en renforçant l'activité apoptotique du «ligand induisant l'apoptose associée au facteur de nécrose de tumeurs» (TRAIL) contre les cellules du cancer qui sont résistantes à la cytotoxicité médiée par ce dernier. Il a été aussi montré que la propolis affecte les deux voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque et régule l'activité du facteur de transcription NF- κ B (Szliszka et al., 2009 ; Szliszka et al., 2011)

Le mécanisme par lequel la propolis peut induire l'apoptose, semble être indépendant du type de cellules cancéreuses étudiées, mais dépendant de la concentration de l'extrait de propolis. Ainsi, plusieurs études ont rapporté que la propolis induit l'apoptose par la libération du cytochrome c mitochondrial au cytosol qui est la voie intrinsèque, soit par la voie extrinsèque à travers l'induction des caspases, du ligand TRAIL et des protéines pro-apoptotique (Bax, Bak) ainsi que l'inhibition des protéines anti apoptotique (Bcl2) (Weng et al., 2007).

Parmi les composés actifs possédant des propriétés anticancéreuses, trouvés jusqu'ici dans la propolis, la chryisine. Cette dernière influence le processus apoptotique dans de nombreux types de lignées cellulaires et induit une apoptose dans ces cellules par activation de caspases, suppression de protéines anti-apoptotiques telles que IAPs, protéine inhibitrice de FLICE, phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt et l'inhibition de I κ B kinase et NF- κ B (Premratanachai et Chanchao, 2014).

De plus, la Galangin et la Pinocembrin sont aussi considéré comme les principaux composants phénoliques responsables des effets anti-néoplasiques de la propolis (Catchpole et al., 2015). La galangine, l'un des flavonoïdes les plus abondants dans la propolis algérienne, a significativement réduit la progression et la dissémination tumorale du mélanome et induit à dose-dépendante une autophagie / apoptose. il a été démontré qu'il induisait l'apoptose des cellules du mélanome par l'activation de p38 MAPK et par l'inhibition de la croissance tumorale in vivo et les métastases dans un modèle de mélanome de souris (Benguedouar et al., 2016). L'acide chicorique présentait une puissante activité inhibitrice de MMP-3 in vitro. En outre, l'acide caféique et l'ester méthylique de l'acide (+) chicorique présents dans la propolis algérienne ont significativement inhibé la régulation de la MMP-3 induite par les UVA par les fibroblastes (Segueni et al., 2011).

D'autres études ont montré que la quercétine peut induire l'apoptose dans de nombreux types de lignées cellulaires cancéreuses telles que la lignée cellulaire de cancer pulmonaire A549 (Nguyen et al., 2004), elle inhibe efficacement les activités de la topoisomérase I et II, enzymes qui régulent l'excès ou l'enroulement de l'ADN (Bensasson et al., 2011).

Des tests in vitro ont confirmé que le xanthophumol est capable d'inhiber l'ADN polymérase α humaine, responsable de l'initiation de la synthèse de l'ADN. Cette capacité a été démontrée même pour l'isoxanthophumol, mais avec une efficacité beaucoup plus faible (Karabin et al., 2015)

Toutefois cette activité ne se limite pas uniquement aux flavonoïdes, le CAPE a aussi été connue comme un inhibiteur de ce processus. Le CAPE module l'angiogenèse intra-tumorale et provoque une apoptose tumorale diminuant ainsi la croissance tumorale dans les

carcinomes, il modifie également la fonction NF- κ B et atténue les niveaux de CD44. Ainsi, il provoque la diminution de l'auto-renouvellement des cellules souches du cancer (Catchpole et al., 2015).

2.2.5. Effet chimiopréventif et protecteur contre la toxicité des agents anticancéreux:

Le terme de la « chimioprévention du cancer » qui a été introduit pour la première fois par le Dr Michael Sporn, diffère du traitement du cancer en ce qui concerne l'objectif de cette approche qui est de diminuer le taux d'incidence et du décès par cancer à travers des interventions nutritionnelle ou pharmacologiques fondées sur la prévention plutôt que sur la guérison (Szliszka et al., 2009).

Les études épidémiologiques et précliniques suggèrent que les polyphénols et les flavonoïdes trouvés dans la propolis possèdent des propriétés chimiopréventives. Ceci a accentué les stratégies de prévention du cancer dans lequel la propolis est utilisée comme supplément diététique grâce à leur richesse en polyphénols végétaux (Seydi et al., 2016).

L'effet protecteur de la propolis contre plusieurs types de cancer, y compris le cancer du poumon, peut être direct ou indirecte. L'effet direct est basé sur l'empêchement de l'activation métabolique des carcinogènes, l'inhibition de la prolifération et de la croissance des cellules tumorales par inactivation ou diminution de la régulation des enzymes prooxydantes ou des enzymes de transduction du signal et enfin par l'induction de l'apoptose (Valente et al., 2011), alors que l'effet indirect est basé sur les propriétés de la propolis par piégeage des radicaux libres, l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes et par les propriétés immunomodulatrices via l'activation des macrophages (Oršolić et al., 2013).

Des études ont montré que la propolis améliore la défense immunitaire anticancéreuse, en stimulant l'immunité non spécifique, active l'immunité humorale et améliore l'immunité cellulaire (Szliszka et al., 2009 ; Szliszka et al., 2011).

Le dérivé de l'acide caféique (CAPE) qui est un constituant de la propolis utilisé comme chimiopréventif, inhibe la croissance de cellules tumorales du poumon A549 en utilisant des voies de stress oxydatives couplées à des voies indépendantes de p53, en supprimant efficacement le facteur de croissance transformant TGF- β -renforçant la motilité cellulaire et la TGF- β inductrice de l'Akt (protéine kinase β) ainsi qu'un inhibiteur spécifique de la voie phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/Akt (Ozturk et al., 2012).

La propolis a un rôle protecteur contre la toxicité d'une large gamme d'agents anticancéreux. Une étude a montré que la toxicité rénale induite par l'agents anticancéreux 5-FU, qui est caractérisé par la génération de radicaux libres entraînant un stress oxydatif, l'activation de la

voie apoptotique par régulation positive de p53, des bax, des caspase-3 et régulation négative des Bcl-2, ont été inversées par co-administration de la propolis avec une amélioration des niveaux d'antioxydants et diminution de l'expression des NF- κ B (Rashid et al., 2013; Rashid et Sultana, 2015). Des résultats similaires dans les cellules sanguines avec une amélioration du système immunitaire ont été démontré après l'administration sous-cutanée de l'extrait de propolis (Suzuki et al., 2002).

Le traitement à la propolis pourrait atténuer les effets indésirables causés par l'injection de cyclophosphamide (CTX) qui est métabolisé par les cytochrome P450 en moutarde phosphoramidate et l'acroléine responsables de l'induction du stress oxydatif (El-naggar et al., 2015).

D'après l'étude de Kart et al. (2010) une élévation du taux de MDA et une réduction des réserves en GSH est constaté après traitement par cisplatine, suggèrent que le stress oxydatif causé par la génération des radicaux libres est l'un des mécanismes possibles de la pathophysiologie et de la toxicité des différents organes par cet anticancéreux. Le traitement par le CAPE a réduit de façon significative le niveau élevé des NO \cdot et a également normalisé le niveau du GSH tissulaire, il a pu normaliser l'activité accrue de xanthine-oxydase (XO), qui est connue comme une source importante des ROS dans les cellules. De plus, le CAPE est considéré comme un puissant agent protecteur mitochondrial en bloquant la libération de cytochrome c induite par Ca $^{2+}$ et comme un puissant suppresseur de cytokines pro-inflammatoires en réduisant l'activation de la caspase 1 et des NF- κ B. Il protège également contre la mort cellulaire apoptotique et empêche l'activation de la caspase 3 (Kart et al., 2010).

II. 1. Matériel

1.1. Récolte et préparation des extraits éthanoliques de propolis pour les études in vivo et in vitro :

La propolis a été récoltée par grattage et raclage des cadres et des parois des ruches de la coopérative apicole de la commune de Kaous (Jijel) entre le mois d'avril et mai de l'année 2012 et 2014. Afin d'éviter la dégradation des ses composants, la propolis brute a été stocké à 4°C à l'abri de la lumière.

Pour avoir un extrait éthanolique de propolis (EEP) à 10% (1g de propolis dans 10 ml) dépourvue d'éléments indésirables comme la cire, les pollens et les débris, nous avons procédé à une extraction qui se déroule en trois étapes: une dissolution dans de l'alcool, une filtration et enfin une décantation.

Pour l'extraction de composés phénoliques contenant différents types de flavonoïdes, la propolis a été coupé en petit morceaux puis lavées dans l'éthanol (un solvant polaire) à une concentration de 95% et enfin laissée macérer pendant 2 semaines dans cette solvant avec agitation de temps en temps. Le macérât obtenue est ensuite filtré et soumis à une évaporation à basse pression à 60°C en utilisant un évaporateur rotatif et le résidu obtenue est repris avec de l'éthanol pour subir une deuxième évaporation.

L'extrait est repris par une base hydroalcoolique et la solution hydroalcoolique obtenue est affronté à l'éther de pétrole pour l'élimination des graisses, à l'éther diéthylique afin de récupérer les aglycones flavoniques libres et enfin à l'acétate d'éthyle qui permet d'extraire les aglycones polyhydroxylés et la plupart des flavonoïdes glycosylés.

Pour parvenir à une poudre sèche de propolis qui sera plus facile à utiliser, une évaporation des solvants et une lyophilisation (dessiccation obtenue par congélation brutale à basse température, suivie d'une sublimation sous vide) sont effectuées.

La propolis obtenue va subir plusieurs dilutions dans différents solvant selon chaque expérimentation.

Pour l'étude in vivo afin d'évaluer l'effet protecteur et l'activité antioxydante de l'EEP, une solution hydro-alcoolique est préparé à une dose finale de 25 mg/kg et 1% en éthanol.

Pour l'étude in vitro sur les cellules en culture, l'EEP est préparé en solution mère dans l'éthanol qui sera diluée par la suite dans le milieu de culture RPMI à raison d'une concentration finale d'éthanol de 0,1% maximum, dans chaque puits.

1.2. Produits chimiques :

Le Benzo(a)pyrène utilisé dans notre étude a été obtenue de Sigma Aldrich (cat n°. B10080) ; il a été solubilisé dans l'huile d'olive à une concentration de 200 mg/kg.

II.2. Traitement des animaux

2.1. Espèce animale utilisée et conditions d'hébergement des animaux:

Un total de 40 rats Wistar Albinos femelles, pesant entre 200 et 250 g fournis par l'institut Pasteur d'Alger (Algérie) sont utilisées dans l'étude.

L'hébergement des animaux se fait dans une animalerie maintenue à température ambiante (20 - 26°C), humidité relative : 55–60% et un cycle jour-nuit 12h-12h. Les animaux sont maintenus dans des cages plastiques opaques à raison de 8 rats/cage. La boisson et la nourriture composée d'ingrédients naturels préparés commercialement sous forme de croquettes sont servies ad libitum. Les rats sont mis en quarantaine 7 jours avant leur utilisation.

2.2. Induction de la pathologie expérimentale: le cancer pulmonaire :

Après la période d'adaptation des animaux, nous avons commencé le traitement par l'induction chimique d'un modèle expérimentale du cancer broncho-pulmonaire par le benzo(a)pyrène. Pour cela, une dose de 200 mg/kg véhiculée dans 1 ml d'huile d'olive de B(a)P a été administré aux animaux par voie intra-péritonéale (IP) (Likhachev et al., 1992).

2.3. Traitement des animaux par la propolis et les anticancéreux :

Pour l'étude de l'effet de l'extrait de propolis, les animaux ont été répartis également en 5 lots

Groupe 1 : Témoins(T) : a servi de témoin en recevant une dose unique IP de 1 ml de l'huile d'olive.

Groupe 2 : Benzo[a]pyrene (B) : animaux recevant une seule injection d'une dose de 200 mg/kg de B(a)P dissout dans 1 ml de l'huile d'olive par voie IP.

Groupe 3 : Propolis + Benzo[a]pyrene (PB) : animaux recevant de la propolis à une dose de 25 mg/kg par voie orale pendant 5 jours et du B(a)P 200 mg/kg administré au 6^{ème} jour par voie IP.

Groupe 4 : Benzo[a]pyrene + association d'anticancéreux (BA) : animaux recevant B(a)P à une dose de 200 mg/kg par voie IP. Après 20 semaines (période nécessaire au développement de la tumeur pulmonaire chez le rat) une cure de chimiothérapie composée d'une association de 5-fluorouracil (5 FU) à 15 mg/kg + cyclophosphamide (cyclo) à 15 mg/kg + épirubicine (épi) à 2 mg/kg a été administrée aux animaux.

Groupe 5 : Benzo[a]pyrene + propolis + association d'anticancéreux (BPA) : animaux recevant B(a)P à une dose de 200 mg/kg par voie IP, après 20 semaines, les animaux ont reçus 1 ml de solution de propolis par voie orale correspondant à la dose de 25 mg/kg pendant

5 jours. L'association de 5 FU (15mg/kg) + cyclo (15mg/kg) + épi (2mg/kg) a été administré au 6^{ème} jour.

Les médicaments choisis pour l'étude sont ceux utilisés cliniquement et selon les mêmes doses dans le traitement du cancer du sein et du poumon ; C'est le protocole FEC (Fluorouracile-Epirubicine-Cyclophosphamide)

5-Fluorouracile : 600 mg/m² correspondant à 15mg/kg mg/kg

Epirubicine : 80 mg/m² correspondant à 2mg/kg mg/kg

Cyclophosphamide : 600 mg/m² correspondant à 15mg/kg mg/kg

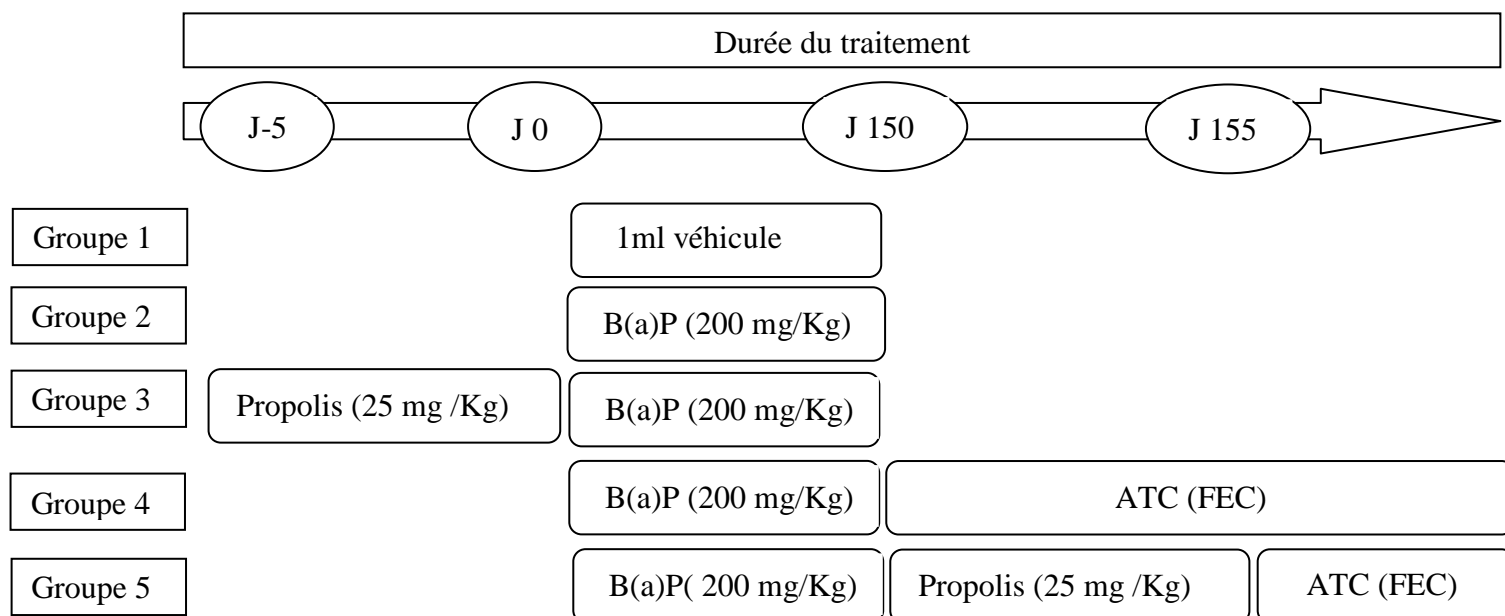


Figure 15: Protocole et durée du traitement des animaux.

B(a)P : Benzo(a)pyrène ; ATC: Anticancéreux ; FEC: Fluorouracile-Epirubicine-Cyclophosphamide.

2.4. Prélèvement des tissus et liquides biologiques :

Avant le sacrifice des animaux, le sang est prélevé dans des tubes héparinés par ponction du sinus rétro-orbital. Après centrifugation à 3300 rpm pendant 10 min le sérum est recueilli et aliquoté puis congelé à - 20°C pour des analyses biochimiques et enzymatiques.

Les animaux ont été sacrifiés après un délai de 20 semaines du début de l'induction de la pathologie par le benzo(a)pyrène.

Au moment du sacrifice, les poumons de chaque rat ont été prélevés, lavés dans une solution de NaCl 9%, pesés et soumis à un examen macroscopique à la recherche d'éventuels signes d'inflammation ou de cancérisation. Ensuite, chaque poumon a été divisé en trois fractions :

- une partie a été stockée à -20°C pour les dosages tissulaires du stress oxydatif ;
- une deuxième partie du poumon a été plongée dans le liquide fixateur (formol à 10 %) pour l'évaluation histopathologique ;
- la dernière partie a été utilisée pour l'extraction des protéines.

II.3. Etude in vitro

3.1. Mesure du stress sur mitochondrie isolée :

3.1.1. Isolement des mitochondries pulmonaires :

Toutes les étapes d'isolement de mitochondries se font au contact de la glace.

Le poumon est recueilli chirurgicalement après sacrifice de l'animal, 1 g est pesé et mis rapidement dans un bêcher ensuite rincé au tampon d'homogénéisation puis coupé en morceau et abondamment rincé à nouveau pour éliminer un maximum de sang. Les morceaux du poumon sont ensuite finement broyés dans un potter de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 streered firm. New Jersey USA) avec 4 ml du tampon d'homogénéisation. Après homogénéisation, les mitochondries sont isolées par une technique standard de centrifugations différentielles avec une centrifugeuse Sigma 3-16 K comme suit : L'homogénat récupéré est centrifugé une première fois à 2000 xg pendant 10 min à 4°C pour enlever les débris cellulaires indésirables. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 17 500 xg pendant 10 min et son culot est remis en suspension dans 1,5ml de tampon d'homogénéisation puis il est centrifugé pendant 10 minutes à 600 xg pour avoir un maximum de mitochondries. Le surnageant contenant les mitochondries est centrifugé à 19000 xg à 4°C pendant 10 minutes.

Le surnageant est ensuite éliminé et la surface du culot est rincé avec le tampon (5ml). Ce culot est ensuite repris avec 1ml du tampon puis centrifugé deux fois à 19000 xg avant d'obtenir la suspension mitochondriale final. La solution mitochondriale est immédiatement placée dans la glace à 4°C pour la mesure de l'anion superoxyde et du gonflement mitochondrial et ce après le dosage des protéines par la méthode de Bradford (Willet et al., 2000).

3.1.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford (1976) :

La concentration totale en protéine des échantillons est déterminée par la technique mise au point par Bradford (Bradford, 1976). Cette méthode consiste en un dosage colorimétrique en utilisant le bleu de Coomassie qui a la propriété de s'adsorber sur les protéines de manière non spécifique et indépendamment de leur séquence. Cette adsorption s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de la molécule avec virage au bleu. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la concentration en protéines dans l'échantillon.

100 µl de la suspension ou de la fraction cytosolique diluée à 1/10^{ème} avec de l'eau distillée (100 µl BSA pour la gamme étalon) sont ajoutés à 4 ml du réactif bleu brillant de Coomassie (BBC). Après agitation et incubation à température ambiante pendant 5 min, la lecture de l'absorbance est effectuée à 595 nm. La concentration des protéines exprimée en gramme est déduite de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions par la BSA (Bovin Serum Albumin)

3.1.3. Mesure de la production d'O₂⁻ par la mitochondrie :

L'anion superoxyde est le principal radical libre généré par la mitochondrie notamment par les complexe I et III de la chaîne respiratoire. Sa génération a été évaluée en mesurant la réduction du nitrobluetetrazolium (NBT⁺²) par l'anion superoxyde en monoformazane, qui absorbe à 560 nm.

La génération de l'anion superoxyde a été évaluée selon la méthode de Morin et al., (2001). La suspension mitochondriale utilisée (1 mg de protéine / ml) dans un volume final de 1,2 ml de mélange réactionnel (25°C) contenant 1 µM CsA, 100 µM de NBT dans le tampon d'incubation (250 mM de saccharose, 5 mM KH₂PO₄, pH = 7,4) additionné de 1 µM de la roténone. La réaction est déclenchée par l'addition de succinate de (6 mM) et le taux de réduction de nitroblurtetrazolium a été mesuré à 560 nm.

3.1.4. Mise en évidence de l'ouverture de PTP: gonflement mitochondriale (swelling) :

Le gonflement mitochondriale est un indicateur de la perméabilité de la membrane mitochondriale, résulte d'une modification d'équilibre osmotique provoquée par l'ouverture du PTP qui entraîne l'entrée de solutés dans la mitochondrie. Le gonflement est évalué à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant à 540 nm la diminution de l'absorption de la suspension mitochondriale

La mise en évidence du gonflement mitochondriale in vitro est réalisée sur des mitochondries en suspension selon la méthode d'Elimadi et al., (1998).

Le système contient 1 mg/ml de mitochondries suspendu dans un volume final de 1,8 ml de tampon respirant supplémenté par de la roténone à 1µM (pour interdire le transfert électronique inverse du complexe II au complexe I) et 6 mM de succinate. Après une minute d'incubation 2,25µl de calcium à 25 uM sont ajoutés pour induire le gonflement. La décroissance de l'absorbance à 540nm est enregistrée chaque minute pendant 5 minutes.

3.2. Etude chimique de la propolis : Activité anti-radicalaire par le test au DPPH° :

L'activité anti-radicalaire de l'EEP a été évaluée in vitro, par le test au DPPH°. Le DPPH° (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) de couleur violette, vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2' diphényl-1-picryl hydrazine. Ceci permet de suivre la

cinétique de décoloration à 515 nm. La mesure de l'activité antiradicalaire des composés à tester (extrait de propolis et de quercétine) a été effectuée par le test au DPPH selon la méthode de Brand-Williams et al., 1995.

Différentes concentrations (0,1, 1, 2,5, 5 et 7,5 mg/ml) d'extrait de propolis ont été ajoutées à 900 µl de la solution méthanolique du DPPH (100 µM). Le mélange a été agité vigoureusement et laissé au repos à température ambiante pendant 30 min. L'absorbance de la solution résultante a été ensuite mesurée à 517 nm (spectrophotomètre Hitachi U-300, Tokyo, Japon) contre un échantillon à blanc contient la même quantité d'éthanol et de DPPH. Pour chaque concentration le test a été effectué en triple. Les résultats obtenus pour chaque dilution testée sont exprimés par rapport à ceux obtenus pour le contrôle positif, représenté par une solution d'un antioxydant standard ; la quercétine. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%).

$$I\% = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100$$

où A₀ est l'absorbance du blanc à 30 min, et A₁ est l'absorbance de l'échantillon à 30 min.

Les valeurs de l'IC₅₀ ont été déterminées graphiquement par la régression linéaire

3.3. Etude de l'effet de l'extrait éthanolique de la propolis sur les cellules pulmonaires :

3.3.1. Culture cellulaire et entretien de la lignée cellulaire :

La lignée cellulaire cancéreuse du poumon utilisée dans les essais est la lignée A549, communément utilisée par les laboratoires de recherche étudiant le cancer du poumon non à petite cellule (Foster et al., 1998), offerte par le Pr. José Luis (INSERM U911 (CRO2), Marseille, France) et distribuée par l'institut pasteur de Tunis. Nous avons choisi cette lignée plus particulièrement parce qu'elle est très faciles à cultiver, caractérisée par son pouvoir hautement invasif et qu'elles ont été bien documentées dans la littérature. De plus elle provient d'un adénocarcinome humain (issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire prélevé chez un patient de 58 ans (Giard et al., 1973)). Lors d'une culture *in vitro* elles se développent sous forme de cellules adhérentes en monocouches ou attachées au flasks.

Les cellules sont cultivées dans le milieu RPMI (GIBCO) dans des flasques à bouchon filtrant (Falcon®). Ce milieu de culture constitué de RPMI est additionné de 10 % de sérum de veau foetal (SVF) contenant des facteurs de croissance et des hormones, de 1% de glutamine, de 1% de pyruvate ainsi que de 1% d'antibiotiques pénicilline et streptomycine (PS). Les cultures sont placées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO₂ et 95% d'humidité.

Le cryotube de 1 ml contenant les cellules A549 congelées a été mis au bain-marie à 37 °C. Après décongélation, les cellules sont reprises dans un volume de 4 ml de milieu nutritif pour être ensuite centrifugés à 100×g pendant 5 min, à 4°C. Cette étape doit être rapide car le DMSO contenu dans le milieu de congélation est toxique pour les cellules.

Après centrifugation, le DMSO est éliminé dans le surnageant et le culot a été resuspendu (aspiration et refolement) avec 2 ml de milieu complet fraîchement ajouté. Afin d'obtenir les cellules en suspension, la solution a été homogénéisée.

Pour conserver la lignée et avoir à disposition un stock de cellule, étant donné que le nombre de cellules de départ était très important, celles-ci doivent être congelées dans un tampon de congélation constitué de 15% (v/v) de DMSO qui est cryoprotecteur et SVF complété par le milieu de culture. Les cellules sont ensuite congelées progressivement dans des cryotubes placées pendant 30 min à -20°C puis à -80°C pour une nuit et enfin transférées dans l'azote liquide à -196°C.

Afin de ne pas entraîner la mort des cellules, le milieu de culture doit être renouveler régulièrement. Les cellules A549 en culture prolifèrent et adhèrent fortement à la paroi des flasques grâce à la sécrétion des protéines d'adhérence, ces cellules vont alors croître jusqu'à recouvrir complètement le fond du flasque.

A 80% de confluence c.à.d. dès lors que les cellules tapissent 80% de la surface de culture, le milieu complet surnageant est prélevé et le tapis cellulaire est rincé avec une solution de PBS-EDTA (Acide éthylène diamine tétraacétique) (10 mM, pH 7,4) (Sigma) chauffé à 37°C. L'utilisation de cette solution est une première étape qui sert à détacher les cellules de leur support. Les cellules sont ensuite décoller du fond du flasque par addition de 5 ml de trypsine (par hydrolyse des liaisons peptidiques responsable de l'adhérence cellulaire) pendant 3 à 5 min à 37°C dans l'incubateur (pour faciliter la trypsination); l'action de la trypsine est ensuite stoppée par addition de 2 ml de milieu complet, en effet le SVF du milieu l'inactive.

L'ensemble est prélevé puis centrifugé 5 minutes à 100×g à 20°C. Le surnageant est éliminé et le culot constitué de cellules est remis en suspension dans du milieu complet et ensemencé dans de nouvelles flasques.

3.3.2. Test de viabilité cellulaire (MTT) :

Le test au MTT (Mosmann, 1983) permet d'évaluer la viabilité des cellules pulmonaires cancéreuses en présence ou en absence de substances à tester. Dans notre étude, il nous a permis d'évaluer l'effet de l'extrait de propolis. Il est basé sur la transformation par une enzyme mitochondriale qui est la succinate déshydrogénase, enzyme active seulement chez les cellules avec une chaîne respiratoire et un métabolisme intacts, du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan. Ces derniers sont solubilisés et sont ainsi détectables à 560 nm par spectrophotométrie.

Ce test est utilisé pour comparer la croissance des cellules témoins à celle des cellules traitées par les molécules de l'échantillon étudié. Pour cela, les cellules sontensemencées dans des puits d'une plaque de microtitration selon la densité requise de 10000 cellules/puit dans 50 µl de milieu de culture spécifique (RPMI). Après 24 heures d'incubation (temps nécessaire pour l'attachement), le milieu est renouvelé en présence ou en absence des différentes concentrations de la propolis (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml et 100 µg/ml)

Après 24 heures, les puits sont lavés au PBS puis 100 µl/puit de la solution (MTT: sigma (5 mg/ml) + RPMI) est ajouté.

Après l'incubation des cellules avec du MTT pendant 3h à 37 °C, le milieu est éliminé par aspiration et les cristaux de MTT formés sont solubilisés par addition de 100µl de DMSO 10 %. A l'aide d'un lecteur de plaques ELISA la densité optique à 560 nm est mesuré permet de connaître la quantité relative de cellules vivantes.

Le pourcentage de viabilité cellulaire a été calculé comme suit:

Viabilité cellulaire (%) = DO moyenne des cellules traitées / DO moyenne des cellules contrôles x 100%

3.3.3. Test de prolifération cellulaire :

Le test de la prolifération nous a permis d'évaluer les effets des extraits de propolis sur la croissance cellulaire et pour mettre en évidence une inhibition de la prolifération.

Les cellules ont été exposées, pendant 72h, à différentes concentrations de propolis diluée dans le milieu de culture : 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml et 40 µg/ml. Ensuite une incubation des cellules avec du MTT pendant 3h à 37 °C est effectué. il est nécessaire de dissoudre les cellules dans du DMSO en ajoutant 100 µl par puits. La valeur d'absorbance à 560 nm a été lue en utilisant le lecteur de microplaque ELIZA (thermo multiscane).

3.3.4. Test d'adhésion cellulaire :

Le but de ce test est de quantifier la capacité des cellules cancéreuses à adhérer sur des protéines purifiées de la matrice extracellulaire (MEC) en présence de notre molécule ou extrait.

Les puits d'une plaque de microtitration à fond plat (Nunc) sont recouverts par 50 µl d'une solution protéique qui sert de substrats d'adhésion. Ce dernier est constitué de : fibrinogène (Fg) à 50 µg/ml, collagène type I (Coll I) et la polylysine (PL) à 10 µg/ml, pendant 2 heures à 37°C. Ces puits sont ensuite saturés avec 50 µl de PBS/BSA 0,5% pendant 1 heure à 37°C.

Pendant la saturation, les cellules sont décrochées par du PBS/EDTA et rincées avec du tampon d'adhésion.

Avant d'être déposées dans les puits, les cellules sont d'abord préincubées avec les différentes concentrations de la propolis (10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml) pendant 30 min à température ambiante sous agitation. Ensuite, 50 µl de suspension cellulaire à 10⁶ cellules/ml de tampon d'adhésion sont déposés par puits et incubés 2 heures à 37°C.

Après incubation, un rinçage avec le tampon d'adhésion est effectué pour éliminer les cellules non adhérentes alors que les adhérentes sont fixées au glutaraldéhyde 1% pendant 10 min à température ambiante. Elles sont ensuite rincées deux fois à l'eau distillée et colorées pendant 30 min par 50 µl de solution de cristal violet à 0,1 %. Après lavage, 100 µl de SDS à 1 % est ajouté pour solubiliser le colorant. L'adhésion cellulaire est quantifiée par mesure de l'absorbance à 600 nm avec un lecteur de plaques de microtitration.

3.3.5. Test de viabilité cellulaire pré-incubé au B(a)P :

Le but de ce test est d'étudier les effets de la propolis sur la lignée cellulaire de cancer pulmonaire exposée au B(a)P.

Pour son dosage nous avons procédé selon la méthode décrite par Ulasli et al., (2013), pour cela les cellules A549 ont étéensemencées dans des flasques de culture de 75 cm² et cultivées pendant 02 jours avant utilisation. Lorsque la confluence à 50% a été obtenue, le milieu de culture a été changé par un milieu frais contenant 20 µM de B(a)P pendant 48h. Le B(a)P a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) puis ajouté au milieu de culture pour arriver à une concentration finale de DMSO inférieure à 0,1%, sachant que le milieu a été changé tous les jours pour maintenir la concentration de B(a)P.

Après 48 heures d'incubation des cellules avec le B(a)P, le milieu de culture contenant du B(a)P a été éliminé et remplacé par le milieu frais contenant la propolis à différentes concentrations. Par la suite le milieu a été éliminé et les cellules ont été utilisées pour

effectuer le test du MTT. Comme témoin, les cellules A549 ont été incubées avec le B(a)P dans du milieu (DMSO) à la même concentration.

II.4. Etude in vivo

4.1. Dosage sérique : mesure des marqueurs enzymatiques : LDH et GGT

L'activité sérique de deux enzymes à savoir, lactate déshydrogénase (LDH) et la gamma glutamyl transpeptidase (GGT) a été mesurée comme étant un marqueur sensible des tumeurs malignes solides telles que le cancer du poumon par l'utilisation de kit adapté à l'analyseur automatique (ECLIA cobas 411) dans le laboratoire médical Bourouied, Jijel, Algérie.

4.2. Dosages tissulaires : évaluation de l'état du stress oxydatif :

4.2.1. Mesure des capacités antioxydantes enzymatiques :

4.2.1.1. Extraction de la fraction cytosolique :

Pour l'extraction de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par Iqbal et al. (2003). Pour cela, 1g du tissu pulmonaire sont coupés et homogénéisés avec 3 volumes de tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) contenant du KCl à 1,17% à l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE (KONTES. Glass company an ISO-9001 streered firm. New Jersey USA).

L'homogénat est d'abord centrifugé, à l'aide d'une centrifugeuse Sigma 3-16 K, à 800 xg pendant 15 minutes à 4°C pour séparer les débris nucléaires ensuite à 12000 tours/min, pendant 30 minutes. Le surnageant ainsi obtenu est récupéré et conservé pour être utilisé comme source enzymatique.

4.2.1.2. Dosage de l'activité de la Superoxyde Dismutase (SOD) :

Pour la mesure de la Superoxyde Dismutase (SOD) nous avons procédé selon la méthode décrite par Beauchamp and Fridovich (1971) qui évalue la quantité de la SOD par sa capacité à inhiber le flux d'anions superoxydes, produits suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine, responsable de la réduction du nitrobleu-tétrazolium (NBT) en bleu de formazan dont l'absorbance est quantifiée à 560 nm.

La mesure est effectuée dans un tampon de réaction (0,1 ml cyanide de sodium (NaCN) (10^{-3} M) ; 0,1 ml solution de NBT ($1,67 \cdot 10^{-2}$ M) ; 1 ml EDTA ($6,6 \cdot 10^{-1}$ M) ; 0,1 ml riboflavine ($2 \cdot 10^{-4}$ M) et 1 ml de méthionine (10^{-2} M), le tout est complété à 10 ml de tampon phosphate Na_2HPO_4 (0,1M pH=7,8). À 2 ml de ce mélange ont été ajoutés 5µl de la source enzymatique (fraction cytosolique) qui est ensuite irradié avec une lampe fluorescente de 15 Watts pendant

10 min. la réduction du NBT en formazan a été mesurée à une longueur d'onde de 560 nm et les valeurs de la SOD sont exprimées en UI/g de protéines

Le contrôle de la réaction a été préparé dans les mêmes conditions mais en absence de la source enzymatique

Une unité d'activité de la SOD est définie en tant que la quantité d'enzymes requise pour empêcher la réduction de NBT par 50 %.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Abs du contrôle} - \text{Abs de l'essai}}{\text{Abs du contrôle}}$$

$$\text{SOD UI/mg de protéines} = \% \text{ d'inhibition} \times 6,35$$

4.2.1.3. Mesure de l'activité de la catalase (CAT) :

L'activité de la catalase a été mesurée par la méthode colorimétrique de Sinha (1972) en utilisant du dichromate / acide acétique dont le principe repose sur le taux de dégradation d' H_2O_2 (substrat de l'enzyme) qui sera calculé après mesure d'absorbance par spectrophotométrie à 570 nm.

0,1 ml de source enzymatique a été ajouté à 1 ml du tampon phosphate (0,01 M, pH=7) et 0,4 ml de H_2O_2 (2M). Le mélange est laissé pendant 60 secondes puis 2ml de dichromate/acide acétique (5% de dichromate de potassium et d'acide acétique on été mélanger à 1 :3) pour stopper la réaction. Après chauffage à 100°C pendant 10 min et refroidissement à T° ambiante la lecture est effectuée à 570 nm.

L'activité enzymatique est exprimée en μM d' H_2O_2 consommé/min/mg protein selon la relation suivante :

$$\mathbf{Kat .F} = \frac{\mathbf{K(0)}}{\text{g proteine / ml}}$$

Sachant que:

Kat .F = quantité de catalase dans la préparation enzymatique

K(0) : constante de vitesse de la catalase K(0) à 0 min est déterminé par extrapolation de la constante de vitesse de décomposition de H_2O_2 (**K**)

$$\mathbf{K} = \frac{1}{\mathbf{T}} \log \frac{\mathbf{S}_0}{\mathbf{S}}$$

S₀: concentration initiale de peroxide

S : concentration de peroxide à T minute

T : temps en mn.

4.2.1.4. Mesure de la glutathion-S-transférase cytosolique (GST) :

L'activité de la GST a été déterminée selon la méthode décrite par Habig et al. (1974) dont le principe repose sur la formation d'un complexe entre le substrat artificiel du GST, le-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et le glutathion (GSH) comme cofacteur, en présence de l'enzyme. L'absorbance du complexe coloré est détecté par spectrophotomètre à 340 nm.

Pour le dosage nous avons utilisé un mélange réactionnel qui contient 1700 µl du tampon phosphate (0,1M, pH 6,5) et 100 µl du CDMB (20 mM). Après incubation du mélange réactionnel à 37 °C pendant 10 min, la réaction est démarrée par l'addition de 100 µl de l'homogénat et de 100 µl du glutathion (20 mM)

La variation de la densité optique due à l'apparition du complexe GST-CDNB est lue à 340 nm chaque minute pendant 5 min.

L'activité de la GST est exprimée par µmoles de CDMB conjugué/min/mg protéine, en utilisant le calcul suivant :

$$\text{UI/ml d'enzyme} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min Test} - \Delta A_{340}/\text{min Blanc}) / (Vt) (Fd)}{(9,6) (Vez)}$$

Vt : volume total (ml) de l'essai ;

Fd : facteur de dilution ;

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

Vez : volume (ml) de l'enzyme utilisée.

$$\text{UI/mg protéines} = \frac{\text{UI / ml d'enzyme}}{\text{mg de protéine/ml d'enzyme}}$$

4.2.2. Mesure des capacités antioxydantes non enzymatiques : glutathion (GSH) :

Pour évaluer le taux de glutathion réduit chez les rats, nous avons utilisée la méthode colorimétrique décrite par Ellman (1959) en utilisant le réactif DTNB (Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman qui sera réduit par les groupes thiol (SH) pour donner l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque (TNB), produit de coloration jaune présentant une absorbance à une longueur d'onde de 412 nm.

1g de poumon sont coupés et homogénéisés dans 9 ml Tris-Hcl (0.1M, pH=7,4). A 0,5 ml de surnageant obtenue par la précipitation de 1 ml d'homogénat dans 1 ml de TCA 5%, sont

ajoutées 1 ml de réactif d'Ellman (0,0198% DTNB dans 1% sodium citrate). Le volume est complété à 3 ml du tampon phosphate (0,3 M, pH=8.0). Finalement la couleur obtenue est lue à 412 nm contre un blanc et les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/g}$ tissu en utilisant une gamme étalon du GSH dans les mêmes conditions.

4.2.3. Mesure des dégâts oxydatifs cellulaires : dosage du MDA:

La mesure du malondialdéhyde (MDA) peut être réalisée de manière globale par réaction avec l'acide thiobarbiturique connue sous le nom de 'substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique' (TBARS). Pour cela la méthode spectrophotométrique d'Ohkawa et al. (1979) est utilisé dont le principe est le suivant: en milieu acide et à température 95-100 °C chaque molécule du malondialdéhyde (MDA) issu de la lipoperoxydation réagit avec deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) conduisant à la formation d'un complexe de couleur rose (MDA-TBA) dont l'absorbance sera mesurée à 530 nm.

0,5 ml de TCA 20% et 1 ml de TBA (0,67% dans NaOH 50 mM) sont ajoutés à 0,5 ml d'homogénat obtenue par broyage du tissu pulmonaire dans du KCl (150 mM) à 10 volume (poids/volume) à l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE. Par la suite le mélange est placé dans le bain marie pour chauffage de 15 minute à 100°C, refroidi à l'eau de robinet pour stopper la réaction et additionné de 2 ml du n-butanol. Le tout est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 rpm.

Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est récupéré pour la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 530 nm contre un blanc fait de 0,5 ml d'eau distillée traité de la même façon. Les absorbances ont été converties en équivalents du MDA en nmol/mg de protéines en utilisant une solution de TMP (son hydrolyse donne le MDA).

4.3. Détermination de l'expression des protéines apoptotiques dans le tissu pulmonaire :

4.3.1. Préparation de l'extrait de protéine cytosolique :

L'extraction des protéines a été préparé par l'homogénéisation du tissu pulmonaire des différents groupes à 4°C dans un volume de 500 μl d'un tampon d'extraction de protéines RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1% ou Triton \times 100 0.1%, Sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, Tris-Hcl 50mM, pH=8 et de l'inhibiteur de protéase à 1/1000 ajouté avant utilisation). L'homogénat subit une agitation vigoureuse à froid suivi d'une centrifugation à 13000 \times g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant issu de cette centrifugation qui représente la fraction de protéines cytosoliques, à été utilisé pour la mise en évidence des différentes protéines.

4.3.2. Immunodétection des protéines par western-blot :

Les protéines ont été séparées en fonction de leurs masses sous l'effet d'un champ électrique. Nous avons utilisé un gel de polyacrylamide de 12,5 % en présence de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) pour mettre en évidence l'expression des Caspases 3 (ou Caspases 3 clivée) et PCNA, et un autre gel de 7 % pour les P65, les COX2 et NOS3.

Une migration électrophorétique est effectuée sous une tension de 160V pendant 50 à 60 min dans un tampon de migration (Tris-bas 25 mM pH=8,3 ; glycine 190 mM ; SDS 0,1% ; H₂O). Le transfert des protéines séparées est réalisé sur une membrane en nitrocellulose à voltage constant de 100V pendant 60 min dans un tampon de transfert (Tris 48 mM pH=8,2 ; glycine 39 mM ; méthanol 20% ; H₂O). La membrane est ensuite saturée à température ambiante dans du lait écrémé 10 % puis mises en contact des anticorps primaires anti-caspase3 (Cell Signaling, 1/1000), P65 (Santa-Cruz Biotechnology, 1/1000), PCNA, COX2, NOS3, Actine (Abliance, 1/2000), et été ensuite incubées pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages successifs de 5 minutes avec du tampon TBS-T (Tris 50 mM ; NaCl 150 mM ; Tween 0,1% (v/v)), les membranes ont été alors incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG couplé à la HRP de lapin et de souris: 1/5000 (Sigma) pendant 1 heure à température ambiante, puis elles ont été à nouveau rincées 3 fois pendant 5 minutes avec du tampon TBS-T.

L'immunodétection a été réalisée avec un Kit ECL (Biorad) et la lecture se fait par prise de photographies numériques des films et est analysées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image DNR Bio Imaging Systems.

4.3.3. Immunohistochimie :

L'immunohistochimie du Ki 67 a été réalisée au laboratoire d'anatomie-pathologie du CHU de Bejaia, Algérie. A partir des blocs de tumeurs incluses en paraffine, des coupes de 4µm d'épaisseur ont été réalisées sur des lames en verre à l'aide d'un microtome. Les lames ainsi préparées ont été séchées à 50°C pendant une nuit dans une étuve. Les coupes ont ensuite été déparaffinées dans 3 bains de xylène de 5 min chacun puis réhydratées dans une série de bain d'éthanol (100°, 90° et 70°) suivi d'un rinçage à l'eau distillée.

Le démasquage de l'antigène Ki-67 est réalisé par l'introduction des coupes dans un bain d'une solution basique à pH=9 à 100°C pendant 60 minutes. Après un refroidissement à l'air ambiant pendant 20 minutes, un rinçage à l'eau distillé est réalisé.

Le traitement immunohistochimique des coupes de tumeurs commence par l'ajout de peroxydase block et de protéine block (NovocastraTM, Leika systems) suivi d'un rinçage dans PBS par 10 min chacun, successivement. Les coupes sont par la suite exposé à 100 µl

d'anticorps primaire Ki-67 pendant 30 min à température ambiante après lavage au PBS pendant 10 min, les coupes sont traitées à l'anticorps secondaire (NovocastraTM, Leika systems). La révélation du marquage est réalisé par le DAB (3,3'-Diaminobenzidine) chromogène de couleur marron dilué au 1/20, alors que la contre coloration par l'hématoxyline suivi par un rinçage au PBS est nécessaire pour bien visualiser les noyaux. Enfin une réhydratation par des bains d'alcool ascendants et de xylène est effectuée. Après révélation le dépôt de lamelle est déposé, procédé par un dépôt d'une goutte de solution aqueuse de montage.

4.4. Examen anatomopathologique :

4.4.1 Examen macroscopique des poumons :

Préalable à l'examen au microscope. Après sacrifice des rats et prélèvement des poumons, ces derniers ont été plongés dans une solution de NaCl 9 % suivi d'examen des caractéristiques visibles sous l'œil nu à la recherche des signes de cancérisation.

4.4.2 Examen microscopique des poumons:

- **Fixation et inclusion :**

Les coupes et les colorations ont été effectuée dans le laboratoire d'anatomie-pathologie de l'hôpital de Jijel sur des biopsies fixées dans du formol. Ce dernier permet de conserver les constituants cellulaires dans un état le plus proche possible de l'état vivant.

Après la fixation, ces prélèvements subissent une déshydratation en les plongeant dans des bains successifs d'alcool à des degrés croissants d'éthanol 70°, 80°, 90° et de l'éthanol absolu puis deux bains de xylène (Shander Citadel 2000, Thermo scientific. Germany) de 20 minutes chacun. Après déshydratation, et à l'aide d'un distributeur automatique de paraffine (Shandon Histocenter 3, Thermo electron corporation, Germany) les prélèvements sont coulés dans des moules contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide et qui vas infiltrer toute la pièce. Après refroidissement, on obtient un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse par un distributeur automatique de paraffine (Shandon Histocenter 3, Thermo electron corporation, Germany), son but est de permettre la réalisation des coupes fines et régulières.

- **Coupes histologiques et étalement :**

Les blocs de paraffine obtenus sont ensuite coupés à l'aide d'un microtome (Leica, RM 2125 RT) en coupes de 2 µm d'épaisseur qui vont être étalées et collées sur des lames en verre avec

un gel de gélatine 2% puis séchées pendant une nuit dans une étuve réglée à une température entre 35-42°C avant d'être déparaffinées.

- **Déparaffinage et réhydratation :**

Le déparaffinage des coupes est réalisé avec deux bains successifs de xylène et de deux autres bains d'éthanol absolu suivis de réhydratations en les plongeant dans des bains successifs d'éthanol 95°, deux bains d'éthanol 70° et un bain d'eau distillée.

- **Coloration et montage des coupes :**

Après réhydratation, les coupes sont colorées dans le but de renforcer le contraste et de rendre plus évident les différents constituants cellulaires et tissulaires.

La coloration utilisée est celle de l'hématoxyline suivie de l'éosine (HE) (Shandon Varistain 24-4, Thermoelectron corporation, Germany). brièvement, les lames sont plongées dans des bains successifs de : l'hématoxyline (3 min), dans l'eau de robinet (2min), puis dans un bain d'éosine (2 min) suivie d'un bain d'eau distillée (2 min) avant une déshydratation dans un bain d'alcool absolu pendant 6 minutes et enfin un bain de xylène pendant 15 minutes. Les lames ont été ensuite conservées dans des boîtes à température ambiante jusqu'à la lecture par microscope optique après être scellées avec des lamelles à l'aide d'une colle EUKITT.

4.5. Traitement statistique :

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type. Le test t de Student a été utilisé au cours des expériences pour évaluer la signification statistique des groupes traités par rapport au groupe contrôle. Pour la p - valeur, des étoiles sont utilisées afin d'indiquer l'importance de la signification

- ✓ $P > 0.05$: la différence n'est pas significative (ns).
- ✓ $P < 0.05$: la différence est significative (*).
- ✓ $P < 0.01$: la différence est très significative (**).
- ✓ $P < 0.001$: la différence est hautement significative (***)

Les cellules épithéliales des voies respiratoires sont les cellules les plus vulnérables aux produits volatiles toxiques comme les HAP et spécifiquement le B(a)P, connu pour ses effets cancérigènes et mutagènes, et qui a été classé comme cancérogène de groupe 1 (IARC, 2010). L'incidence globale de la mortalité liée au cancer du poumon ainsi provoqué, dépasse celle de tous les autres cancers et désigne une impossibilité du traitement curatif (Lehman, 2016) d'où le recours aux méthodes préventives a éveillé l'activité de nombreux chercheurs. Ces derniers ont démontré un grand intérêt à l'emploi des produits naturels, riches en substances bioactives à l'égard de leurs effets bénéfiques et leurs faibles toxicités.

Des études *in vivo* sur les animaux et *in vitro* sur les cultures cellulaires ainsi que les essais cliniques ont suggéré un rôle préventif des antioxydants contre la tumeur maligne (Garewal, 1995). Ainsi, des études épidémiologiques et précliniques ont montré que la propolis comme antioxydant riche en polyphénols et surtout les flavonoïdes possède des effets antitumoraux et chimiopréventifs directs. Cela a accentué les stratégies de prévention du cancer dans lesquelles la propolis a été utilisée comme complément alimentaire (Seydi et al., 2016).

I. Effet du traitement par l'extrait éthanolique de propolis (EEP) au cours d'un cancer pulmonaire induit expérimentalement par le Benzo(a)pyrène

I.1. Effet de l'EEP sur le poids pulmonaire et la croissance corporelle :

Afin d'évaluer l'effet du traitement par l'EEP sur le poids corporel et le poids des poumons, des différentes pesées sont effectuées le jour du sacrifice des animaux, c'est-à-dire à la fin de l'étude expérimentale.

Le tableau 4 ci-dessous, montre les variations des valeurs en fonction des différents lots d'animaux.

Tableau 4 : influence de l'administration de l'extrait éthanolique de propolis sur le poids des poumons et sur le poids corporelle

Paramètres	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Nombre de rat examinés	8	8	8
Poids corporelle (g)	300 ± 10	204,53 ± 21,87 ^{**} , ¹	246,66 ± 15,27 ^{**} , ²
Poids du poumon (g)	1,15 ± 0,06	2,31 ± 0,2 ^{**} , ¹	1,58 ± 0,1 [*] , ²
Le poids relatif des poumons (ROW) (%)	0,38	1,129	0,64

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=8). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).
 1 : le groupe 2 comparé avec le groupe 1. 2: le groupe 3 comparé avec le groupe 2.

La valeur moyenne du poids corporel des rats traités par le B(a)P était de $204,53 \pm 21,87$ g contre 300 ± 10 g, poids moyen des rats témoins qui n'ont rien reçu. Au contraire le poids des poumons était significativement augmenté ($p < 0,01$) dans le lot traité par le B(a)P par rapport à celui des rats témoins. La propolis a augmenté d'une manière très significative ($p < 0,01$) le poids corporel et a significativement réduit ($p < 0,05$) le poids du poumon dans le groupe 3 par rapport au groupe 2.

Le poids relatif des poumons (ROW) est calculé dans le but d'ajuster la mesure à la corpulence, nous avons divisé le poids du poumon par le poids corporel $\times 100$. Les données ont montré qu'il y a une augmentation du poids relatif du poumon avec une valeur de 0,64 et 1,129 dans le groupe 3 et le groupe 2 respectivement, par rapport au groupe témoin, avec un taux le plus élevé dans le groupe des rats traités par le B(a)P.

La perte de poids considérablement observée chez les animaux traités par le B(a)P pourrait être due à la cachexie, à l'anorexie ou à la malabsorption principalement due à l'effet toxique des métabolites réactifs du B(a)P sur les différents organes et systèmes du corps avec une perte de muscle squelettique et tissu adipeux. L'ensemble de ces signes cliniques est caractéristique dans le cas de la pathologie tumorale (Tessitore et al., 1994). En outre une augmentation significative de la tumorigenèse observée dans le poumon pourrait résulter d'une prolifération incontrôlée de cellules cancéreuses avec une augmentation des nodules ainsi qu'une accumulation des cellules inflammatoires dans cet organe. Nos résultats sont en accord avec les données trouvées dans la littérature et stipulant que la diminution du poids corporel et l'augmentation du poids pulmonaire des animaux est un symptôme commun de la carcinogénèse du poumon induite par le B(a)P (Ravichandran et al., 2011; Kasala et al., 2015).

L'administration de l'EEP a contribué à l'augmentation du poids corporel montrant que l'appétit des rats n'a pas été affectée par l'administration du B(a)P. La propolis a notamment diminué le poids du poumon, montrant ainsi l'efficacité protectrice de cet extrait avant le traitement par cet agent cancérigène. Une diminution du poids du poumon chez des rats traités par le flavonoïde Fisetine, considéré comme un constituant de la propolis, a été signalé par un groupe de chercheurs, où la supplémentation en ce flavonoïde dans les groupes prétraités a inversé le poids corporel et les changements du poids pulmonaire observés chez les animaux portant un cancer du poumon (Ravichandran et al., 2011). Cependant, da Silva et al. 2015 rapportent une augmentation du poids de cet organe après l'administration d'extrait hydroalcoolique de la propolis (da Silva et al., 2015).

I.2. Effet de l'EEP sur les marqueurs enzymatiques sériques :

Nous avons évalué dans notre étude deux marqueurs enzymatiques sériques servant d'indicateur de la réponse du cancer à son environnement, qui sont la lactate déshydrogénase (LDH) et la gamma-glutamyltranspeptidase (GGT). Ces deux enzymes se trouvent à des taux élevés dans les tumeurs malignes, pour cette raison elles forment des marqueurs utiles et pratiques en termes de pronostic et de diagnostic précoce avec une spécificité et une sensibilité par rapport à d'autres enzymes (Jarari et al., 2013).

Le tableau 5 représente l'effet de la propolis sur ces deux marqueurs enzymatiques.

Tableau 5: effet de la propolis sur l'activité des marqueurs enzymatiques du sérum des différents groupes

Paramètres	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
LDH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines)	1,15 \pm 0,016	3,07 \pm 0,046 ^{**1}	1,51 \pm 0,076 ^{*2}
GGT (nmoles/min/mg de protéines)	1,938 \pm 0,102	3,414 \pm 0,364 ^{***1}	2,574 \pm 0,225 ^{***2}

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type (n=8). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

1: le groupe 2 comparé avec le groupe 1.

2: le groupe 3 comparé avec le groupe 2.

Les activités de LDH et de la GGT sont très significativement augmentées $p < 0,01$ et $p < 0,001$, respectivement dans le groupe des rats qui ont reçu le B(a)P (groupe 2) par rapport au groupe témoin (groupe 1). Le traitement par la propolis a diminué de manière significative ($p < 0,05$) le taux de LDH et de façon hautement significative ($p < 0,001$) les valeurs de la GGT par rapport au 2^{ème} groupe.

Les résultats de notre expérimentation concernant le taux de LDH, trouvé élevé dans le groupe de rats cancéreux, sont en accord avec les résultats d'Anbarasi, 2005 où des taux élevés de ce marqueur ont été rapportés dans les sérums des patients atteints de cancer du poumon (Anbarasi et al., 2005). Cette élévation est due à un taux glycolytique élevé qui est une stratégie probable pour la survie des cellules tumorales puisque la LDH qui est une enzyme cytosolique, est capable de réguler la conversion du pyruvate au lactate en utilisant NAD comme cofacteur (Jarari et al., 2013). Le taux glycolytique élevé conduisant à une production élevée d'acide lactique, est important pour la prolifération rapide des cellules cancéreuses non seulement comme source majeure d'énergie mais aussi pour fournir à ces

cellules des précurseurs pour la biosynthèse des nucléotides et des lipides. Une autre étude a prouvé que la production de LDH et de lactate est impliquée dans les différentes étapes du développement d'une tumeur, dans l'initiation, l'invasion, les métastases et la récurrence (Miao et al., 2013). Quant à la GGT qui est une enzyme liée à la membrane et qui joue un rôle capital dans la détoxification cellulaire par le glutathion puisqu'elle constitue l'enzyme clé du métabolisme inter-organe du GSH et de ses dérivés (le cycle du GSH caractérisé par Meister) (Meister, 1995), ceci permet la synthèse intracellulaire du glutathion, le principal thiol anti-oxydant. Des niveaux sériques élevés de la GGT sont des marqueurs de stress oxydant résultant de différents facteurs, ils servent également de marqueurs spécifiques pour le pronostic des événements cancérogènes (Fentiman, 2012). Des études ont montré des valeurs élevées de cette enzyme dans les tumeurs malignes comme le cancer pulmonaire et le mélanome (Ngo et Nutter, 1994) qui sont en accord avec ceux trouvés dans notre étude.

Nos résultats montrant une baisse de l'activité de ces deux enzymes dans le groupe traité par la propolis, corrobore avec ceux d'autres études où les taux de LDH et de la GGT ont été diminués à un niveau presque normal dans le groupe prétraité avec de la galangine, révélant l'effet protecteur des flavonoïdes présents dans la propolis, contre le cancer induit par le B(a)P (Devadoss et al., 2014). D'autres flavonoïdes ont montré le même effet sur l'activité de ces deux enzymes où leurs niveaux ont été trouvés proches de celui des groupes témoins (Kamaraj et al., 2009).

I.3. Effet anti-radicalaire de l'EEP par le test au DPPH[•] :

Nous avons mesuré in vitro la capacité de l'extrait éthanolique de notre propolis à piéger les radicaux libres en utilisant la méthode au DPPH. La cinétique de décoloration à 517 nm du DPPH[•] (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune, a été déterminée en présence des différentes concentrations croissantes de l'EEP comparées à la quercétine, flavonoïde utilisé comme référence. La Figure 16 ci-contre représente le pourcentage de réduction du radical DPPH ainsi que la concentration inhibitrice (IC₅₀) des deux composés (l'EEP et la quercétine) utilisés à différentes concentrations.

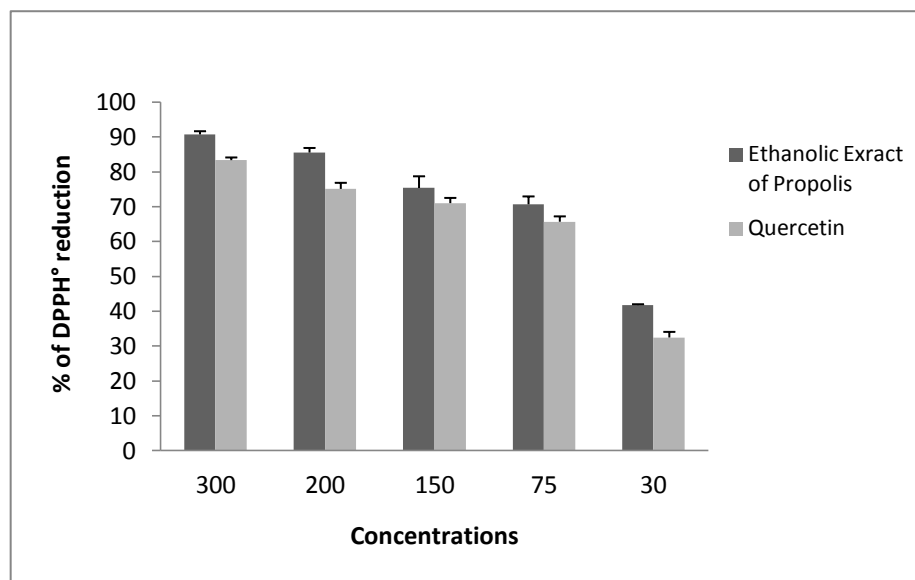


Figure 16: Evolution de l'activité antiradicalaire de l'extrait éthanolique de la Propolis (EEP) et de la Quercétine en fonction de la concentration. Chaque valeur est exprimée en moyenne \pm écart-type de trois expériences indépendantes.

À partir de la figure nous pouvons constater que l'effet antioxydant de l'EEP est nettement supérieur à celui de la quercétine. L'activité anti-radicalaire des deux produits est dose-dépendante avec un taux maximum de 90,73% pour la concentration de 300 $\mu\text{g/ml}$ de l'EEP contre un taux de 83,34% pour la même concentration de la quercétine. L'IC₅₀ de l'EEP et de la quercétine est de 43,9 $\mu\text{g/ml}$ et 54 $\mu\text{g/ml}$ respectivement, montrant que la propolis algérienne possède un puissant pouvoir de piégeage des radicaux libres. Nos résultats sont en accord avec ceux de piccinelli et al. 2013 qui ont rapporté que les différents échantillons de propolis algérienne possèdent une forte activité antioxydante avec un IC₅₀ qui varie entre 32,3 et 82 $\mu\text{g/ml}$.

Il y a une corrélation positive entre le contenu de la propolis en flavonoïdes et son activité antioxydante, cette dernière est étroitement liée à la structure de ces flavonoïdes qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène, interrompant ainsi la réaction de propagation des radicaux libres qui s'appelle chain breaking ou effet briseur de chaîne, et cela est dû à la présence d'une double liaison entre le carbone C-2 et C-3, ainsi que la présence de groupes hydroxyle hautement réactifs (3' et 4'-dihydroxy) dans le cycle B ainsi que la présence du groupement hydroxyle (C3-OH et C5-OH) fortement réactif dans les cycles A et C (Kurek-Górecka et al., 2014). En outre grâce à leur lipophilie, les flavonoïdes permettent d'inhiber la peroxydation à différents stades : d'initiation en inactivant le radical hydroxyle, de propagation par l'inactivation du radical lipoperoxyde et enfin de

terminaison en agissant sur le radical lipidique et sur le radical alcoyle (Ostrowska et Skrzydlewska, 2005). Grâce à la double liaison C2-C3, les flavonoïdes ont la capacité d'interagir si fortement avec les protéines (Handique and Baruah, 2002). Ils inhibent également la xanthine oxydase ainsi que d'autres enzymes, notamment la protéine kinase C, l'acide ascorbique oxydase, la cyclooxygénase (COX-1 et COX-2), la lipoxygénase (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX), la Na⁺/K⁺ ATPase, cAMP phosphodiesterase (Kurek-Górecka et al., 2014). Les composés flavonoïdiques peuvent aussi chélater les ions métalliques de transition, comme le fer et le cuivre, responsable de la création des radicaux libres (catalysant la réduction de H₂O₂ en radical hydroxyle (OH[•])).

Ces résultats ont été confirmés par l'effet in vivo de la propolis en relation avec cette étude. Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment dans la partie Matériel et Méthodes, une évaluation de l'activité antioxydante de l'EEP contre le stress oxydatif provoqué par le B(a)P ainsi qu'une étude histologique et immunohistologique ont été réalisés.

I.4. Influence de l'EEP sur la peroxydation des lipides membranaires des cellules pulmonaires :

Le traitement par le B(a)P produit de grandes quantités de radicaux libres, qui interagissent à leur tour avec les lipides membranaires et par conséquent induisent la peroxydation lipidique (LPO) dans le tissu pulmonaire des rats, qu'elle soit cellulaire ou mitochondriale (Kamaraj et al., 2007 ; Anandakumar et al., 2008). Les changements progressifs de l'architecture cellulaire dus au stress oxydatif et à la LPO générée lors du métabolisme du B(a)P dépendant du cytochrome p450 (CYP1A1), ont été impliqués lors de la carcinogenèse pulmonaire. En effet la peroxydation étendue des acides gras associés aux membranes, provoque une altération de la fluidité de la membrane cellulaire, une perméabilité accrue des ions et, éventuellement, induit une rupture de la membrane étendue jusqu'à la rupture, avec la libération des organelles. Ainsi la LPO n'affecte pas non seulement le fonctionnement cellulaire normal, mais elle aggrave également l'état de stress oxydatif grâce à la production des radicaux dérivés de lipides. Il a été proposé que ces changements oxydatifs cumulatifs puissent servir de médiation aux modifications phénotypiques et génotypiques qui conduisent à une suppression immunitaire et à une mutation cellulaire arrivant jusqu'à une néoplasie (Samir and Kholy, 1999).

Nous avons évalué la production du malondialdéhyde (MDA), qui traduit une peroxydation lipidique due à une production excessive des radicaux libres, chez les animaux au cours des

différents traitements. La figure 17 ci-dessous montre l'effet de l'EEP sur la peroxydation lipidique membranaire au niveau de la cellule.

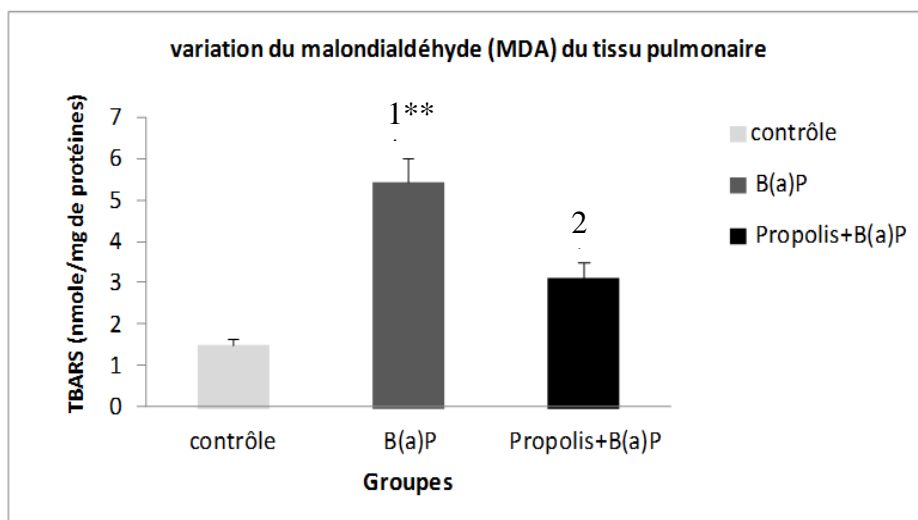


Figure 17 : Variation des concentrations du MDA dans les différents groupes traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type (n=8). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$). 1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P

Nos résultats montrent une augmentation du taux de TBARS chez les rats traités par le B(a)P par rapport aux rats témoins et ceux recevant la propolis ($p < 0,001$). En effet, dans ce groupe le taux du MDA est également le plus important avec une valeur de $5,44 \pm 0,56$ nmole/mg de protéines par rapport à $1,48 \pm 0,16$ nmole/mg de protéines chez les rats témoins. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études où les produits de LPO comprennent les aldéhydes comme le MDA, ont été trouvés avec des taux très élevés lors du traitement au B(a)P et ont également été trouvés impliqués dans la formation de tumeurs en interagissant avec l'ADN pour former des adduits MDA-ADN. Ces derniers induisent des altérations génétiques ainsi qu'une inhibition d'enzymes protectrices aboutissant à la carcinogenèse (Kim et Lee, 1997 ; Kasala et al., 2015). Une étude a montré que les B(a)P-quinones étaient les plus efficaces dans la production de MDA dans les sérums de rats lorsque ces derniers ont été traités avec le B(a)P ou avec l'un des métabolites, y compris les B(a)P-quinones. Les résultats de la même étude suggèrent que les ROS générés pendant le cycle redox des B(a)P-quinones peuvent interagir avec les lipides membranaires et par conséquent induire une peroxydation des lipides, qui est directement associée à la formation continue de B(a)P-quinones (Kim et al., 2000). Gupta et al. (1988) ont démontré que le B(a)P augmentait significativement la peroxydation lipidique dans les poumons 12 heures après l'administration (Gupta et al., 1988).

Le MDA lui-même peut avoir une action inhibitrice sur les enzymes antioxydantes et donc peut agir comme un promoteur de cancer et agent cocarcinogène (Samir et Kholy, 1999).

D'autre part, une diminution significative ($p < 0,05$) de la concentration du MDA a été observée dans le troisième groupe recevant l'EEP à une dose de 25mg/kg avec une valeur de $3,12 \pm 0,38$ nmole/mg de protéines contre $5,44 \pm 0,56$ nmole/mg de protéines chez les rats malades, montrant clairement l'activité antioxydante ainsi que le piégeage des radicaux de notre propolis conduisant à la réduction des effets délétères du B(a)P. Une autre étude sur des souris exposées à la fumée de cigarette à court terme a montré une diminution des niveaux du MDA dans les homogénats pulmonaires après l'administration de la propolis (Lopes et al., 2013). Ces résultats ainsi que les nôtres sont en accord avec de nombreuses études qui ont démontré l'effet protecteur des polyphénols de la propolis tels que la chrysin et d'autres composants de la propolis comme le CAPE contre les dommages oxydatifs du poumon des rats, et cela par la suppression de la peroxydation lipidique et l'inhibition de l'activité lipoxigénase (Yildiz et al., 2008, 2008; Kasala et al., 2016).

De plus les flavonoïdes dont la propolis est riche, peuvent pénétrer les bicouches lipidiques grâce à leur lipophilie ce qui permet d'inhiber la peroxydation. Ils peuvent aussi, par l'influence directe, stabiliser les membranes biologiques, les rendant plus résistantes à l'oxydation en diminuant leur perméabilité.

La peroxydation non enzymatique peut être arrêtée au stade de:

- Initiation, à la suite de l'inactivation du radical initiateur (radical hydroxyle): $FL-OH$ (flavonoïdes) + $OH^\bullet \rightarrow H_2O + FL-O^\bullet$ (radical phényloxyle)
- Propagation, due à l'inactivation du radical lipoperoxyde (LOO^\bullet): $LOO^\bullet + FL-OH \rightarrow LOOH + FL-O^\bullet$
- Terminaison résultant de l'inactivation d'un LOO^\bullet , d'un radical lipidique (L^\bullet) et d'un radical alcoyle (LO^\bullet), résultant de la peroxydation lipidique par des ions métalliques: $LOO^\bullet / LO^\bullet / L^\bullet + FL-OH \rightarrow LOOH / LOH / LH + FL-O^\bullet$

Le radical résultant est moins agressif et peut subir d'autres réactions radicalaires pour donner une structure stable (Ostrowska et Skrzydlewska, 2005).

D'autre part, la propolis a la capacité de renforcer la synthèse de défenses anti-oxydantes tel que le glutathion (voir plus bas), un des cofacteurs des voies de détoxification et de régulation du potentiel redox, ainsi que l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes (Oršolić et al., 2013), ce qui permet de réduire l'effet néfaste des ROS en les inactivant, d'où le faible taux de MDA observé.

Sur la base du fait que le B(a)P génère des ROS dans son processus métabolique, nous avons l'intention d'évaluer son effet sur l'activité des antioxydants qu'ils soient enzymatiques ou non, ainsi que l'effet de notre extrait sur ces activités.

I.5. Influence de l'EEP sur le niveau du glutathion des cellules pulmonaires :

Le poumon est considéré comme l'un des plus importants organes de stockage du glutathion sous sa forme réduite (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine) (Moron et al., 1979). La concentration intracellulaire en GSH qui est un tripeptide ubiquitaire important, est considérée par certains auteurs comme un véritable marqueur de l'état de santé d'un individu; il est très important comme système biologique antioxydant, en particulier dans les cellules pulmonaires en cas de protection contre les lésions oxydantes. En accord avec la littérature (Rahman et Macnee, 1999), nous avons constaté une déplétion des réserves pulmonaires du GSH ($p < 0,001$) après l'administration du B(a)P (Figure 18)

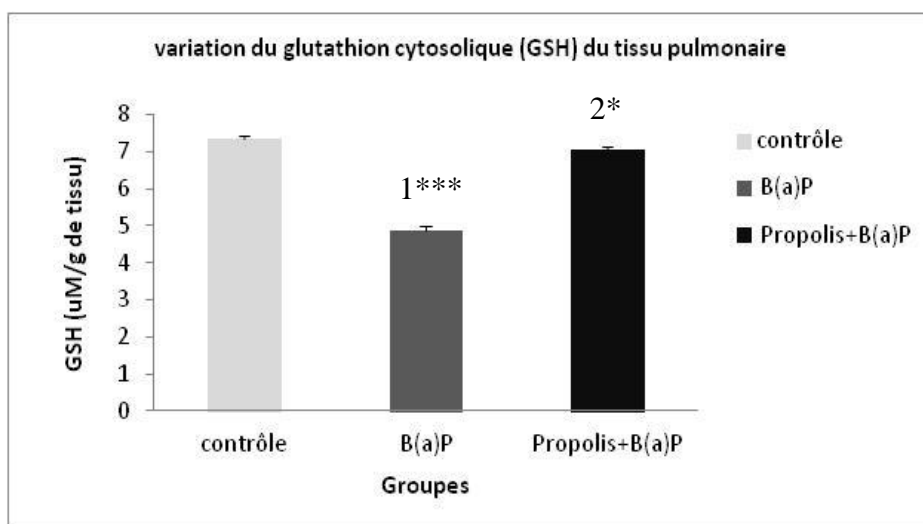


Figure 18: Variation des concentrations du GSH dans les différents groupes traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n=8$). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).
1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P

La diminution de cet antioxydant non enzymatique est en harmonie avec une production importante de ROS ainsi que par sa consommation et son utilisation importante par les cellules pulmonaires dans les réactions de conjugaison avec le BPDE, le métabolite cancérigène ultime du B(a)P, elle est aussi consommée dans les réactions de conjugaison avec les produits de LPO et du peroxyde d'hydrogène, résultant une oxydation des groupes sulfhydryle du GSH en composé dissulfure GSSG (forme oxydée) et conduisent donc à leur

épuisement. D'autres chercheurs ont suggéré que les métabolites du B(a)P provoquent une augmentation du taux de Ca^{+2} intracellulaire conduisant à l'altération de l'homéostasie du calcium, cette altération génère un stress oxydatif avec formation des ROS accompagnée d'une diminution des taux du GSH cellulaire (Romero et al., 1997).

Des études antérieures, *in vivo* et *in vitro*, ont montré que la fumée de cigarette qui contient de nombreux composés électrophiles tel que le B(a)P, épuise également les niveaux d GSH dans les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaire (Rahman et Macnee, 1999). On peut aussi admettre l'hypothèse d'une réduction suite à l'inhibition du gène correspondant soit par des mutations ou à une désactivation, comme ça peut également être dû à des carences en acides aminés entrant dans sa synthèse.

Par ailleurs, l'administration de l'EEP avait pour résultat une élévation et normalisation du niveau du GSH épuisé dans le poumon par rapport aux rats du deuxième groupe ($p < 0,001$), le taux de GSH atteint $7,06 \pm 0,06 \mu\text{M/g}$ tissu par rapport au $4,85 \pm 0,14 \mu\text{M/g}$ tissu du deuxième groupe; observation ratifiée par des travaux antérieurs rapportant que l'administration de certains flavonoïdes dont la propolis est très riche comme la galangine et la chrysin, etc.. peut augmenter le niveau de GSH (Devadoss et al., 2014 ; Kasala et al., 2016), qui sera servi comme donateur d'un atome d'hydrogène (Deponte, 2013 ; Devadoss et al., 2014). L'étude de Capucho et al. (2012) a montré que la propolis augmentait les groupes sulfidryles, probablement par ses composés phénoliques tels que l'artépilline C, l'acide caféoylquinique et la drupanine qui sont capables de capter les radicaux libres, maintenant ainsi les niveaux de GSH élevés (Capucho et al., 2012). La propolis a montré un effet protecteur vis-à-vis du GSH dans les poumons des souris exposées à la fumée de cigarette à court terme (Lopes et al., 2013).

D'autres ont montré que le système antioxydant non enzymatique y compris le GSH et les vitamines, n'ont pas seulement une capacité de piégeage des radicaux libres comme activité biologique, mais aussi une capacité de changement de l'activation métabolique des agents cancérogènes, qui ont un impact important sur le processus de carcinogénèse (Kamaraj et al. 2009 ; Kasala et al., 2016), ce qui pourra être le cas du B(a)P.

I.6. Influence de l'EEP sur la réserve des cellules pulmonaires en antioxydants enzymatiques :

La conversion des ROS en intermédiaires moins toxiques par les antioxydants enzymatiques représente une autre voie importante de désintoxication contre les dommages oxydatifs induits par le B(a)P. La superoxyde dismutase et la catalase sont les principales enzymes

impliquées dans le mécanisme de défense antioxydante puisqu'elles sont impliquées dans l'élimination directe des ROS. La fonction principale de la SOD qui est l'unique enzyme perturbatrice des radicaux superoxydes, est de protéger la cellule contre les dommages oxydatifs causés par la peroxydation lipidique et l'anion superoxyde en le convertissant en H₂O₂ (Kamaraj et al., 2009), tandis que celle de la catalase est de catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène généré lors du stress oxydatif dans les cellules tumorales. L'activité de ces deux enzymes est étroitement liée à la modulation de la carcinogenèse (Kim and Lee, 1997).

Dans les tissus pulmonaires que nous avons étudié, nous avons constaté que l'activité enzymatique de la SOD cytosolique a diminué, arrivant à des taux très bas dans le groupe du B(a)P (1,96 ± 0,03 UI/mg de protéines) par rapport au premier groupe avec un taux de 3,14 ± 0,008 UI/mg de protéines, alors que le dosage de la catalase dans le deuxième groupe a révélé une diminution de son activité où une concentration de 167 ± 27,78 µM d'H₂O₂ consommé /min /mg de protéines contre un contrôle de 294,66 ± 23,11 a été enregistrée (Figure 17).

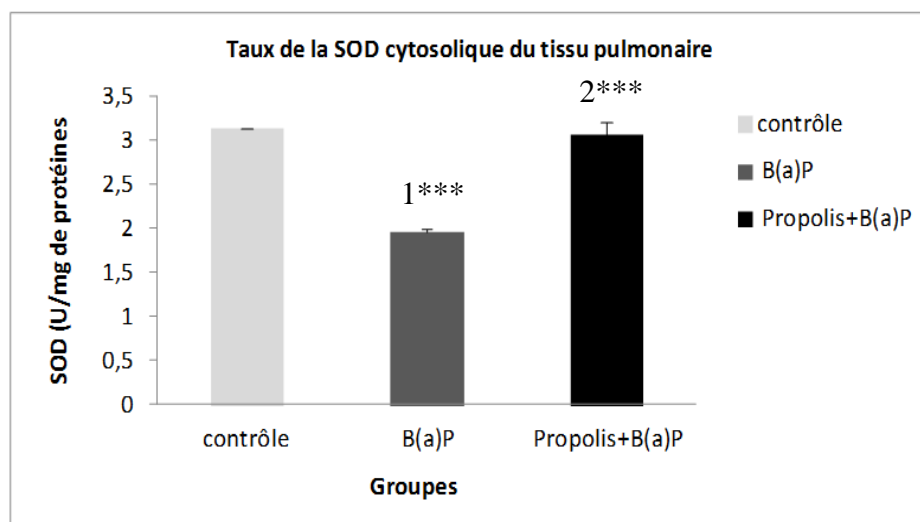


Figure 19: Variation des concentrations de la SOD dans les différents groupes traités. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n=8). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P

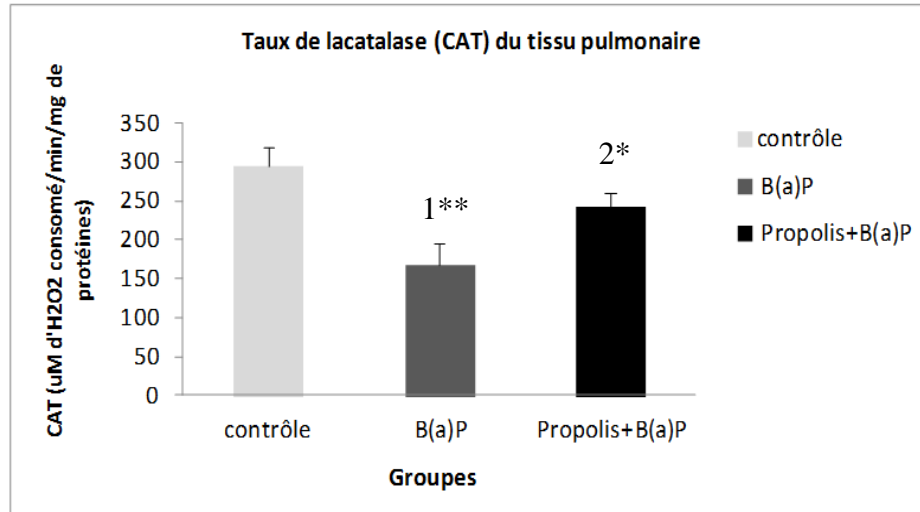


Figure 20: Variation des concentrations de la CAT dans les différents groupes traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type (n=8). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P

Cette diminution peut résulter du fait que dans ces tissus étudiés il y a assez de H₂O₂ qui a été transformé par la SOD, ce qui a nécessité le recours à de grandes concentrations en catalase pour les éliminer. Cependant, des études ont montré que le H₂O₂ n'est pas formé seulement à partir de la dismutation de l'anion superoxyde puisque il peut aussi être produit par différentes oxydases incluant les aminoacides oxydases, la glycolate oxydase et l'urate oxydase (Gardès-Albert et al., 2003).

Ce résultat est confirmé par celui de Jaruga et al., (1994) et Kasala et al., (2016) qui ont rapporté la présence de faibles concentrations en SOD et en catalase dans les tissus atteints d'un cancer du poumon et qui pourrait être liée à l'augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN et aux protéines ou à l'accumulation d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène ce qui entraînerait la consommation de ces enzymes (Jaruga et al., 1994; Kasala et al., 2016). Kim et Lee, (1997) ont rapporté que le traitement par le B(a)P entraîne une diminution de l'activité de la SOD et de la catalase dans plusieurs organes des animaux étudiés y compris le poumon. Cette diminution est due aux modifications oxydatives de ces deux enzymes par formation des groupements carbonyle qui seront des excellents substrats pour le système protéolytique intracellulaire et les protéases.

La présence de certaines modifications ou mutation de certains gènes impliqués dans le contrôle de l'expression de ces enzymes peut être considérée comme l'une des causes de cette diminution.

Il est désormais largement admis que l'induction d'enzymes antioxydantes est une majeure stratégie pour la protection des cellules contre une grande variété de composés toxiques endogènes et exogènes telles que les produits chimiques cancérigènes et les espèces réactives de l'oxygène. Ainsi, ces enzymes anti-oxydantes réduisent l'interaction carcinogène-ADN en fournissant un grand pool nucléophile pour le B(a)P qui est un carcinogène électrophile (Paul et al., 2011). Dans le même contexte, des études ont démontré que l'apport en SOD et en CAT peut inhiber la mutagenèse induite par le métabolite du B(a)P qui est le BaP-3,6-quinone, suggérant que la réduction d'un électron des quinones en semiquinones est mutagène par la formation d'un radical anion superoxyde et la production subséquente de peroxyde d'hydrogène (Kim et al., 2000).

Dans notre groupe de rats traités par la propolis, l'induction de ces enzymes été bien claire, la propolis a inversé de manière significative tous les changements induits par le B(a)P par l'augmentation des taux de la SOD et de la CAT arrivant à $3,07 \pm 0,13$ UI/mg de protéines par rapport au deuxième groupe $1,96 \pm 0,03$ UI/mg de protéines et $241,66 \pm 17,55$ consommé /min /mg de protéines contre un taux de $167 \pm 27,78$ μM d' H_2O_2 consommé /min /mg de protéines du groupe traité par le B(a)P seule des deux enzymes respectivement.

Peu d'études ont rapporté les effets de la propolis sur l'activité de la SOD et des autres enzymes tels que la CAT, dans les poumons. Conformément à nos résultats, il a été rapporté que les flavonoïdes qui constituent d'importants composants de la propolis peuvent maintenir les niveaux de CAT dans les poumons d'animaux d'expérience et peuvent montrer une augmentation de l'activité SOD (Kamaraj et al., 2009). D'autres études ont constaté la même chose en montrant que le prétraitement avec la propolis peut être bénéfique en augmentant l'activité antioxydante du corps, grâce à sa teneur en flavonoïdes tel que la pinocembrine, de la chrysin et de la galangine (Baykara et al., 2015) dans les différents organes tel que le plasma, le foie, les poumons et le cerveau des animaux d'une manière dose-dépendante (Al-amoudi, 2015). Les composés phénoliques tel que le CAPE possèdent aussi un effet régulateur sur les activités enzymatiques antioxydantes telles que la catalase, la SOD et la glutathion peroxydase (Akyol et al., 2016).

Nagai et al. ont décrit la propolis comme ayant une propriété similaire à la SOD en se basant sur les propriétés antioxydantes de cette dernière sur l'anion superoxyde. Cette description était basée sur la capacité de la propolis à piéger les anions superoxyde d'une manière similaire à deux acides phénoliques qui sont l'artépilline C et à la drupanine, qui entraînent toutes deux une diminution de l'anion dans le groupe supplémenté de propolis (Nagai et al., 2004).

Pour compléter notre étude sur l'implication des systèmes antioxydants sur le cancer pulmonaire induit par le B(a)P et l'effet de la propolis sur ces systèmes, nous avons procédé au dosage d'une autre enzyme antioxydante qui est la GST.

L'activité de cette dernière est étroitement liée au glutathion, puisque elle catalyse les réactions de neutralisation et d'élimination des xénobiotiques qui seront moins toxiques et plus hydrosoluble ainsi que celles des radicaux libres toxiques, en utilisant comme cofacteur la GSH, favorisant de ce fait leurs éliminations de l'organisme (Ma et al., 2011).

La GST ou plus exactement les GSTs ; qui sont la GST-a, GST-p et GST-m provenant des 4 classes de gènes différentes (a, μ , π et u) ; conjuguent les métabolites du B(a)P avec le glutathion pour former l'une des voies les plus importantes de désintoxication contre les dommages oxydatifs induits par ce carcinogène, basé sur la conversion de ROS en intermédiaires moins toxiques par les enzymes de phase II (Das et al., 2007; Ravichandran et al., 2011). La forme π qui est la forme prédominante dans le poumon humain, a une activité sélective élevée envers un métabolite carcinogène ultime: l'énantiomère (+) du 7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde de B(a)P (BPDE) (Heckbert et al., 1992), ainsi que ceux de la classe μ (mu) qui peuvent métaboliser plusieurs substrats dans la fumée de tabac par les enzymes GSTT1 et GSTM1. Ce dernier a une spécificité accru au BPDE (Güven et al., 2006) Les mutations nulles des gènes GST T1 et GST M1 et l'absence de leurs enzymes correspondantes GSTM1 et GSTT1 impliquées dans la détoxification de plusieurs substrats activés de la fumée de tabac, devrait théoriquement prédisposer un individu à un cancer induit par le tabac (Cheng et al., 1999). Ces mutations ont été associées à une augmentation d'un certain nombre de cancers comme celui des voies hautes (VADS) ou SCCHN (Head and Neck Cancer), les cancers broncho-pulmonaires et bronchiques, probablement due à une susceptibilité accrue aux toxines environnementales et aux carcinogènes tel que les HAP (Heckbert et al., 1992 ; cheng et al., 1999 ; Güven et al., 2006).

En effet, l'étude de Petruzzelli, 1988 a démontré que les formes actives des HAP qui sont les époxydes, peuvent être inactivées soit par la conversion en dihydrodiolé catalysé par l'époxyde hydrolase (EH), soit par la conjugaison avec le glutathion catalysé par la GST.

Cette équipe a aussi montré que le tabagisme augmente le taux de formation d'époxydes dans les macrophages et les cellules alvéolaires pulmonaires, ainsi qu'une présence d'un changement d'équilibre entre la formation et le métabolisme d'époxydes chez les fumeurs puisque la fumée de cigarette a pu réduire l'activité de ces deux enzymes EH et GST dans les différents organes du corps humain tel que le poumon, le placenta et les lymphocytes. L'activité de la GST a été réduite d'un tiers chez les fumeurs dans le cas d'un cancer

pulmonaire (Petruzzelli et al., 1988). Das et al. (2007) ont trouvé une diminution significative de l'activité de la GST cytosolique du poumon après traitement par le B(a)P (Das et al., 2007).

Les travaux réalisés par Manchester et Jacoby (1982) suggèrent que la perte d'activité de la GST pourrait refléter la perte de l'enzyme due à la liaison covalente avec les métabolites réactifs (Manchester et Jacoby, 1982).

Les mêmes résultats ont été trouvés dans notre étude, où l'activité de la GST montrée dans la figure 19, était semblable à ceux obtenus avec les autres enzymes antioxydantes étudiées ; SOD et catalase; où une inhibition de l'activité enzymatique de la GST dans le deuxième groupe a été bien claire par rapport au premier groupe. En effet, les différences étaient très significatives dans le groupe 2 avec une GST de $1,11 \pm 0,09 \mu\text{M}$ de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué/min/mg de protéines, alors que celle du groupe 1 était de $1,68 \pm 0,04 \mu\text{M}$ de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué/min/mg de protéines

De même dans ce deuxième groupe nous avons constaté une diminution des taux du GSH (montré précédemment). La déplétion en ce dernier peut donc en partie expliquer la diminution de l'activité de la GST. Cependant, cette diminution de la teneur en GSH et de l'activité GST pourrait potentialiser la toxicité du B(a)P chez les animaux de laboratoire (Ma et al., 2011)

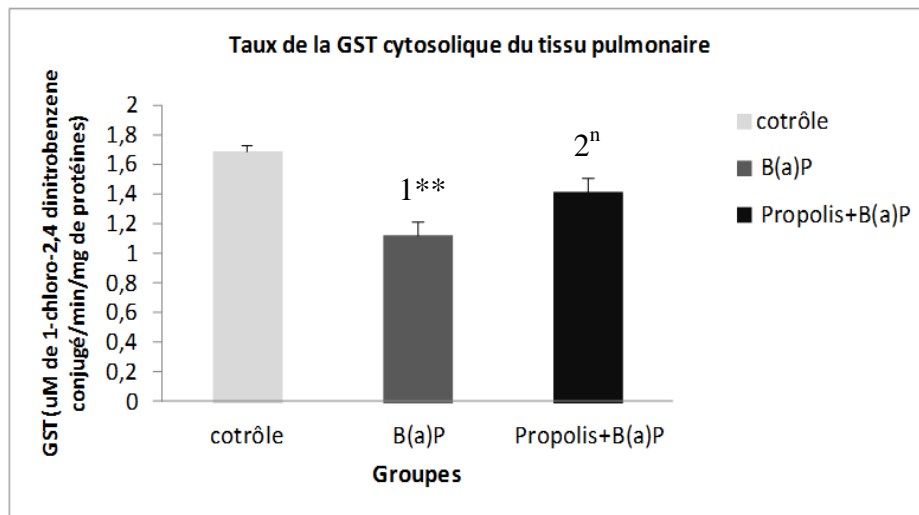


Figure 21: Variation des concentrations du GST dans les différents groupes traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type (n=8). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P.

L'importance de la GST dans la cellule est bien évidente puisque sa présence ainsi que celle d'EH dans les cellules alvéolaires pulmonaires, suggère que les époxydes peuvent également être inactivés dans ces cellules (Petruzzelli, 1988).

Notre EEP a pu faire monter le taux de l'activité de la GST dans le troisième groupe arrivant à $1,41 \pm 0,09$ par rapport à $1,11 \pm 0,09 \mu\text{M}$ de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué/min/mg de protéines du deuxième groupe. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par El-Khawaga et al. (2003) qui ont rapporté dans leurs études sur le carcinome que l'administration de la propolis était accompagnée de l'augmentation du statut antioxydant exprimé par une élévation de la concentration de la GST, ce qui a été significativement diminué chez les souris cancéreuses (El-Khawaga et al., 2003). La Fisetine ; un flavanol dont la propolis est très riche a montré un effet stimulateur du système antioxydant avec une augmentation des taux du GST chez les souris atteints du cancer pulmonaire induit expérimentalement par le B(a)P par rapport aux faibles taux enregistrés chez ces animaux porteurs du cancer pulmonaire (Ravichandan et al., 2011).

I.7. Evaluation anatomopathologique (macroscopique et microscopique) des tissus des poumons :

Le traitement des rats Wistar avec du B(a)P par voie intra-péritonéale à une dose de 200 mg/kg peut induire une carcinogénèse au niveau du poumon (Likhachev et al., 1992), ainsi plusieurs preuves expérimentales ont montré que pendant la carcinogénèse pulmonaire induite par le B(a)P, différentes altérations cellulaires et histopathologiques peuvent être identifiées comme l'hyperplasie, la dysplasie, le carcinome in situ (carcinome bronchiolo-alvéolaire (CBC)) et le carcinome invasif (Das et al., 2007).

Afin d'étudier les lésions provoquées ou associées au B(a)P, sur les poumons, en utilisant des techniques principalement fondées sur la morphologie macroscopique et microscopique. Ces techniques sont indispensables au cours de notre traitement par la propolis, afin de juger de la diminution, de la persistance ou de l'aggravation des lésions. Pour cette raison le prélèvement tissulaire de l'organe entier suivi d'une analyse sémiologique qui compare les tissus normaux et les tissus pathologiques ainsi que ceux prétraités par notre substance bioactive ont été réalisés.

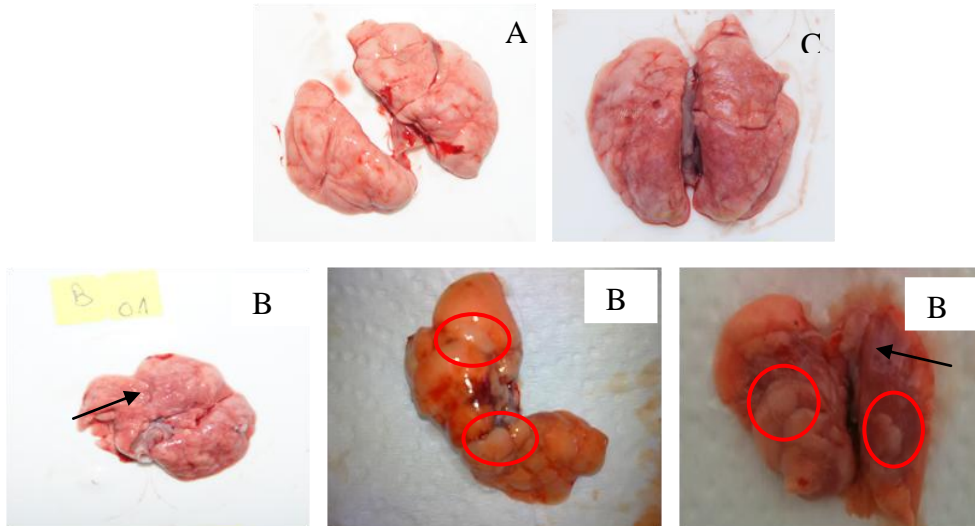


Figure 22 : Examen macroscopique des poumons des différents groupes.

(A) : poumon de rat témoin, (B1, B2 et B3) : poumon de rat traité par le B(a)P, (C) : poumon de rat prétraité par la propolis suivi du B(a)P.

Les cercles indiquent des kystes résultant de réactions inflammatoires alors que les flèches désignent une nécrose (surface de couleur foncée) et une fusion de lobules pulmonaires.

L'examen macroscopique des poumons des rats témoins montre une couleur rose avec une structure intacte (Figure 22 A). Alors que les poumons des rats traités par le B(a)P seul, représentés dans la figure B1, B2 et B3, montre une surface de couleur brunette qui peut être due aux nécroses et certaines parties de couleur blanchâtre traduisant la formation des kystes due aux réactions inflammatoires, la figure 22 B1 montre un poumon traité par le B(a)P seul caractérisé par une fusion des lobules pulmonaires (flèche noir). Tandis ce que la figure 22 C montre le poumon de rat prétraité par la propolis présentant moins de toxicité par rapport à celui traité par le B(a)P seule, avec une structure similaire à celle du poumon de rat témoin.

Pour regarder les principaux changements, nous avons réalisé une étude histologique et une coloration H/E après sacrifice des animaux pour suivre les modifications.

La figure 23 montre les changements histologiques des poumons du rat Wistar après traitement par le B(a)P et la propolis visualisés par microscope optique. L'examen des poumons des lots témoin ne montre aucune anomalie, on observe une architecture normale avec des espaces alvéolaires de dimensions régulières; alors que ceux du lot traité par le B(a)P sont caractérisées par une destruction alvéolaire associée à un épaississement du septum intra-alvéolaire avec une inflammation des voies aériennes tantôt diffuse et tantôt groupée en amas, la Figure c montre une infiltration inflammatoire distale péri-alvéolaire du type mononucléé (essentiellement des lymphocytes mêlés d'histiocytes spinaux) avec condensation au tour de la bronchiole. Une rupture des cloisons inter-alvéolaires est aussi remarqué, avec une

condensation du tissu interstitiel donnant un aspect pseudoemphysémateux qui a comme majeure cause, le tabagisme (Churg et al., 2004). Les cellules en prolifération envahissent les alvéoles avec une production de mucus.

L'agrandissement $\times 40$ (Figure d et e) montre une infiltration des cellules inflammatoires du type mononucléé pérbronchiolaires denses du type chronique fait essentiellement de lymphocytes mêlé à des plasmocytes avec présence de sidérophages (témoin d'une hémorragie) et ponctuée de rares polynucléaires éosinophiles.

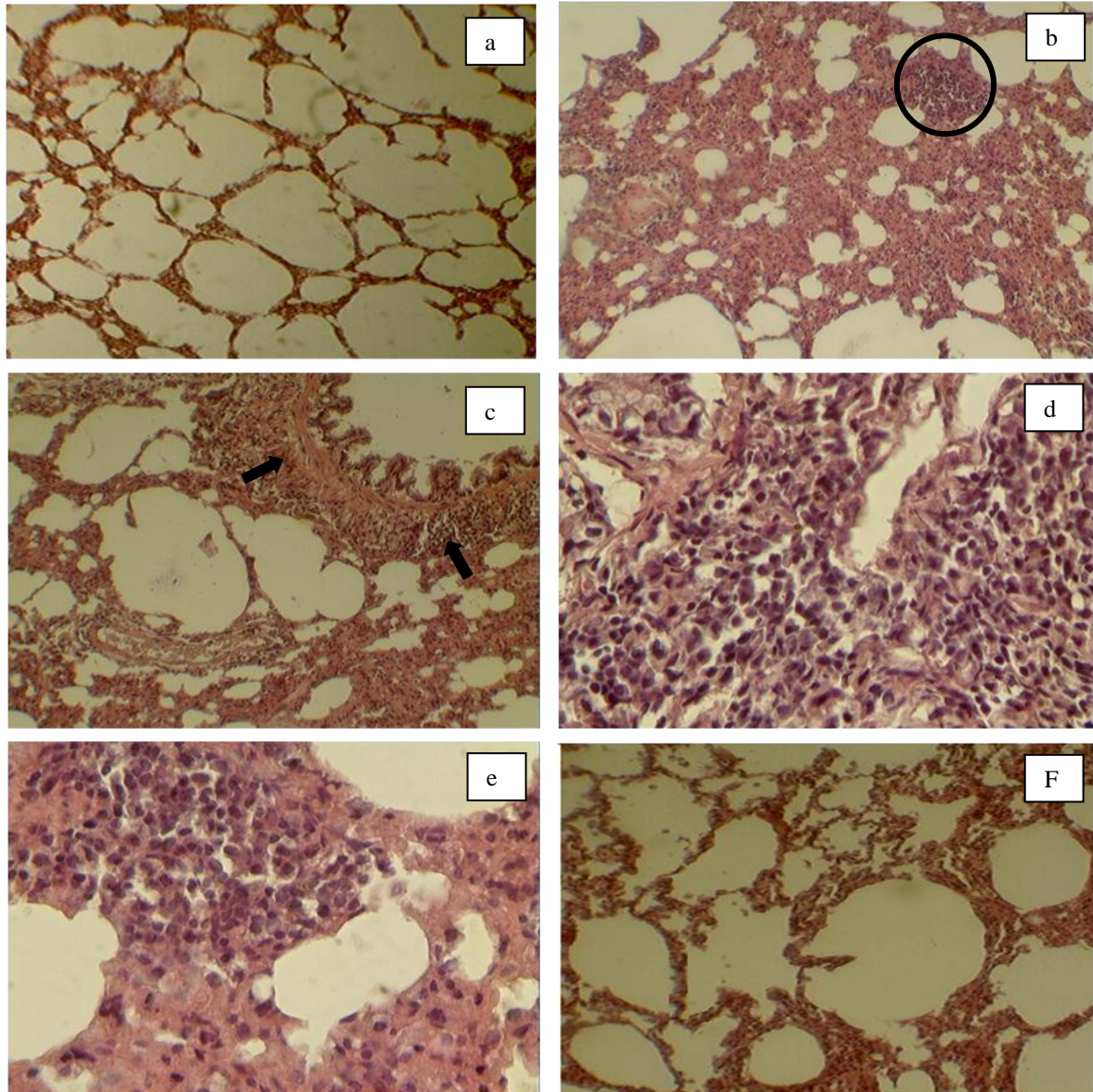


Figure 23: Photomicrographie de l'examen histopathologique des poumons des rats (hématoxyline & éosine). (a) : poumon de rat témoin (x100), (b et c) : poumon de rat traité par le B(a)P (x100), (d et e) : poumon de rat traité par le B(a)P (x400) (f) : poumon de rat traité par la propolis et le B(a)P (x100).

Les flèches indiquent l'infiltration inflammatoire pérbronchiolaire et le cercle indique une infiltration septale alvéolaire

Les animaux prétraités avec de la propolis (figure F) présentent une réduction des lésions alvéolaires avec une architecture proche à celle des tissus normaux, ce qui a été montré auparavant dans la littérature où la propolis et ses composés comme la galangine a pu réduire les effets toxiques du B(a)P sur le poumon des souris Swiss Albino lorsque cette substance a été administrée en pré ou en post traitement (Devadoss et al., 2014).

I.8. Effet de l'EEP sur la prolifération cellulaire:

La prolifération et l'apoptose sont deux côtés opposés de la croissance cellulaire. Les deux événements sont sous le contrôle complet des systèmes de régulation du cycle cellulaire dans les cellules normales. En revanche, la prolifération cellulaire incontrôlée est considérée comme une caractéristique des cellules cancéreuses. Il est largement admis que l'estimation du potentiel prolifératif des cellules cancéreuses peut être un facteur pronostique important.

Ainsi l'augmentation de la prolifération cellulaire a été proposée comme un marqueur biologique de la susceptibilité accrue au cancer du poumon (Ravichandran, 2011)

Nous avons évalué le taux de la prolifération du tissu pulmonaire excisées après sacrifice des animaux issus des différentes conditions de traitement, par l'appréciation de l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) par un test de *western blot* et une analyse immunohistologique du Ki-67 dont l'objectif est de vérifier si l'extrait de propolis exerce un effet sur la prolifération des cellules pulmonaire *in vivo*.

Différentes études ont montré que le Ki-67 et la PCNA sont deux indicateurs pronostiques du potentiel malin aux différents stades du cancer bronchique. Ce sont des marqueurs intéressants du cancer du poumon aux stades précoces (Nguyen et Mir, 2000; Yoshida et al., 2004).

Ainsi le Ki-67 a été jugé très utile pour la prédiction de la sensibilité de la tumeur aux agents cytotoxiques et de l'efficacité de nouveaux agents préventifs dans le cancer pulmonaire (Clamon, 2015). Le Ki-67 est une protéine nucléaire non histone, présente dans la cellule à différentes phases du cycle cellulaire G1, S, G2 et M, mais pas en phase de quiescence G0. C'est donc un marqueur de prolifération cellulaire, mesuré en IHC. Il est utilisé pour distinguer les cellules en croissance des cellules non en croissance (Martin et al., 2004). C'est le marqueur le plus établi de la prolifération cellulaire dans les tissus pulmonaires. La plupart des cliniciens et anatomopathologistes s'accordent sur le fait qu'en-dessous d'un seuil de 10% une tumeur peut être considérée comme peu proliférative et qu'au-delà de 30% elle est agressive et que sa détermination fournit des informations intéressantes qui pourraient remplacer le compte mitotique (El Amine et al., 2016).

Quelques études suggèrent un rôle prédictif pour le Ki-67, en ce qui concerne le traitement d'une tumeur d'une manière spécifique, et cela en fonction du degré de son expression de Ki-67 (Martin et al., 2004), ainsi il a été jugé comme un facteur pronostique indépendant pour prédire la récurrence de la maladie dans l'adénocarcinome pulmonaire de stade I (Oka et al., 2011).

PCNA est une protéine nucléaire acide de 36 kD, associée à la réplication de l'ADN chromosomique, à la réparation de l'ADN et à la prolifération cellulaire. La PCNA se trouve à diverses concentrations dans la cellule tout au long du cycle cellulaire ou son expression augmente à la fin de la phase G1, atteint son maximum en phase S, diminue au cours de la phase G2 et est absente pendant la phase mitotique et dans les cellules quiescentes. Il a été utilisé comme indice de prolifération cellulaire dans diverses tumeurs, y compris le cancer du poumon. Son expression a été toujours liée à l'agressivité tumorale, à l'invasion vasculaire et au comportement clinique (Kasala et al., 2016). Cependant il faut noter que cette expression peut être détectée à la fois dans les cellules normales et dans les cellules tumorales prolifératives. En effet du fait de son rôle auxiliaire dans la synthèse de l'ADN, cette protéine est également synthétisée et donc détectable lors des phases de réparation de l'ADN, qui sont fréquentes dans une population néoplasique. L'altération de l'expression de certains oncogènes, au sein de populations cellulaires néoplasiques, a été montrée comme associée à une dérégulation de l'expression du PCNA (Shivji et al., 1995).

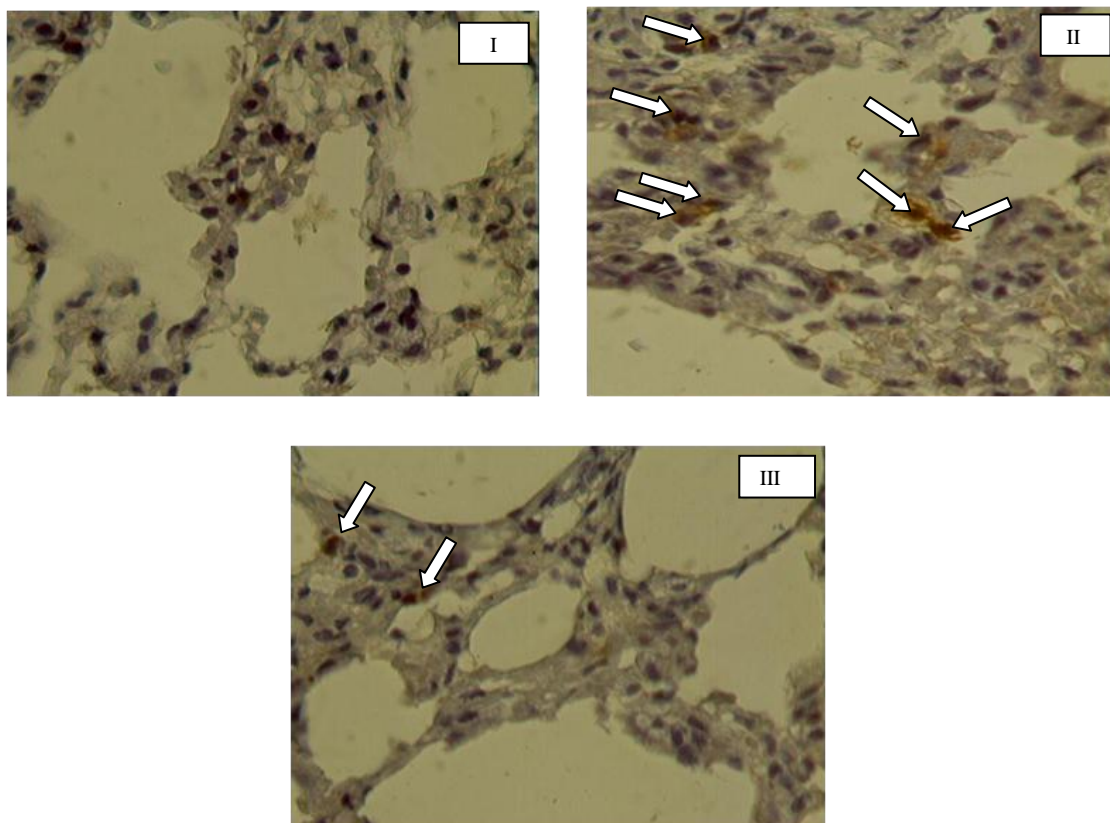
Des résultats ultérieurs montrent qu'aucune des protéines Ki-67 et PCNA ne peut être utilisée comme un facteur pronostique indépendant dans les carcinomes pulmonaires non à petites cellules malgré qu'il existe une différence dans l'expression de ces deux protéines dans les cellules en prolifération puisque la PCNA présente une très longue demi-vie donc son expression sera plus abondante, les chercheurs ont donc conclu que la combinaison des ces deux marqueurs ou plus peuvent être un outil pronostique précieux (Nguyen and Mir, 2000 ; Oka et al., 2011).

Nous avons évalué la distribution du Ki-67 par immunohistochimie et nous avons défini le taux de cellules marquées comme étant le pourcentage de cellules présentant un marquage nucléaire, en comptant 1000 cellules dans les zones présentant le plus de noyaux marqués.

Le marquage au Ki-67 représenté en partie par la figure 24 ci-dessous a montré une surexpression au cours du développement du cancer du poumon induite par le B(a)P. Son expression est hautement significative, ce qui reflète une prolifération cellulaire très importante et très rapide.

Par contre nous avons relevé un faible marquage sur les coupes issues de rats ayant reçus un prétraitement à l'EEP, elle entraîne une réduction de 40 % des cellules Ki-67 positives.

(A)



(B)

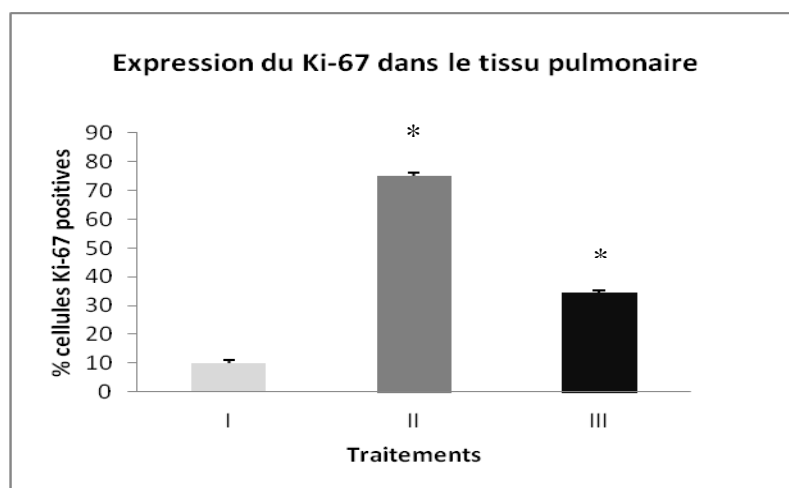


Figure 24 : Effet de la propolis sur le marqueur général de prolifération Ki-67

(A) I: rares cellules marquée avec l'anticorps Ki-67 dans le tissu pulmonaire des rats témoins
 II: expression importante de Ki-67 dans le tissu du poumon traité par le B(a)P par rapport au tissu prétraité par la propolis III. (B) Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Test de Student (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$).

Notre propolis jjiilienne déjà étudiée sur des souris atteintes de tumeurs B16F1 du mélanome, a augmenté la survie des souris de 30 %, une réduction de l'index mitotique (-75 %) et du Ki-67 (-50 %) (Benguedouar et al., 2016).

L'étude de l'expression du PCNA par *western blot* a montré qu'il est fortement présent dans les tissus pulmonaires cancéreux induits par le B(a)P par comparaison aux poumons des rats contrôles sains traités par le véhicule (huile d'olive) (Figure 25). Nous avons aussi enregistré une diminution de l'expression au niveau du tissu prétraité par la propolis seule ou associée au B(a)P par comparaison aux tissus recevant le B(a)P seul.

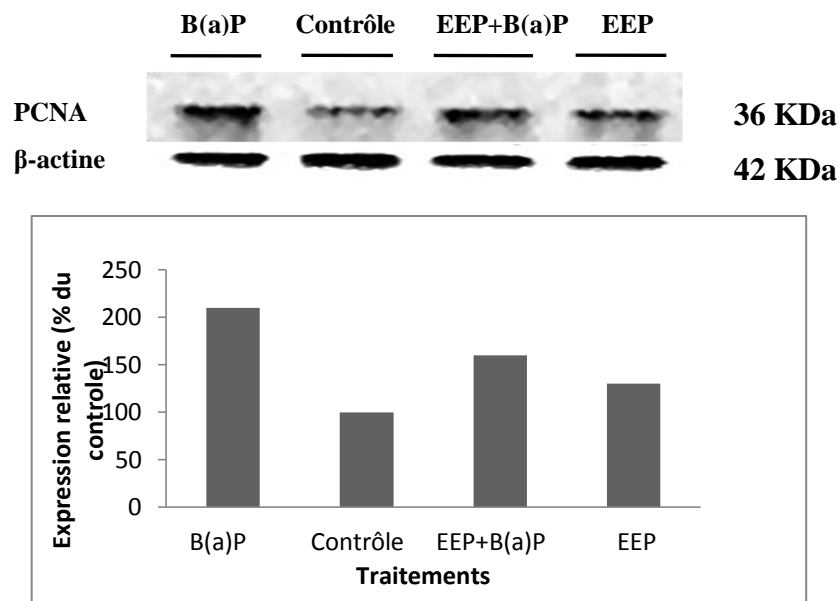


Figure 25 : Expression du PCNA dans le tissu pulmonaire mesuré par *western blot*.

Contrôle (poumon sain traité par le véhicule), B(a)P (cancer pulmonaire induit par le B(a)P), EEP+B(a)P (poumon prétraité par l'extrait éthanolique de propolis suivi du B(a)P), EEP (poumon traité par l'extrait éthanolique de propolis seule).

Une diminution de l'expression de PCNA lors du traitement par notre EEP a révélé son effet protecteur et antiprolifératif pendant la cancérogenèse pulmonaire. Il a été rapporté que divers produits naturels et spécifiquement les flavonoïdes suppriment les cancers pulmonaires par leur effet sur la prolifération cellulaire et que la plupart des agents chimiopréventifs potentiels contre la carcinogenèse pulmonaire induite chimiquement, suppriment l'activité de prolifération cellulaire par l'intermédiaire de l'indice PCNA (Ravichandran, 2011).

En accord avec nos résultats, une expression élevée de PCNA mesuré par *western blot* a été observée chez les animaux porteurs de cancer du poumon induit par le B(a)P; reflétant ainsi une prolifération cellulaire accrue. Les mêmes auteurs ont montré que des animaux traités au

flavonoïde ; la chrysin ; ont enregistré une diminution de l'expression de PCNA qui reflète à son tour l'activité proliférative réduite (Kasala, 2016). Kamaraj et al. (2009) ont trouvés des résultats similaires où une réduction de l'expression du PCNA a été enregistrée dans les poumons de souris prétraitées par un flavonoïde l'hespérine montrant ainsi l'efficacité du prétraitement par ce dernier dans une carcinogénèse pulmonaire chez la souris induite par le B(a)P (Kamaraj et al., 2009). Une autre étude a révélé que le traitement par la fisétine a montré une diminution du nombre de cellules positives pour le PCNA par rapport au groupe d'animaux traité par le B(a)P seul, reflétant une diminution des cellules pulmonaires en phase S et une réduction de l'activité proliférative (Ravichandran, 2011). Ces rapports soutiennent l'effet de la propolis et ces flavonoïdes sur la prolifération cellulaire observée dans la présente étude. Nos résultats montrent que le traitement par la propolis chez les rats, a montré une inhibition plus efficace de la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires, représenté par une diminution significative du PCNA et de l'index Ki-67 principaux marqueurs cellulaires et moléculaires du degré d'agressivité cancéreuse.

I.9. Effet de l'EEP sur l'expression de protéines apoptotiques du tissu pulmonaire des rats :

La recherche en biologie du cancer a découvert que les aberrations dans l'expression génique des protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques peuvent contribuer aux diverses maladies. Les propriétés anticancéreuses des flavonoïdes ne se limitent pas seulement par des effets négatifs sur la prolifération cellulaire mais aussi par des effets pro-apoptotiques.

Récemment, plusieurs études *in vitro* ont démontré une action cytotoxique et chimiopréventives de la propolis d'origine géographique différente et de certains de ses composés isolés (ses composants phénoliques) sur diverses cellules tumorales. En bref, ce produit naturel peut bloquer des voies de signalisation oncogéniques spécifiques, qui entraînent une diminution de la prolifération et de la croissance cellulaire et peuvent également agir en diminuant la population de cellules souches cancéreuses, en augmentant l'apoptose (Silva-carvalho et al., 2015).

Afin de déterminer le mécanisme moléculaire de l'effet pro-apoptotique de l'EEP, nous nous sommes intéressés à la famille des Bcl-2 et des caspases. Ces protéines enzymatiques participent à différents niveaux cellulaires dans les phases de l'apoptose.

Les interactions des membres de la famille Bcl-2 dictent le destin de la cellule. Ils sont considérés comme des régulateurs clés de l'apoptose en régulant et contrôlant des événements apoptotiques mitochondriaux et en possédant un effet important sur le métabolisme redox mitochondrial (Chen and Pervaiz, 2010).

Pour identifier les mécanismes potentiels de la mort cellulaire impliqués dans le traitement par la propolis, l'analyse par Western blot a été utilisée pour dépister les altérations de l'expression des protéines cellulaires dans le cancer du poumon induit par le B(a)P. Les changements dans l'expression des Bax et Bcl-2 sont particulièrement intéressante car ils sont rapportés à moduler les processus cancérogènes puisque le rapport entre les deux groupes antagonistes détermine si une cellule résiste à un stimulus apoptotique ou non.

La figure 26 montre la largeur des bandes indiquant une haute ou faible expression des deux protéines Bax et Bcl-2 suite aux différents traitements. Après traitement des rats par le B(a)P, une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax, ont été observées, cependant le traitement des rats atteints du cancer pulmonaire par l'extrait de propolis, a montré le contraire avec une diminution et une augmentation de l'expression des Bcl-2 et Bax, respectivement.

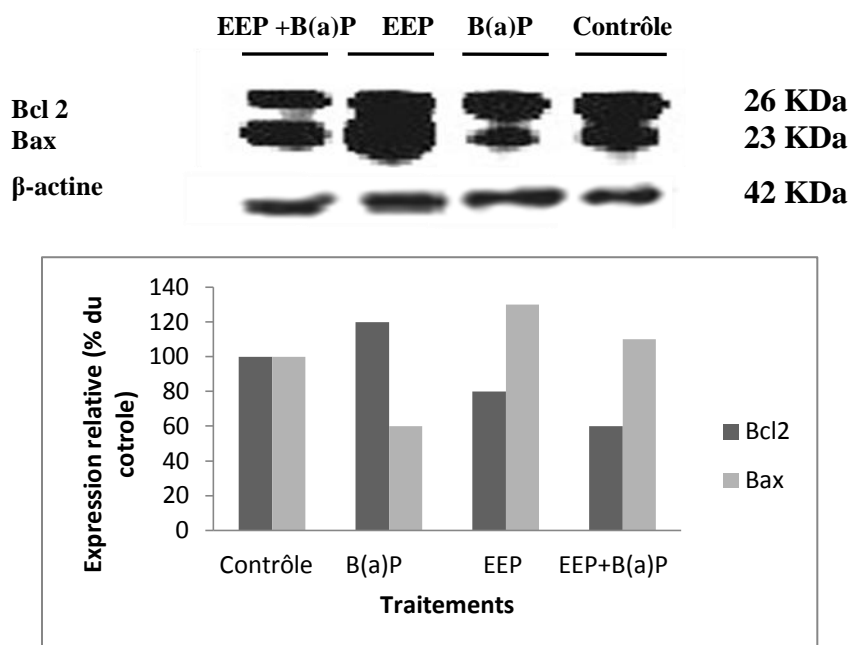


Figure 26 : Effet de l'EEP et du B(a)P sur l'accumulation des protéines Bcl-2/Bax dans le tissu pulmonaire de rat.

Contrôle (poumon sain traité par le véhicule), B(a)P (cancer pulmonaire induit par le B(a)P), EEP+B(a)P (poumon prétraité par l'extrait éthanolique de propolis suivi du B(a)P), EEP (poumon traité par l'extrait éthanolique de propolis seule).

La famille des Bcl-2 contrôle la voie mitochondriale par la régulation du relargage dans le cytoplasme du cytochrome c, contenu dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Les molécules anti-apoptotiques seraient localisées dans la mitochondrie, elles inhibent la perméabilisation mitochondriale de la membrane externe (MOMP) bien qu'elles jouent également un rôle dans le cytoplasme, par conséquent la surexpression de Bcl-2 inhibe

l'apoptose en agissant d'un côté, comme un régulateur négatif de la cascade biologique qui mène vers l'apoptose et en favorisant d'autre côté, la survie cellulaire par l'augmentation du risque de la transformation maligne des cellules pulmonaires (Gu et al., 2013). Tandis que les protéines pro-apoptotiques posséderaient une localisation différente (cytosol ou microtubules) et à la suite d'un signal apoptotique, ces dernières s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation par l'ouverture des pores (Breckenridge and Xue, 2004).

Des études ont démontré que dans le carcinome pulmonaire à petites cellules, l'expression de Bcl-2 est considéré comme un indicateur important dans le pronostic ou le traitement (Singh et al., 2015). Jusqu'au 20 à 30 % des cancers bronchiques non à petites cellules et jusqu'à 80 % des cancers bronchiques neuroendocrines ont présenté une surexpression protéique de Bcl-2 (Pezzella et al., 1993) d'où ils régulent négativement une éventuelle induction de la voie apoptotique intrinsèque. Des chercheurs ont montré que les Bcl-2 jouent un rôle important dans l'initiation de la carcinogénèse pulmonaire (Anand et al., 2013). De même des études avec des résultats similaires ont démontré que la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et mdm2 (les régulateurs négatifs de p53) est souvent trouvée dans le cancer du poumon humain. Le Bax pro-apoptotique, a été régulé négativement dans le cancer du poumon à petites cellules qui exprime une p53 mutante. On rapporte que B(a)P induit l'expression de mdm2, Bax et p21 d'une manière dépendante de p53 dans les lignées cellulaires de cancer du poumon (Manna et al., 2009).

Des études antérieures ont montré que l'expression de Bcl-2 est étroitement régulée par des mécanismes qui incluent la dimérisation, la transcription et la dégradation. Cette dernière est le mécanisme clé de la régulation de cette protéine pendant l'apoptose (Chanvorachote et al., 2006) et est associée à la génération de ROS (Luanpitpong et al., 2011). L'oxydation de la cystéine du Bcl-2 a été observée à des taux élevés d' H_2O_2 montrant le rôle potentiel d'oxydation de la cystéine dans le processus apoptotique. L'inhibition cette oxydation par une mutation spécifique du site des résidus de cystéine (Cyt-158 dans le domaine $\alpha 5$ et Cyt-229 dans le domaine carboxy-terminal d'ancrage à la membrane) de la Bcl-2 inhibe fortement l'effet apoptotique d' H_2O_2 (Luanpitpong et al., 2013). Un certain nombre d'études ont suggéré un rôle possible pour la régulation du Bcl-2 par le NF-kB, qui a comme activateur les ROS notamment le H_2O_2 généré durant le métabolisme du B(a)P par la voie des o-quinones (Heckman et al., 2002).

De même, une faible expression de Bax était significativement associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un carcinome pulmonaire non à petites cellules

(NSCLC). L'expression de Bax a également été observée dans le carcinome de l'ovaire et le cancer du poumon non à petites cellules (Singh et al., 2015).

Plusieurs méthodes sont utilisées dans les cellules malignes afin de stimuler la voie apoptotique intrinsèque soit par la diminution des effets de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou IAPs, par des oligonucléotides antisens ou par l'augmentation des effets de protéines pro-apoptotiques à domaine BH3 en développant des molécules qui interfèrent avec les facteurs pro-apoptotiques. L'utilisation des substances bioactives montrent également un potentiel dans le développement de cette voie de chimioprévention. Dans le contexte de l'effet biologique de la propolis, la plupart des études ont montré l'effet pro-apoptotique de cette substance dans différents organismes. La fonction biologique de la propolis dans l'apoptose induite par les HAP et le B(a)P n'est pas clairement comprise.

Nos résultats indiquent que l'EEP interfère avec le B(a)P en induisant la signalisation apoptotique par la régulation positive de l'expression de Bax pro-apoptotique et de l'inhibition de la protéine Bcl-2 anti-apoptotique trouvée en hausse dans les tissus traités par le B(a)P, augmentant ainsi le rapport de la protéine Bax/Bcl2. La voie apoptotique intrinsèque induite par les apoptosomes implique la libération du cytochrome c par les mitochondries, suivie d'une modification conformationnelle de l'Apaf-1 et l'activation subséquente de la pro-caspase-9. L'oligomérisation du Bax pro-apoptotique dans la membrane mitochondriale externe semble être obligatoire pour initier le dysfonctionnement mitochondrial avec une libération ultérieure du cytochrome c dans le cytoplasme (Antonsson et al., 2001). L'implication de Bax / Bcl2 dans l'apoptose induite par la propolis comme démontré dans notre présente étude implique le rôle possible de la voie apoptotique intrinsèque à cet égard. Parallèlement à nos résultats, ce rôle pro-apoptotique a été rapporté par d'autres auteurs.

L'expression de la protéine Bcl-2 était régulée négativement lorsque les cellules étaient traitées par la propolis en combinaison avec une thérapie phytodynamique, alors que celle de la protéine Bax, de la protéine mitochondriale Cytochrome c ont également été activées dans le traitement combiné (Ahn et al., 2013).

Une autre étude a révélé que de faibles doses de pinocembrine procurent une protection neurovasculaire aiguë dans un modèle de lésion du glutamate, en partie par l'inhibition de l'expression de p53 et la libération de cytochrome c et en modifiant le rapport Bax/Bcl2. Des doses élevées de pinocembrine induisent une apoptose mitochondriale dans une variété de cellules cancéreuses (Yang et al., 2013). D'autres chercheurs ont montré que l'apoptose médiée par le CAPE s'accompagne d'une activation de la caspase-3, d'une régulation négative de Bcl-

2 et d'une régulation positive de Bax dans les cellules humaines HL-60 leucémiques (Wu et al., 2011).

L'apoptose peut être initiée par des altérations de l'ADN et des membranes cellulaires, via la génération d'espèces radicalaires, impliquant en fin l'activation des caspases effectrices, en particulier la caspase-3. En effet après l'induction de la mort cellulaire programmée par divers effecteurs, le précurseur inactif de cette enzyme subit une modification protéolytique passant de sa forme habituellement existée qui est la forme de pro-caspase 3 inactive à la forme activée par protéolyse par des clivages multiples de son précurseur de 32 kDa pour générer les formes 20/11 ou 17/11 kDa dans les cellules (Shen et al., 2003) et sera chargé de déclencher le processus apoptotique. La caspase-3 est considérée comme le marqueur le plus important de l'apoptose (Wenzel et al., 2000) d'où l'intérêt d'étudier l'expression de cette enzyme au cours d'un traitement par le B(a)P et par la propolis.

Pour vérifier l'éventuelle implication de la Caspase-3 dans la mort cellulaire sur l'extrait protéique des tissus pulmonaires traités par les différentes substances, les protéines sont soumises à un western blotting pour mettre en évidence l'expression de la forme active (Caspase-3 clivé).

La figure 27 ci-dessous montre une diminution de l'expression de la caspase 3 clivée dans les tissus des animaux traités par le B(a)P par rapport à ceux des tissus témoin traduisant la non activation des caspases-3 et donc l'absence du processus apoptotique. Sang et al., 2012 ont montré des résultats similaires, en effet des niveaux élevés de pro-caspase 3 ont été trouvés après traitement des cellules par des concentrations apoptotiques de BPDE, cette augmentation est dose et temps dépendante (Sang et al., 2012).

Cependant les tissus de rats recevant la propolis ont montré une augmentation de l'expression de l'enzyme par rapport à celle des rats traités par le B(a)P traduisant l'activation des caspase-3 et donc l'activation de l'activité lytique de cette enzyme conduisant à l'apoptose.

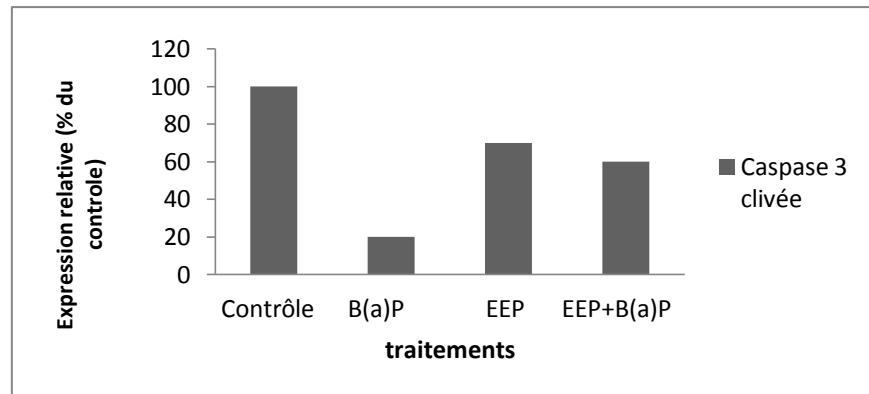
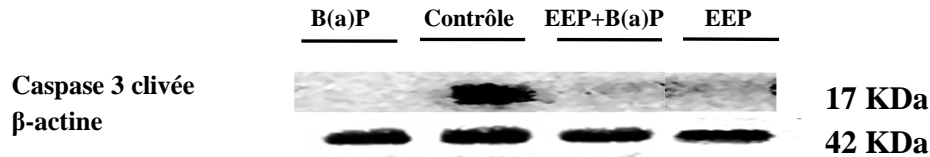


Figure 27 : Effet de l'EEP et du B(a)P sur l'expression des protéines Caspase 3 clivées analysées par *western blot* des poumons.

Contrôle (poumon sain traité par le véhicule), B(a)P (cancer pulmonaire induit par le B(a)P), EEP+B(a)P (poumon prétraité par l'extrait éthanolique de propolis suivi du B(a)P), EEP (poumon traité par l'extrait éthanolique de propolis seule)

Les résultats de Seydi et al. (2016) ont montré que l'EEP pourrait activer la caspase-3 via la voie intrinsèque médiée par les mitochondries dans les carcinomes hépatocellulaires (HCC) (Seydi et al., 2016). D'autres chercheurs ont rapporté que l'activité antitumorale de la propolis sur les cellules du cancer leucémique humain U937 se produit par l'induction de l'apoptose via les voies de la caspase (Aso et al., 2004).

Les données accumulées indiquent clairement que l'induction de l'apoptose est un événement essentiel pour la chimioprévention du cancer par des composés polyphénoliques (Szliszka et Krol, 2013). Cet effet est dû à la présence des flavonoïdes qui peuvent également affecter les cellules cancéreuses en déclenchant des processus apoptotiques par la modulation d'un certain nombre d'éléments clés impliqués dans les voies de transduction du signal cellulaire liées à l'apoptose (caspases et gènes bcl-2) (Karabín et al., 2015).

Une augmentation de l'expression des caspases-3 a été montrée dans différents types de cancer après l'utilisation de plusieurs flavonoïdes tels que la Chrysin (Li et al., 2011), l'Apigénine (Horinaka et al., 2006), le Kaempferole (Yoshida et al., 2008), la Quercétine (Chen et al., 2007) d'où leurs effets se situent dans les premières phases de l'apoptose et non dans les étapes finales engagées, y compris la protéolyse catalysée par les enzymes caspases (Havsteen et al., 2002). Les voies apoptotiques médiées par TRAIL qui implique une

apoptose dépendante de la caspase est une cible de l'activité chimiopréventive des extraits de la propolis et des polyphénols isolés à partir de cette dernière dans les cellules cancéreuses (Szliszka et al., 2013).

Ces résultats corroborent avec les nôtres, cependant d'autres chercheurs ont trouvé des résultats en désaccord avec les nôtres, ils ont trouvé que la mort cellulaire chez des cellules A549 traités par la propolis brésilienne était indépendante de la caspase-3, puisque l'expression de cette dernière n'était pas affectée par le traitement par la propolis (Frión-Herrera et al., 2015).

Il a été montré que le taux de l'oxyde nitrique (NO) présent dans la cellule, le type cellulaire, l'état d'oxydo-réduction ainsi que les protéines IAP, les protéines inhibitrice à domaine CARD et DED, peuvent réguler l'activité des caspases.

La caspase-3 possède une cystéine au niveau de son site catalytique, ce groupement thiol constitue une cible potentielle pour NO puisque une s-nitrosylation s'installe suite à l'interaction de dernier avec les groupements thiols conduisant à l'inhibition de l'apoptose (Kim et al., 1997; Kim et al., 2000).

L'oxyde nitrique NO[•] qui est une espèce réactive de l'oxygène (EOR) est un gaz qui diffuse bien à travers les membranes et le cytosol. Il est synthétisé par une enzyme, l'oxyde nitrique synthase NOS à partir d'O₂ et de l'un des atomes d'azote terminaux du groupement guanidine de la L-arginine. Dans les processus normaux, NO[•] est une molécule de signalisation clé impliquée dans la vasodilatation, la neurotransmission et la défense de l'hôte. Cependant, à des concentrations élevées, le NO[•] peut devenir néfaste.

Sa production joue un rôle important dans le cancer associé à l'inflammation, il agit en grande partie avec la p53, l'interaction entre les deux peut produire des réponses pro-tumorigènes en induisant des mutations oncogéniques dans le gène p53. A des niveaux élevés, le NO agit par interaction directe avec les macromolécules biologiques, il est vraiment délétère pour la cellule surtout lorsqu'il est présent en quantité importante et qu'il génère ainsi une autre EOR : le peroxy-nitrite NO₃. Le NO peut également réagir avec d'autres composants cellulaires pour produire des complexes de peroxy-nitrite (ONOO⁻), de nitrosyl-métal ou de trioxyde d'azote (N₂O₃), appelés collectivement espèces réactives de l'azote (RNS) hautement réactive (Tan et al., 2011) et qui sont capables de désaminer diverses bases d'ADN pour former des dérivés nitrés (Farooqui et Farooqui, 2012) et de provoquer différentes réactions chimiques dans le système biologique incluant la nitration des résidus tyrosine des protéines, le déclenchement de la peroxydation lipidique, l'inhibition du transport mitochondrial des électrons et l'oxydation du thiol biologique composé (Kaynar et al., 2005).

L'intérêt d'étudier l'influence du traitement par la propolis sur l'oxyde nitrique synthase NOS, une famille de métalloenzymes à groupement héminique responsable de la synthèse du NO est très important dans notre étude.

Il existe à ce jour 04 isoformes de NOS qui sont la forme inductible (iNOS) et les formes constitutives dépendantes de Ca^{2+} dont figure la e-NOS autrement appelé NOS-3 qui se retrouve au niveau endothélial (Powers and Jackson, 2008).

Nous avons ciblé avec des anticorps appropriés pour identifier le taux d'expression de NOS-3 par Western Blot, les protéines du tissu pulmonaire de rat traités et non traités. La figure 28 montre le niveau d'accumulation de cette protéine ou une sous-expression après le traitement par l'EEP dans le cancer pulmonaire induit par le B(a)P a été enregistrée par rapport à une surexpression dans les tissus traités par le B(a)P seule.

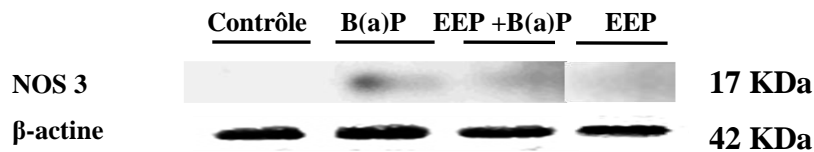


Figure 28: Effet de l'EEP sur l'expression de la protéine NOS 3 dans le tissu pulmonaire de rat. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=3). Contrôle (poumon sain traité par le véhicule), B(a)P (cancer pulmonaire induit par le B(a)P), EEP+B(a)P (poumon prétraité par l'extrait éthanolique de propolis suivi du B(a)P), EEP (poumon traité par l'extrait éthanolique de propolis seule)

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus dans diverses études qui ont montré que l'activité NOS et la synthèse de NO^{\bullet} étaient élevées dans le plasma et les tissus des patients atteints de différents cancers. Dans une étude sur des patients atteints de CPNPC, les résultats montrent que les taux de NO^{\bullet} , du MDA étaient significativement plus élevés que chez les témoins. Le taux élevé traduit une surexpression des NOS (Kaynar et al., 2005). le eNOS et son produit ont été impliqués dans la formation du cancer, à la croissance tumorale, l'angiogenèse tumorale induite par le VEGF (Abdel-Salam et al., 2011) et les métastases.

En outre, le tabagisme conduit à une inflammation chronique des voies respiratoires avec accumulation et activation des leucocytes, qui produisent des niveaux élevés de ROS et de NO^{\bullet} , il a été démontré que les patients atteints d'un cancer du poumon ont des niveaux significativement plus élevés de protéines nitrées dans le sérum, ce qui soutient la présence de stress oxydatif et nitrosatif. La nitration des protéines peut être impliquée dans la pathogenèse du cancer du poumon, car elle modifie l'activité enzymatique, les propriétés structurales et les voies de signalisation (Masri et al., 2005).

Différentes études ont démontré que les effets inhibiteurs des NOS par les flavonoïdes se produisent au niveau transcriptionnel. Dans ce contexte, il a été rapporté que la quercétine diminue significativement le niveau d'ARNm de l'iNOS dans les hépatocytes activés par IL-1bêta. De plus, Ha et al. ont rapporté que les flavones chrysin, apigénine et lutéoline et les flavonols kaempférol et quercétine partagent la capacité de réduire de manière dose-dépendante la production de NO dans les cellules de la microglie BV-2 activée par une réduction marquée des NOS (Ha et al., 2008). De manière cohérente, ont été confirmée in vivo chez le rat. Des études in vitro montrant que la quercétine et l'apigénine peuvent inhiber efficacement l'expression de iNOS dans la lignée cellulaire murine de macrophage RAW 264.7 et que le daidzéine, la génistéine, l'isorhamnétine, le kaempférol, la quercétine et la naringénine peuvent inhiber la protéine iNOS et son expression de l'ARNm ainsi que la production de NO d'une manière dose-dépendante dans les macrophages activés (Izzi et al., 2012).

La quercétine s'est également avérée inhiber l'activité des NOS et ainsi que celle du NF- κ B COX-2, mais à des doses élevées, ce qui a eu un impact sur son potentiel in vivo (Tan et al., 2011). L'apigénine inhibe la synthèse de NO en supprimant l'expression des NOS et de la COX-2 dans la microglie (Farooqui et Farooqui, 2012)

Une étude menée sur des rats diabétiques a montré que l'administration d'extraits de propolis, entraîne une baisse des taux de glucose sanguin, du MDA, d'oxyde nitrique et de monoxyde d'azote synthétase (Lotfy, 2006). Chez les mêmes rats l'administration du CAPE a entraîné la suppression de l'expression de cytokines inflammatoires comme l'iNOS et augmente significativement le taux de GSH (Kart, 2010), cela suggère que la propolis peut contrôler et balayer les radicaux libres chez les rats.

Selamoglu et al. (2015) ont aussi montré que le EEP avait des propriétés antioxydantes dans le tissu hépatique des rats en inhibant les NOS. En fait, l'inhibition de la NOS a provoqué une augmentation de l'activité de la CAT, effet qui a été significativement diminué lorsque les rats n'ont pas été traités avec EEP (Selamoglu et al., 2015)

CAPE inhibe la production du NO^{*} et l'activation du NF- κ B qui sont associés à l'inflammation. Par conséquent, ces rapports nous amènent à proposer que l'effet anti-inflammatoire de la propolis est dû à l'inhibition de la production de NO et à l'activation de NF- κ B induite par le CAPE (Tan-No et al., 2006).

I.10. Effet de l'EEP sur l'expression de protéines inflammatoires du tissu pulmonaire des rats :

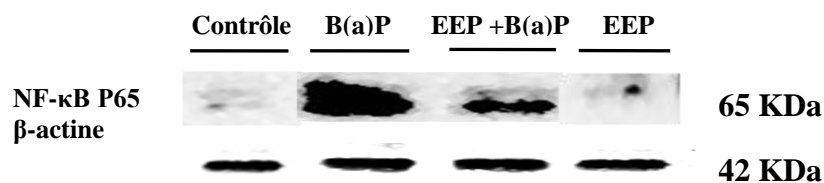
Il est généralement admis qu'il existe des liens significatifs entre l'inflammation et le cancer. On estime qu'environ 18% de tous les cancers sont associés à des inflammations (Karabin et al., 2015), ainsi la chimioprévention par modulation des mécanismes inflammatoires à travers un certain nombre de voie de certains composants cellulaires a été proposée, dans l'inflammation qui joue un rôle critique dans le processus de cancérogenèse et de progression tumorale (Tan et al., 2011).

Les médiateurs pro-inflammatoires, à savoir NF- κ B, COX-2 et TNF- α sont les principaux acteurs moléculaires impliqués dans l'axe inflammation-cancer. En somme, les conséquences de l'activation des complexes NF- κ B et des COX-2 sont importantes au niveau de l'inflammation mais aussi au niveau du contrôle du cycle cellulaire et ils sont donc considérés comme cruciaux dans le développement des cancers dont les cancers pulmonaires.

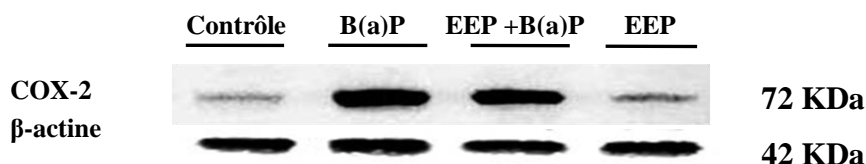
Le NF- κ Bp65 est un facteur de transcription inductible qui contrôle l'expression de plus de cent gènes impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires, l'apoptose, la prolifération et la différenciation. Dans la plupart des types de cellules cancéreuses, le NF- κ B est constitutivement actif (Sawicka et al., 2012). Il est la cible évidente pour de nouveaux types de traitements anti-inflammatoires (Seon et al., 2002) et de chimioprévention (Tan et al., 2011).

La cyclo-oxygénase 2 (COX-2) est une forme inductible de cyclo-oxygénase. Son expression est induite par divers stimuli, tels que des facteurs de croissance et des cytokines, ainsi que par les carcinogènes. Des rapports sur l'expression de COX-2 dans les cancers montrent que les produits formés par son action enzymatique qui sont des prostaglandines, altèrent l'apoptose et stimulent la croissance cellulaire, l'angiogenèse ou d'autres étapes qui conduisent au cancer (kamaraj et al., 2010).

(A)



(B)



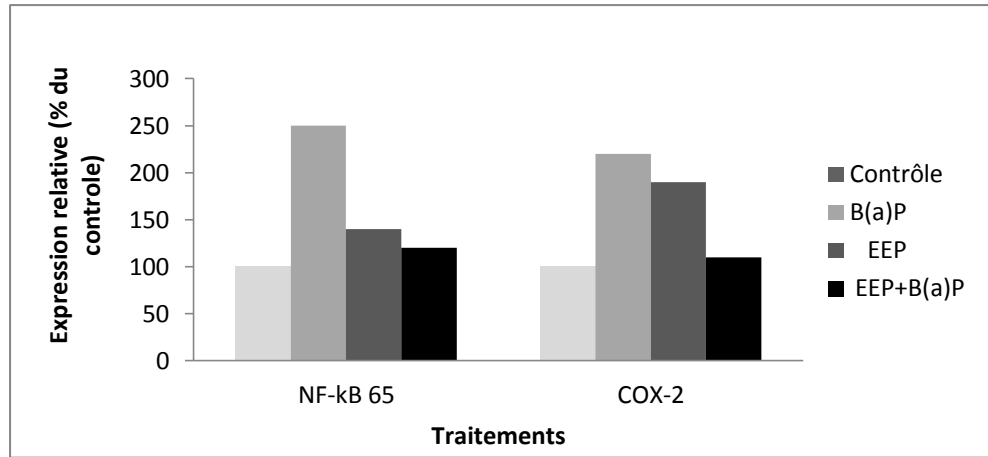


Figure 29 : Effet de l'EEP et du B(a)P sur l'expression des protéines par analyse par *western blot* des poumons des différents groupes d'animaux.

(A) : NF- κ B et (B) : COX-2. Contrôle (poumon sain traité par le véhicule), B(a)P (cancer pulmonaire induit par le B(a)P), EEP+B(a)P (poumon prétraité par l'extrait éthanolique de propolis suivi du B(a)P), EEP (poumon traité par l'extrait éthanolique de propolis seule)

Dans la présente étude, une augmentation de l'expression de COX-2 et de NF- κ B a été observée chez des animaux atteints du cancer bronchique induit par le B(a)P, pouvant être à l'origine de la pathogenèse du cancer du poumon.

Des résultats précédant sur le condensat de fumée de cigarette et le B(a)P ont montré qu'ils induisaient le NF- κ B suite aux dommages causés par les radicaux libres (Anand et al., 2013).

L'une des approches possibles est l'activation de NF- κ B par un mécanisme de signalisation impliquant Raf-1/MEKK-1. Il a été rapporté que la surexpression de Bcl-2 augmente l'activité de l'AKT (protéine kinase B) et de l'IKK, ce qui entraîne une activité transcriptionnelle accrue de la NF- κ B dans le cancer (Anand et al., 2013). Des études ont également montré que la surexpression de Bcl-2 entraîne une augmentation de l'activité de NF- κ B. Ce dernier a également une fonction anti-apoptotique. Plusieurs études dans différents types de cellules ont montré que le traitement avec des activateurs connus de NF- κ B entraîne souvent une augmentation de l'expression de Bcl-2. En outre, lorsque l'inhibiteur de NF- κ B comme I κ B α a été exprimé dans des cellules neuronales ou des lymphocytes B, il y avait une diminution correspondante dans l'expression de Bcl-2 (Tamatani et al., 1999).

En outre, une étude démontre clairement que la fumée de cigarette et le B(a)P, peuvent activer le NF- κ B dans différents types cellulaires (les cellules lymphoïdes, myéloïdes et épithéliales) par la formation du complexe NF- κ B-ADN, la phosphorylation et la dégradation de I κ B α , l'activation de I κ B α kinase, l'activation de la transcription du gène exprimant le NF- κ B et

l'expression de COX-2. Cette même étude indique que ces composés peuvent également induire l'expression de la protéine COX-2 où cette dernière est surexprimée chez les patients atteints d'un cancer du poumon, d'un cancer du cou ou d'un cancer du sein (Anto et al., 2002). Nos résultats corroborent avec ceux de Kasala, 2016 où ces deux protéines ont été trouvées en surexpression dans les poumons des animaux traités par le B(a)P par rapport à ceux non traités par ce carcinogène (Kasala et al., 2016).

Cependant les rats recevant la propolis ont montré une inhibition de l'expression de la COX-2 et du NF- κ B p65 par rapport à celle des rats traités par le B(a)P.

Selon Patel (2016), la propolis agit sur différentes cibles du métabolisme du cancer parmi eux le blocage de la localisation nucléaire NF- κ B et la modulation de l'expression génique, (Patel, 2016). Plusieurs études ont montré l'effet du CAPE sur ce facteur de transcription multifonctionnel dont Natarajan et al., (1996) qui ont rapporté que CAPE est un inhibiteur puissant et spécifique de l'activation du NF- κ B. L'explication la plus probable est l'inhibition par le CAPE de la liaison à l'ADN du NF- κ B par un blocage de son activation par le TNF d'une manière dose et temps dépendante, ce qui conduit à la suppression de l'induction de l'expression génique (Natarajan et al., 1996). L'inhibition de l'activation de NF- κ B produit une augmentation correspondante de l'apoptose, indiquant que l'équilibre entre la viabilité cellulaire et la mort cellulaire est préservé par le degré d'activation de NF- κ B.

Il a été aussi démontré que le blocage du NF- κ B empêche la prolifération des cellules tumorales et favorise leur sensibilité à l'action des agents antitumoraux, en particulier des antioxydants. Ainsi, de faibles doses de CAPE régulent négativement l'activation de NF- κ B en inhibant l'EGFR dans les cellules TNBC (cancer du sein) qui surexpriment cette protéine, une caractéristique moléculaire importante dans leur tumorigenèse et qui agit sur l'activation de NF- κ B en aval (Wu et al., 2011). Une étude suggère également que CAPE inhibe NF- κ B et améliore la voie extrinsèque de l'apoptose dans les cellules cancéreuses induites par TRAIL et stimulation du récepteur Fas. Tous ces effets semblent être indépendants du type de cellules tumorales et de la concentration ou de la dose de CAPE (Sawicka et al., 2012).

Les flavonoïdes peuvent inhiber à la fois l'activité de différents médiateurs de l'inflammation autre que le NF- κ B telles les COX-1 et les COX-2 avec un effet suppresseur sur les niveaux de ROS, de NO et de prostaglandines générés (Leyva-López et al., 2016). D'autres études ont confirmé que le traitement par les flavonoïdes inhibe significativement l'expression de la COX-2, maintenant ainsi les niveaux de synthèse des prostaglandines dans les cellules ce qui a pu entraîner la suppression de la cancérogenèse dans le cas d'un cancer pulmonaire induit par le B(a)P (Kamaraj et al., 2010 ; Kasala et al., 2016).

Enfin, le prétraitement par notre extrait de propolis a considérablement réduit l'expression élevée des COX-2 et de NF-kB p65 confirmant ainsi l'effet anti-inflammatoire de la propolis dans le cadre du cancer pulmonaire.

Enfin la modulation et la neutralisation des processus inflammatoires par la propolis peuvent fournir une protection alternative contre les cancers dus à l'inflammation chronique.

II. Influence de l'EEP sur les cellules pulmonaires traitées par les anticancéreux :

Malgré les progrès récents dans les thérapies ciblées pour les patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires, la chimiothérapie reste la norme de soins pour la majorité des patients atteints de ce type de cancer. Au cours des deux dernières décennies, les méthodes pour optimiser l'efficacité de la chimiothérapie ont augmenté comme l'association d'anticancéreux (la polychimiothérapie) ou même l'association du traitement avec la radiothérapie ou la chirurgie, mais ces méthodes ont montré une toxicité accrue d'où le recours à la réduction d'intervalle entre deux cures, la diminution de la dose thérapeutique ou même l'interruption de traitement programmé ou l'abandon.

Selon les chercheurs, une réduction des effets secondaires a été associée à l'utilisation des antioxydants, par conséquent pourrait avoir un effet favorable sur les résultats du traitement.

Dans de nombreux cas, les antioxydants ont augmenté la survie et/ou la réponse thérapeutique avec une réduction importante de la toxicité des traitements.

II.1. Effet de l'EEP sur le poids pulmonaire et corporel des animaux :

Le tableau 6 ci-dessous regroupe les différents résultats obtenus après l'évaluation de l'effet de la supplémentation de l'EEP à un traitement anticancéreux, sur le poids corporel et pulmonaire des rats. Les mesures sont effectuées à la fin de l'expérimentation.

Tableau 6 : influence de l'administration de l'extrait éthanolique de propolis sur le poids des poumons et sur le poids corporelle

Paramètres	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 4	Groupe 5
Nombre de rat examinés	8	8	8	8
Poids corporelle (g)	300 ± 10	204,53 ± 21,87 **	220 ± 20 **	262,66 ± 18,14 *
Poids du poumon (g)	1,15 ± 0,06	2,31 ± 0,2 **	1,98 ± 0,08 *	1,4 ± 0,12 *
Le poids relatif des poumons (ROW) (%)	0,38	1,129	0,9	0,53

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=8). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

La valeur moyenne du poids corporel des rats recevant une administration combinée de la propolis et des agents anticancéreux était de $262,66 \pm 18,14$ g contre 220 ± 20 g, valeur des rats traités par les anticancéreux seuls. Alors que le poids des poumons était significativement diminué ($p < 0,05$) dans le lot traité par l'association par rapport à celui des rats traités par les agents anticancéreux avec une valeur de $1,4 \pm 0,12$ g et $1,98 \pm 0,08$ g, respectivement.

Les données sur le poids relatif des poumons (ROW) (calculé comme montré précédemment) ont montré qu'il y a une diminution de 0,53 et 0,9 dans le groupe 5 et le groupe 4, respectivement par rapport au groupe 2 où la valeur est de 1,129. Plus le poids du poumon est bas par rapport à celui du corps plus l'indice est diminué et vice versa. Cette baisse de valeur dans le groupe supplémenté de propolis témoigne son effet bénéfique en renforçant l'efficacité du traitement chimiothérapeutique.

La baisse du poids chez les animaux du groupe 5, signifie l'effet protecteur de l'EEP contre une anorexie causée par les agents anticancéreux. Ces résultats sont en accord avec ceux d'Oršolić et al. 2010 où le traitement de souris par une combinaison de propolis ou de leurs composants actifs tel que la quercétine et la naringénine en association avec un traitement anticancéreux, a montré un retard dans la croissance tumorale et une augmentation significative de la survie sans perte de poids corporel (Oršolić et al., 2010). D'autres chercheurs ont montré dans leurs résultats une augmentation du poids corporel chez le groupe traité par la propolis en association avec le médicament anticancéreux par rapport au groupe recevant l'anticancéreux seul (Padmavathi et al., 2006). Par contre Fadillioglu et al. 2004 n'ont pas trouvé une différence de poids corporel entre les deux groupes traités par les antinéoplasiques seuls ou associé avec le dérivé de l'acide caféique (CAPE), qui est un puissant composant de la propolis (Fadillioglu et al., 2004).

II.2. Effet de l'EEP sur les marqueurs enzymatiques (LDH et GGT) :

Les marqueurs enzymatiques ont une importance clinique car leur activité et leur variation reflètent le changement global du métabolisme qui survient pendant la malignité ou lors d'un dysfonctionnement organique. Ils peuvent être utilisés pour le diagnostic comme ils peuvent être des indicateurs du pronostic de la maladie ainsi qu'un biomarqueur moléculaire potentiel pour évaluer l'exposition aux différents agents toxiques tel que les médicaments chimiothérapeutiques qui sont souvent associés à un certain degré de toxicité causés par des métabolites réactifs générés lors de leurs biotransformation.

Nous avons choisi dans notre étude deux marqueurs LDH et la GGT qui sont meilleurs en terme de pronostic par rapport au diagnostic et qui sont utilisés comme témoins de la réponse du cancer au traitement antinéoplasique (Miao et al., 2013).

Le tableau 7 représente l'effet des agents chimiothérapeutiques ainsi que l'effet de l'association de la propolis et de ces agents sur deux marqueurs enzymatiques LDH et GGT.

Tableau 7: effet de la propolis sur l'activité des marqueurs enzymatiques du sérum des différents groupes

Paramètres	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 4	Groupe 5
LDH ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines)	1,15 \pm 0,016	3,07 \pm 0,046 ^{**1}	2,21 \pm 0,017	1,76 \pm 0,15 ^{***2}
GGT (nmoles/min/mg de protéines)	1,938 \pm 0,102	3,414 \pm 0,364 ^{***1}	3271 \pm 189	2082 \pm 16,7 ^{**2}

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type (n=8). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

1: le groupe 2 comparé avec le groupe 1.

2: le groupe 5 comparé avec le groupe 4.

Le dosage de la LDH et de la GGT dans le sérum des rats traités par les médicaments anticancéreux a révélé la présence d'un taux élevé en ces deux marqueurs enzymatiques avec une valeur de 2,21 \pm 0,017 et 3271 \pm 189, respectivement. Ces taux sont très élevés par rapport à ceux du groupe témoin (1,15 \pm 0,016 et 1,938 \pm 0,102) et représentent presque leur double.

Dans le groupe 5, la concentration de la LDH et de la GGT sérique ont diminué d'une façon hautement significative ($p < 0,001$) avec une valeur de 1,76 \pm 0,15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines enregistrée de la LDH et de 2082 \pm 16,7 nmoles/min/mg protéines de la GGT par rapport au groupe 4.

Nos résultats montrant une baisse de l'activité de ces deux enzymes dans le groupe d'anticancéreux supplémenté par la propolis, corrobore avec ceux d'Oršolić, 2010 qui ont trouvé que la combinaison de propolis et ces flavonoïdes avec la chimiothérapie a permis de réduire nettement les toxicités médicamenteuses alors que le médicament seul augmentait les activités de LDH et d'autres enzymes, indiquant un dysfonctionnement organique et une lésion cellulaire. Ils ont aussi montré que l'effet protecteur a été plus exprimé en prévention que dans le traitement curatif avec la propolis et ses composés (Oršolić et al., 2010).

II.3. Influence de l'EEP sur la peroxydation des lipides membranaires des cellules pulmonaires traitées par les anticancéreux :

Les médicaments anticancéreux sont conçus pour interférer avec les cellules néoplasiques à division rapide; Cependant, ces mêmes médicaments peuvent également avoir des effets néfastes sur plusieurs organes et tissus normaux.

Les ROS résultant de l'administration des anticancéreux ont été impliqués dans l'étiologie de la cardiotoxicité, la toxicité pulmonaire, la néphrotoxicité, la neurotoxicité et l'ototoxicité. Bien que ces ROS puissent contribuer à la toxicité gastro-intestinale qui contribue aux nausées et aux vomissements et provoque la diarrhée et une mauvaise absorption des nutriments (Conklin, 2009). La plupart des études ont montré que des malignités secondaires se développent chez 5 à 10% des individus qui reçoivent une chimiothérapie et que les ROS générés pendant la chimiothérapie jouent un rôle important dans le développement des malignités secondaires (Guyton et Kensler, 1993). Il a été démontré que les antioxydants empêchent les effets toxiques, mutagènes et cancérigènes des agents antinéoplasiques.

Dans cette partie de notre étude, nous avons déterminé l'activité antioxydante et protectrice de notre extrait de propolis sur les tissus pulmonaires contre un stress oxydatif induit par le B(a)P et/ou par les médicaments anticancéreux : le 5-fluorouracile : 600 mg/m², l'Epirubicine : 80mg/m², le Cyclophosphamide : 600 mg/m² et ce en explorant les systèmes de détoxification antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

Les variations des taux de malondialdéhyde du tissu pulmonaire après traitement des rats par le B(a)P (200 mg/kg/IP) et / ou par les médicaments anticancéreux sont rapportés dans la figure 30.

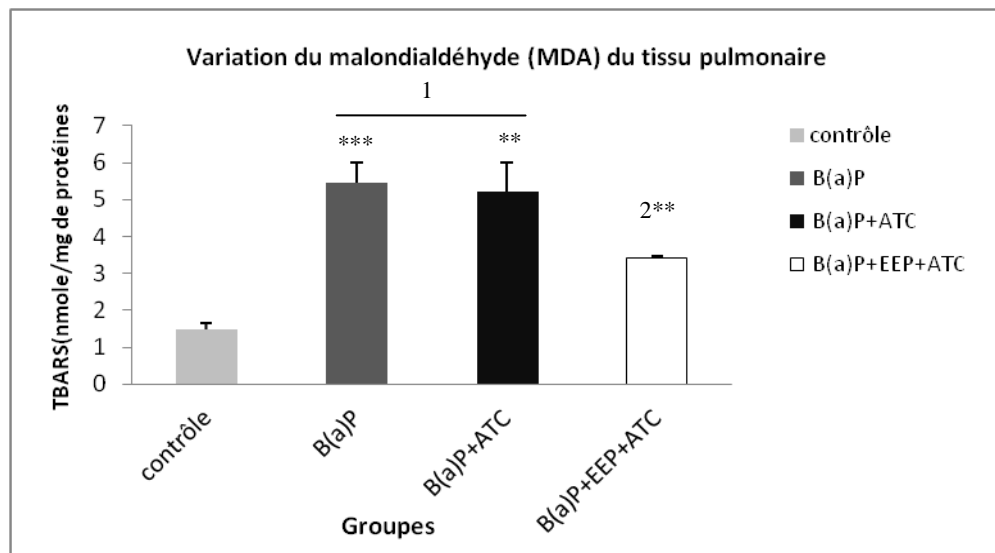


Figure 30: Variations des taux du MDA cytosolique des rats traités par le B(a)P, les anticancéreux et la propolis. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=8). Contrôle : rats témoin, B(a)P : rats traités par le B(a)P seul, B(a)P + ATC : rats traités par le B(a)P et les médicaments anticancéreux, B(a)P + EEP + ATC : rats traités par le B(a)P, par l'extrait éthanolique de propolis et les médicaments anticancéreux.

1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P + ATC

Une augmentation de la peroxydation des lipides a été observée aussi bien chez les rats traité par le B(a)P seul et après le traitement de ces rats par les anticancéreux, traduite par une augmentation très significative ($p < 0.01$) des taux du MDA par rapport aux témoins ($5,21 \pm 0,78$ nmole/mg de protéines contre $1,48 \pm 0,16$ nmole/mg de protéines), cela est peut être expliqué par une altération des lipides membranaires par les ROS générés dans les cellules cancéreuses pulmonaires lors du métabolisme des médicaments. Ces derniers sont connus produire de grandes quantités de RLO, qui interagissent à leur tour avec les lipides membranaires et par conséquent induisent une LPO, qui est considérée comme le processus le plus dommageable connu pour se produire dans tous les organismes vivants (Montillet et al., 2005).

La manière dont le stress oxydatif et les agents antinéoplasiques cytotoxiques influencent la progression cellulaire à travers le cycle cellulaire est très importante. Par exemple la peroxydation lipidique peut prolonger la phase G0 du cycle cellulaire ainsi, les cellules tumorales à l'état non proliférant G0 sont peu affectées par les médicaments anticancéreux et peuvent réintégrer le cycle de division après la fin de la chimiothérapie, ce qui entraîne une récurrence de la maladie. Il explique également pourquoi les tumeurs à croissance lente, telles que les carcinomes du poumon et du côlon, qui ont probablement de nombreuses cellules dans

la phase G0 en périodes prolongées, sont relativement insensibles à la chimiothérapie (Conklin, 2009).

Généralement, afin de surmonter les effets secondaires toxiques des médicaments anticancéreux, certains agents antioxydants sont considérés comme utiles pour moduler le stress oxydatif. En conséquence, un traitement avec des agents anti-oxydants potentiels pourrait être une approche pour améliorer la toxicité chimiothérapeutique (dos Santos et de Cruz, 2001). La propolis a été démontrée pour potentialiser les chimiothérapies et pour atténuer leurs effets indésirables (Patel, 2016).

Après traitement, par l'EEP, des rats atteints du cancer pulmonaire par le B(a)P recevant la chimiothérapie, les taux du MDA sont diminués de façon significative ($p < 0,01$) atteint $3,42 \pm 0,06$ nmole/mg de protéines contre $5,21 \pm 0,78$ nmole/mg de protéines chez les rats recevant la thérapie seule. Le résultat net de cet événement se traduit par la diminution du peroxyde lipidique et du MDA.

Ces résultats sont en accord avec les études antérieures qui ont montré qu'un traitement avec la propolis pourrait améliorer les effets secondaires provoqués par l'injection de CP, bien qu'il ne puisse pas retourner leurs valeurs à des niveaux normaux (El-naggar et al., 2015). D'autres chercheurs ont montré que la dose thérapeutique de CP pouvait provoquer la toxicité hépatique, pulmonaire et sérique chez des souris et que le stress oxydatif, est le responsable de cette toxicité (Selvakumar et al., 2005 ; Jain and Jain, 2012). Ludeman (1999) a signalé que le CP subit une activation métabolique par le cytochrome P450 pour produire les deux métabolites, la moutarde phosphoramide et l'acroléine, qui sont responsables de l'induction du stress oxydatif (Ludeman, 1999). D'autres chercheurs ont montré que l'application clinique de l'EPI est limitée par la toxicité sur les différents organes notamment le cœur et le foie, ce qui entraîne une réduction de sa dose et donc une diminution de l'efficacité du traitement. L'EPI est principalement métabolisé par le foie et génère les métabolites épiburicinol et EPI glucuronide, qui sont liés à des radicaux libres d'oxygène, entraînant ainsi sa toxicité.

Des études ont montré que l'augmentation des ROS chez les anthracyclines, se produisent par la formation de complexes anthracycline-fer ou par le cycle redox des fragments quinone et semiquinone (Minotti et al., 2004). Ces ROS interagissent facilement avec divers composants cellulaires, provoquant une peroxydation des lipides et des dommages à la membrane (Lipshultz et al., 2013). L'utilisation de l'EPI a provoqué l'augmentation significative des niveaux de MDA qui suggère que la peroxydation lipidique provoque une lésion tissulaire.

Ates et al. (2006) et Bhadauria et al. (2007) ont déclaré que le CAPE, qui est un important composé d'extrait de la propolis, a régulé les enzymes antioxydantes, inhibé la peroxydation lipidique et a réduit les lésions provoquées par les anticancéreux (Ates et al., 2006 ; Bhadauria et al., 2007). Dos Santos et de Cruz (2001) ont montré que les propriétés antioxydantes de la propolis pouvaient réduire les effets secondaires causés par les médicaments chimiothérapeutiques sans nuire aux effets thérapeutiques (Dos Santos et de Cruz, 2001).

La propolis a des effets biologiques qui agissent en synergie avec des médicaments chimiothérapeutiques tel que le 5-fluorouracil (Suzuki et al., 2002). De plus, il a été démontré que la propolis est un adjuvant prometteur avec la chimiothérapie (Padmavathi et al., 2006) et avec l'immunisation (Chu, 2006).

II.4. Influence de l'EEP sur la réserve des cellules pulmonaires en glutathion :

Le statut antioxydant des patients atteints de cancer peut jouer un rôle important dans leur réponse à la chimiothérapie, les personnes ayant un état déficient étant relativement insensibles. Cependant, une thérapie nutritionnelle avec des antioxydants pendant la chimiothérapie, peut réduire la production de peroxydes lipidiques résultant du traitement et surmonter les effets inhibiteurs du stress oxydatif et maintenir la réactivité aux agents antinéoplasiques (Conklin, 2009).

En tant que première ligne de défense contre les ROS, le système antioxydant GSH est un mécanisme de défense crucial. La toxicité pulmonaire induite par la chimiothérapie commence lorsque les réserves de GSH sont épuisées, conformément aux résultats d'autre étude ou une hépatotoxicité induite par l'utilisation de certains anticancéreux comme EPI (Wu et al., 2016) ou cyclophosphamide a montré une réduction des réserves en GSH. Le métabolisme du cyclophosphamide produit des électrophiles hautement réactifs et la diminution de la valeur de GSH dans le groupe traité par le cyclophosphamide probablement en raison de la charge électrophile sur les cellules et aussi en raison de la formation d'acroléine qui diminue la teneur en GSH (Jain et Jain, 2012). Ces résultats corroborent ceux trouvés dans notre étude où le taux du GSH a diminué de façon significative $6,25 \pm 0,15$ uM/g de tissu par rapport au témoin.

Beaucoup de travaux ont démontré que l'administration des médicaments antinéoplasiques pendant la chimiothérapie, entraîne un degré de stress oxydatif très important. Ceci est illustré par l'élévation des produits de peroxydation lipidique, la réduction de la capacité totale de piégeage radicalaire du plasma sanguin, la réduction marquée des taux plasmatiques

d'antioxydants tels que la vitamine E, la vitamine C et le β -carotène, et la réduction marquée des niveaux de glutathion tissulaire (GSH) qui se produit pendant la chimiothérapie avec essentiellement tous les médicaments antinéoplasiques (Conklin, 2009)

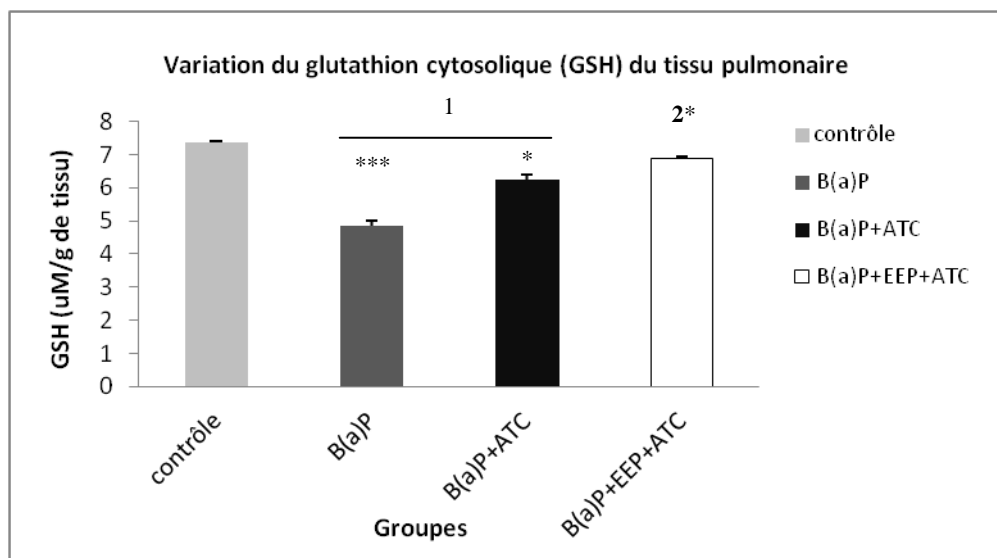


Figure 31 : Variations des taux de la GSH cytosolique des rats traités par le B(a)P, les anticancéreux et la propolis. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=8). Contrôle : rats témoins, B(a)P : rats traités par le B(a)P seul, B(a)P + ATC : rats traités par le B(a)P et les médicaments anticancéreux, B(a)P + EEP + ATC : rats traités par le B(a)P, par l'extrait éthanolique de propolis et les médicaments anticancéreux

1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P + ATC

Le traitement avec l'EEP a réduit probablement la charge électrophile et ainsi augmenté significativement les niveaux de GSH dans le poumon pour atteindre un niveau de $6,9 \pm 0,04$ uM/g de tissu.

II.5. Influence de l'EEP sur la capacité des enzymes antioxydantes :

La SOD et la Catalase se défendent contre les ROS en catalysant et en décomposant les radicaux $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 , respectivement. La GST est impliquée également dans la réduction des dommages des ROS dans différentes cellules. Dans la présente étude sur la base du fait que les anticancéreux génèrent des ROS dans son processus métabolique, nous avons évalué l'effet de la chimiothérapie seul ou associé à un traitement par la propolis sur l'activité enzymatique de la SOD, la CAT et la GST. La figure 32 montre les variations de l'activité des trois enzymes entre les différents lots.

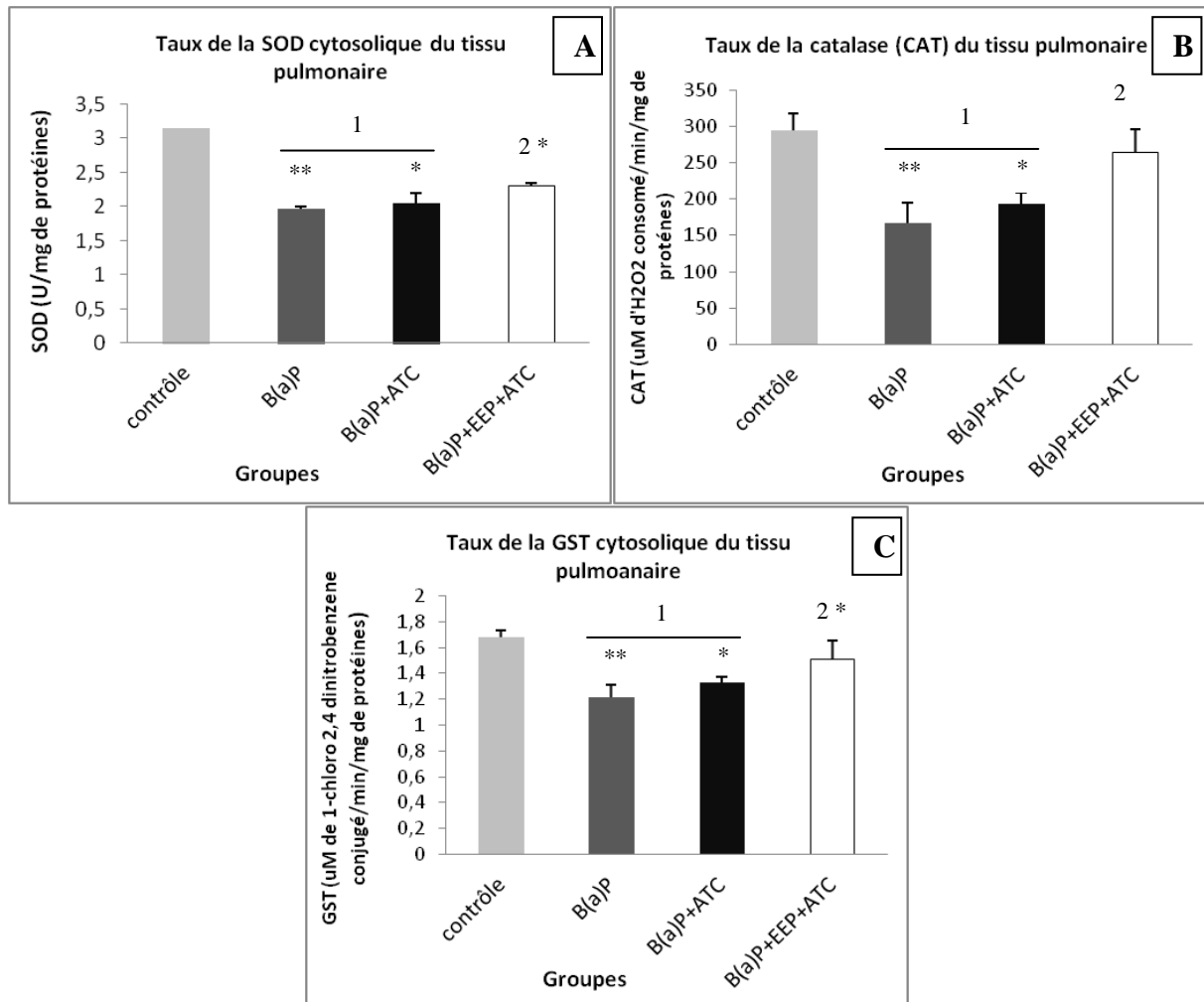


Figure 32: Variations des taux des antioxydants enzymatiques des rats traités par le B(a)P, les anticancéreux et la propolis. **(A)** Variations des taux de la SOD cytosolique de rats traités **(B)** Variations des taux de la CAT cytosolique de rats traités **(C)** Variations des taux de la GST cytosolique de rats traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=8). Contrôle : rats témoin, B(a)P : rats traités par le B(a)P seul, B(a)P + ATC : rats traités par le B(a)P et les médicaments anticancéreux, B(a)P + EEP + ATC : rats traités par le B(a)P, par l'extrait éthanolique de propolis et les médicaments anticancéreux

1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P + ATC

Une diminution significative ($p < 0,05$) des activités enzymatiques est observée chez le lot traité par les médicaments anticancéreux, l'activité de la SOD atteint $2,05 \pm 0,147$ U/ mg de protéines alors que chez le lot témoin elle est de $3,14 \pm 0,008$ U/ mg de protéine quant à celle de la CAT et de la GST elle est de $173,33 \pm 16,07$ μ M d'H₂O₂ consommé /min/mg de protéines, $1,32 \pm 0,04$ μ M de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué/min/mg de protéines respectivement par rapport à une valeur de $294,66 \pm 23,11$ μ M d'H₂O₂ consommé /min /mg

de protéines, $1,68 \pm 0,04 \mu\text{M}$ de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué/min/mg de protéines enregistrés dans le lot témoin.

Des résultats similaires ont été trouvés après l'administration des anthracyclines (EPI et doxorubicine) qui augmentent la sensibilité des myocytes aux ROS en supprimant l'activité d'enzymes antioxydantes potentiellement protectrices (SOD, CAT et GST). Les anthracyclines initient également des actions toxiques à travers des changements dans la structure et la fonction mitochondriale (Lipshultz et al., 2013).

De nombreuses études ont également démontré que les antioxydants n'inhibent pas, mais améliorent réellement, l'effet cytotoxique des médicaments antinéoplasiques sur les cellules cancéreuses (Conklin, 2009). L'administration de l'EEP a significativement augmenté les activités SOD, CAT et GST, suggérant qu'il avait la capacité de restaurer les activités de ces trois enzymes. Le stress oxydatif découlant de la surproduction de ROS et de la dégradation des défenses antioxydantes est documenté pour induire une rupture chromosomique. Il a été suggéré que des facteurs clastogènes sont libérés par les cellules exposées au stress oxydatif. Les capteurs de radicaux libres, y compris les composés naturels tels que les polyphénols, réduisent ou neutralisent l'activité de ces espèces réactives de l'oxygène. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la génotoxicité induite par le cyclophosphamide et la cytotoxicité sur les cellules pulmonaires peuvent être partiellement réparées par l'activité antioxydante (Jain et Jain, 2012). La diminution des niveaux de GSH, des activités SOD et CAT dans les tissus traités par l'EPI et leur augmentation dans les groupes co-traités par le paeonol ; un phénol connu par ses capacités antioxydantes ; restaure les activités des enzymes antioxydantes, qui ont été perdues (Wu et al., 2016). Les agents toxiques générés (ROS) lors du traitement par les anthracyclines, peuvent être neutralisés en introduisant des antioxydants, à la fois de manière endogène et exogène, au moyen de compléments nutritionnels (Lipshultz et al., 2013).

Ces quelques exemples parmi nombreux soulignent clairement que, outre le potentiel de la propolis utilisée comme agent thérapeutique, sa co-administration avec un traitement anticancéreux est un domaine d'investigation intéressant. Nos résultats confirment qu'un pré-traitement avec des antioxydants naturels peut réduire les effets indésirables des médicaments chimiothérapeutiques sur des cellules normales avec une efficacité égale ou accrue sur les cellules tumorales. En outre, les résultats de la présente étude chez le rat nous ont donné l'espoir que la propolis et les flavonoïdes peuvent conférer dans la prévention ou la réduction des effets secondaires liés au stress oxydatif, dus aux agents chimiothérapeutiques, et peuvent

être utilisés chez les humains à l'avenir comme complément à thérapie standard contre le cancer.

II.6. Résultat d'évaluation macroscopique et microscopique des poumons :

Les changements de la morphologie macroscopique et microscopique de notre organe après un traitement chimiothérapeutique seul ou précédé par notre substance bioactive, sont indispensables afin de juger de l'efficacité ou non du traitement

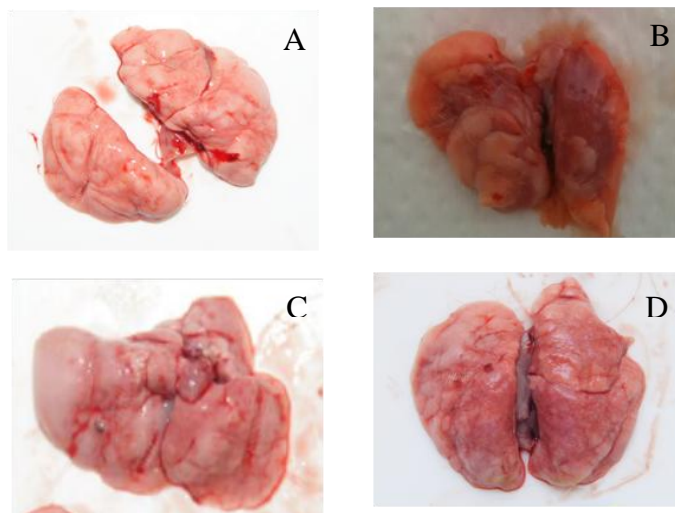


Figure 33 : Examen macroscopique des poumons des différents groupes.

(A) : poumon de rat témoin, (B) : poumon de rat traité par le B(a)P, (C) : poumon de rat traité par les anticancéreux seules, (D) poumon de rat traité par la propolis et les anticancéreux.

Les résultats d'examen macroscopique et microscopique des poumons des rats témoins et traités par le B(a)P seul ainsi que leurs discussions, ont été présentée précédemment (voir plus haut).

l'examen macroscopique du poumon traité par l'association propolis et anticancéreux (Figure D 33), présente moins de toxicité par rapport à celui traité par les anticancéreux seul, montrée dans la (Figure C 33) dont la présence de quelques signes de toxicité comme des parties blanchâtres et un début de fusion lobulaire ont été remarqué et qui a été confirmé par l'examen microscopique présenté dans la figure 34.

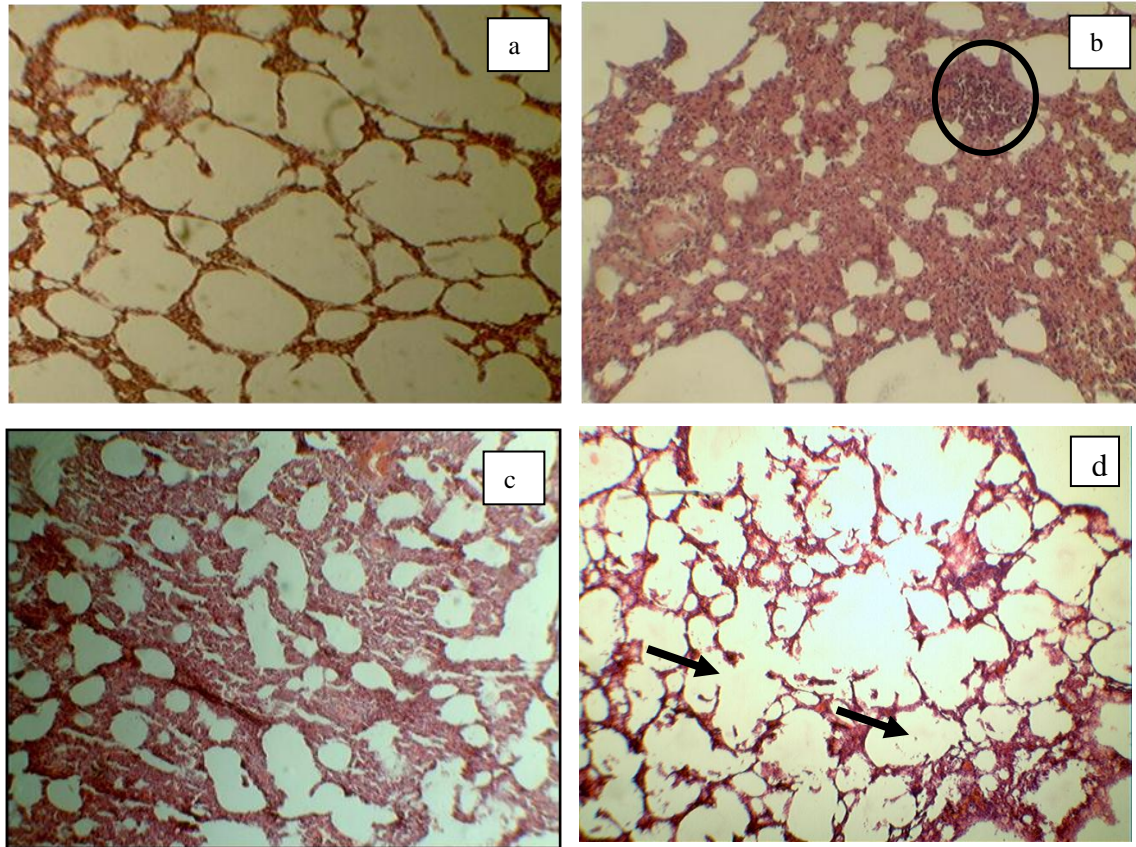


Figure 34: Photomicrographie de l'examen histopathologique des poumons des rats (hématoxyline & éosine) (x100). (a) : poumon de rat témoin, (b) : poumon de rat traité par le B(a)P, (c) : poumon de rat traité par les anticancéreux seules, (d) : poumon de rat traité par la propolis et les anticancéreux.

Les cercles indiquent des zones où l'infiltration des cellules inflammatoires est la plus importante et les flèches désignent les espaces alvéolaires.

La figure 34 montre les changements histologiques des poumons du rat Wistar cancéreux après traitement par les médicaments anticancéreux seule ou associé à la propolis visualisés par microscope optique.

Les différentes altérations néoplasiques trouvées chez les animaux du groupe 2 ont été discuté précédemment. L'examen microscopique des coupes histologiques réalisées sur des poumons traités par des médicaments anticancéreux montre des espaces alvéolaires de dimension irrégulière et une architecture endommagée du parenchyme pulmonaire. Aussi la présence des infiltrats inflammatoires lymphocytaires très denses a été observée avec une destruction de l'architecture pulmonaire normale.

D'après l'analyse histopathologique des tissus du groupe prétraité par la propolis suivi d'anticancéreux, les dommages hyperplasiques ainsi que les altérations importantes associées au traitement anticancéreux ont été atténuées suivis d'un rétrécissement de l'inflammation. Le pré-traitement par notre substance bioactive protège les tissus pulmonaires contre les

dommages de la chimiothérapie bien à l'avance. Ces résultats suggèrent que l'EEP joue, à la fois un double rôle préventif, contre la carcinogenèse induite par le B(a)P et contre les lésions causées par le traitement avec le carcinogène.

L'utilisation de la propolis riche en antioxydants permettrait de réduire la toxicité de la chimiothérapie sans en affecter l'efficacité.

Ces données prometteuses redonnent un élan quant à l'intérêt d'une supplémentation en antioxydants. Le potentiel clinique majeur dégagé par ces études est de permettre aux patients supplémentés de recevoir des doses de chimiothérapie plus importantes et d'éviter l'arrêt prématuré des cures consécutif aux graves effets indésirables des cytotoxiques.

III.1. Effet du B(a)P sur la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) par les mitochondries pulmonaires *in vitro* :

La dysfonction mitochondriale est considérée comme la voie intrinsèque de l'apoptose. Cet organe est directement impliquée dans des conditions de stress oxydatif, en raison de la génération constante d'anions superoxyde ($O_2^{\circ-}$) par la chaîne respiratoire. La mitochondrie est directement impliqué dans des conditions de stress oxydatif, en raison de la génération constante d'anions superoxyde ($O_2^{\circ-}$) par la chaîne respiratoire. Ce dernier et lors de sa formation excessive et en impliquant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), génère le radical hydroxyle (OH) extrêmement réactif conduisant à la mort cellulaire nécrotique ou apoptotique.

Puisque le superoxyde est le principal précurseur d'autres ERO responsable de l'induction du stress oxydant, la mesure de sa production par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale constitue l'un des paramètres les plus importants dans l'étude du stress oxydatif. Nous avons testé différentes concentrations croissantes du B(a)P dilué dans le Toluène sur les mitochondries isolées des poumons des rats Wistar albinos.

Les résultats concernant la production de l'anion superoxyde par les mitochondries isolées de poumons de rat et traitées par différentes concentrations du B(a)P sont regroupés dans la figure 30 ci-dessous. En comparant ces résultats au contrôle, on constate que le B(a)P à différentes concentrations 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M induit la production de l'anion superoxyde, allant d'un pourcentage de production de l'anion de 148,66 % à une concentration de 10^{-7} M jusqu'à 437 % à la concentration 10^{-3} M. Cette augmentation est dose dépendante, qui traduit la toxicité du B(a)P à différentes concentrations et donc montre clairement l'effet pro-oxydant du B(a)P à fortes comme à faibles concentrations.

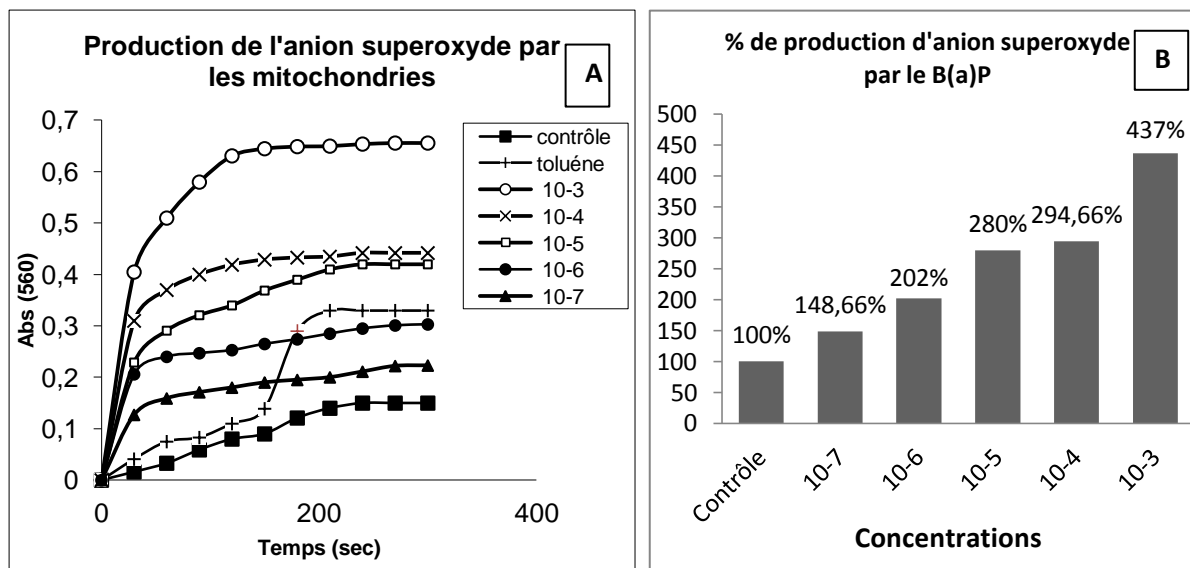


Figure 35: Production de l'anion superoxyde par les mitochondries pulmonaires en présence du B(a)P à différentes concentrations (n=3). (A) la cinétique de production pendant 300 secondes. (B) Pourcentage de production après 300 secondes.

L' $O_2^{\cdot-}$ est généré directement lors d'une réaction de la chaîne du transport d'électrons avec l' O_2 qui va subir une dismutation pour former le H_2O_2 , qui peut encore réagir pour former le OH^{\cdot} . Ainsi, il est admis que la génération mitochondriale d' $O_2^{\cdot-}$ représente la principale source intracellulaire de radicaux oxygénés produits dans des conditions physiologiques à partir de l' O_2 utilisé par la chaîne respiratoire mitochondriale, avec une estimation de 1 % à 2 % (Cadenas et Davies, 2000).

Chez les eucaryotes, les électrons fournis par le NADH et le $FADH_2$ sont transférés vers le complexe I, II et III et éventuellement au complexe IV pour réduire l'oxygène moléculaire à l'eau (Liu et al., 2002). Toutefois, jusqu'à 1 à 2% d'oxygène consommé au cours de la respiration mitochondriale est soumis à une réduction incomplète donnant de l' $O_2^{\cdot-}$ (Cadenas et Davies, 2000). La flavine dans les complexes I et II et les sites de liaison de l'ubiquinone dans les complexes I, II et III sont les sites les plus importants de la production de l' $O_2^{\cdot-}$ par les mitochondries.

La réduction de l' O_2 en $O_2^{\cdot-}$ dans le complexe I des mitochondries se fait par deux mécanismes : le premier connu sous le nom du transfert inverse d'électrons puisque ces derniers qui sont donnés par les succinates au complexe II sont inversement transférés vers le complexe I provoquant de ce fait la liaison des électrons à la quinone, ce qui permet aux électrons de fuir et réduire l'oxygène moléculaire. Ce transfert inverse est produit lorsque la force proton-motrice (PMF) est saturée associée à une faible demande d'ATP.

Le deuxième mécanisme de la production de l' $O_2^{\cdot-}$ est connu sous le nom du transfert d'électrons vers l'avant, nécessite pour donner des électrons à la molécule d'oxygène, la flavine réduite. Ce mécanisme est produit lorsque il y'aura un niveau élevé du ratio NADH / NAD⁺ avec une synthèse continue de l'ATP couplée à une faible force proton-motrice. D'autres cas peuvent mener à ce mécanisme comme l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale par l'ischémie, l'épuisement et la perte de cytochrome C ou une mutation entraînant une charge d'électrons sur la flavine et une fuite ultérieure de ces derniers pour réduire la molécule d'oxygène.

Pendant le transfert d'électrons, il est proposé que la semiquinone dans le complexe III soit capable de réduire la molécule d'oxygène pour produire l' $O_2^{\cdot-}$ par les fuites d'électrons (Murphy, 2009).

Plusieurs xénobiotiques interagissent avec la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, ce qui augmente le taux de production d' $O_2^{\cdot-}$ à travers deux différents mécanismes. Certains d'entre ces composés peuvent accepter un électron de la chaîne respiratoire et de le transférer à l'oxygène moléculaire (cycle redox), en stimulant la formation de l' $O_2^{\cdot-}$ sans inhiber la chaîne respiratoire et d'autres stimulent le stress oxydatif par blocage du transport d'électrons. Ce déséquilibre apparaît comme un déclencheur de la mort cellulaire ou du cancer (Turrens, 2003).

L'augmentation du taux de l' $O_2^{\cdot-}$ observé dans notre expérience après traitement des poumons avec le B(a)P, est en parfait accord avec plusieurs études, puisque au cours du métabolisme de l'hydrocarbure aromatique polycyclique, des espèces d'oxygène hautement réactives telles que l' $O_2^{\cdot-}$ pourraient être générées (Emre et al., 2007). Il a été rapporté que les B(a)P-quinones (BaP-1,6-quinone, -3,6-quinone, -6,12-quinone et -7,8-quinone, etc.) sont des composés importants du cycle redox, qui sont produits pendant la métabolisation du B(a)P par une oxydation d'un électron. La toxicité de ces composés peut être liée non seulement aux ROS telles que l' $O_2^{\cdot-}$ et le H_2O_2 , mais aussi à celle des radicaux semiquinones (Kim et al., 2000; Burdick et al., 2003). Rajandran et al. (2008) ont rapporté qu'il y a une augmentation du taux des ROS, y compris l' $O_2^{\cdot-}$ dans le groupe des animaux traités par le B(a)P (Rajandran et al., 2008). Ces résultats renforcent aussi ceux de Magesh et al. (2008) qui présentent une augmentation de la quantité des ROS (H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$) au niveau des poumons traités *in vitro* par le B(a)P. Ce taux élevé des ROS est la conséquence du métabolisme du B(a)P par la voie des o-quinone et d'autre côté par la production mitochondriale durant la respiration (Magesh et al., 2009). Le B(a)P subit deux oxydations successives à l'intérieur de la cellule pulmonaire

donnant naissance à un anion semiquinone (QO) et de l' H_2O_2 et à un radical B(a)P-O-quinone et de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ expliquant l'accumulation importante de ce dernier dans le tissu pulmonaire.

III.2. Effet du B(a)P sur le gonflement mitochondriale des poumons *in vitro* :

L'autre paramètre aussi intéressant que nous avons jugé utile de mesurer est : le gonflement des mitochondries. Ce gonflement peut être expliqué par la stimulation de la perméabilité membranaire des mitochondries traitées, car certains xénobiotiques sont capables d'entraîner une ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (PTPM). L'ouverture de ce pore peut être induite par la molécule elle-même ou par des métabolites réactifs (Berson, 2005). L'ouverture du mégacanal mitochondrial conduit d'abord à une perméabilisation des membranes mitochondriales à l'eau comme aux solutés inférieurs à 1500 Da. Il s'en suit un gonflement colloïdosmotique de la matrice mitochondriale avec pour conséquence une distension de la membrane mitochondriale interne (MMI). La force exercée par cette dernière ainsi étirée, provoque des points de rupture au niveau de la membrane mitochondriale externe (MME), à l'origine de la perméabilisation de la MME. La perméabilité de la MMI, est à l'origine d'altérations fonctionnelles mitochondriales telles qu'une réduction du $\Delta\Psi_m$ à l'origine d'un découplage de la chaîne respiratoire et de la production d'anions superoxydes, suivie d'une diminution de la production d'ATP, ceci provoque un changement conformationnel de Bax et sa translocation à la mitochondrie, induisant le relargage des facteurs apoptogènes comme le cytochrome c, l'AIF (De Giorgi et al., 2002).

La figure 36 illustre les changements de volumes des mitochondries en présence de concentrations croissantes du B(a)P et en fonction du temps. Nous remarquons une augmentation progressive et proportionnelle aux concentrations du B(a)P. Ces valeurs de l'absorbance traduisant ainsi une augmentation du volume des mitochondries traitées avec B(a)P par rapport aux contrôles.

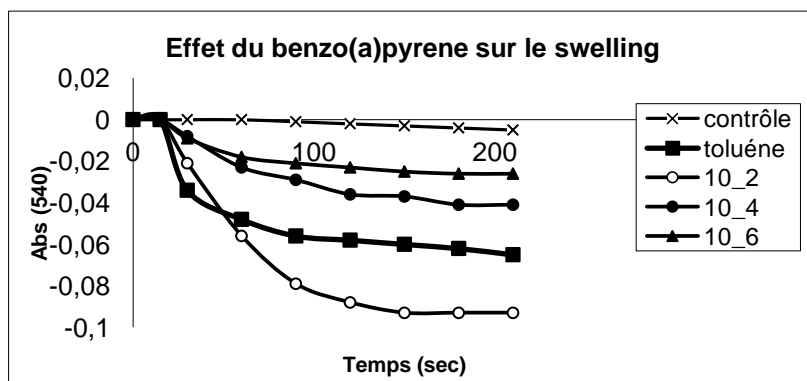


Figure 36 : Effet *in vitro* du B(a)P à différentes concentrations sur le gonflement mitochondrial pulmonaire.

Il est possible que deux types d'évènements puissent jouer un rôle important dans l'induction de l'ouverture des PTPM:

- L'oxydation et l'altération des protéines impliquées dans le PTPM par des ERO produites par la chaîne respiratoire, ou d'autres sources subcellulaires;
- La production par l'intermédiaire de cytochromes P450 d'un ou de plusieurs métabolites réactifs, capables également d'altérer de façon irréversible des protéines du PTPM (Labbe et al., 2008).

Il semble que ces deux cas surviennent avec le B(a)P qui est transformé par le cytochrome P450 en BPDE. Sang et al. (2012) ont confirmé ces données lorsqu'ils ont testé le BPDE sur les cellules de l'épithélium bronchiolaire humain (16HBE). Ils ont trouvé qu'une augmentation significative de la formation de ROS a été détectée suite à un traitement par des doses croissantes de BPDE, ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle la production de ROS peut participer à la perméabilité des mitochondries intermembranaires (Sang et al., 2012) et des taux de ROS élevés pouvant servir d'initiateur pour la transition de perméabilité et ainsi à la libération de cyt c (Chalmers et Nicholls, 2003).

Nos résultats révèlent qu'il y a un gonflement mitochondriale significatif, ces résultats sont en accord avec ceux cités par d'autres puisque qu'ils montrent que le B(a)P provoque l'apoptose durant son métabolisme qui produit des ROS responsable des dommages mitochondriaux. il induit une augmentation stable de la production d' $O_2^{\bullet-}$ et l'hyperpolarisation des mitochondries (Holme et al., 2007).

L'activation des caspases semble être nécessaire dans le gonflement mitochondriale. À cet égard, il a été rapporté que certaines caspases induisaient l'ouverture des pores lorsqu'elles étaient appliquées à des mitochondries isolées *in vitro* (Reed et al., 1998). Cette activation des caspases a été montrée dans le cas du B(a)P (Sang et al., 2012).

III.3. Effet de la propolis sur la production d'anions superoxyde et du gonflement mitochondrial *in vitro* :

La figure 37 montre qu'en présence d'une augmentation de la concentration de la propolis, la production d'anion superoxyde diminue, à la concentration de 0,1 mg/ml, l'absorbance est proche de celle du témoin. La réduction du radical $O_2^{\bullet-}$ démontré chez les mitochondries pulmonaires est d'une manière dépendante de la concentration.

La diminution de la production d'anion superoxyde après le traitement par la propolis peut être expliquée soit par un empêchement du transfert inverse d'électrons qui se produit lorsque des électrons transférés du succinate au complexe II, sont inversement transférés au complexe

I, soit par la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres puisque il a été montré que les flavonoïdes en général dont la propolis est riche, en raison de leur faible potentiel redox, sont thermodynamiquement capables de réagir avec les formes d'oxygène hautement réactives R^\bullet comme $l'O_2^{\bullet-}$, $l'OH^\bullet$, en donnant un atome d'hydrogène (Ostrowska et Skrzydlewska, 2005).

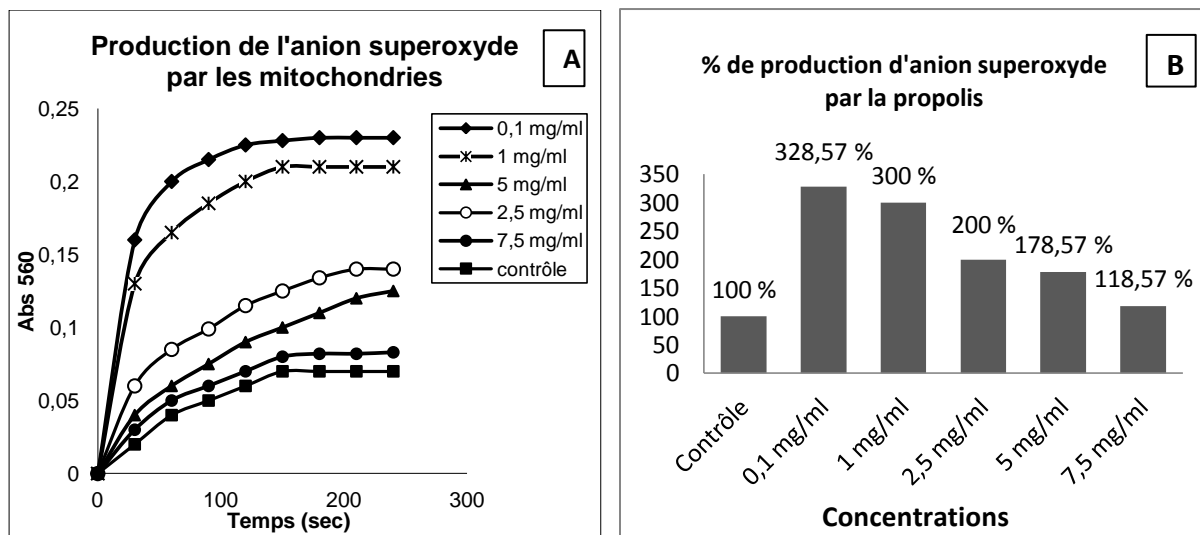


Figure 37: Production de l'anion superoxyde par les mitochondries pulmonaires en présence de l'extrait éthanolique de propolis à différentes concentrations (n=3). (A) la cinétique de production pendant 300 secondes. (B) Pourcentage de production après 300 secondes.

Considérant que la propolis pourrait diminuer les niveaux de ROS mitochondriaux, nous avons évalué ses effets sur le pore de transition de perméabilité (PTP) en utilisant le calcium comme inducteur. Les résultats de l'expérience ont été décrits sur la figure 38.

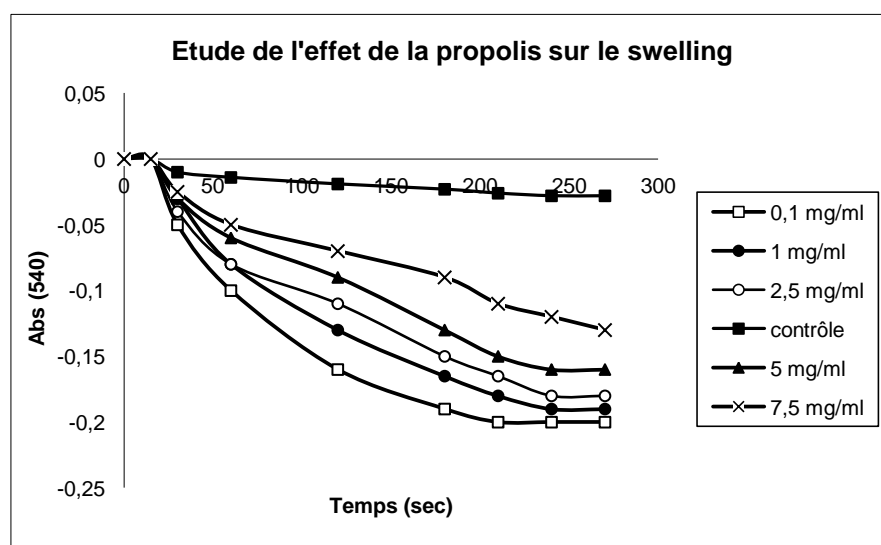


Figure 38: Effet in vitro de l'EEP à différentes concentrations sur le gonflement mitochondrial pulmonaire.

Les mitochondries de poumon de rat énergisées avec du succinate, ont été incubées pendant 1 min dans du tampon phosphate de saccharose avant l'addition d'une concentration croissante de la propolis. La diffusion de la lumière de la suspension mitochondriale a ensuite été enregistrée.

Une inhibition très efficace du gonflement a été observée lorsque nous avons ajouté une concentration accrue d'EEP en mélange avec 25 μM de calcium par rapport au témoin.

L'addition d'EEP (75, 150 et 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$) à des suspensions mitochondriales obtenues à partir du groupe de rat normal n'a pas induit de gonflement mitochondrial, alors que l'addition des concentrations 150 et 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$ à des suspensions mitochondriales obtenues à partir du groupe de rat avec carcinome hépatocellulaire (HCC) a conduit à un gonflement mitochondrial significatif dans les 60 min d'incubation. Cependant, à la concentration la plus faible (75 $\mu\text{g} / \text{ml}$), l'EEP n'augmente pas le gonflement mitochondrial (Seydi et al., 2016). Des chercheurs ont trouvé un effet paradoxal de certains antioxydants connus comme cytoprotecteurs. Ces derniers altèrent la fonction mitochondriale et particulièrement induit l'ouverture du PTP dans les mitochondries du foie. Les auteurs ont expliqués cela par la protection des mitochondries contre l'accumulation des ROS et contre la peroxydation lipidique des membranes en impliquant une interaction directe avec les protéines thiols des membranes mitochondriales qui ont supposé contrôler l'ouverture du PTP (Morin et al., 2001).

La diminution de la production d'anion superoxyde et du gonflement mitochondrial nous montre que la propolis ne modifie pas la fonctionnalité des mitochondries pulmonaires, cette découverte est en accord avec celle de nombreuses études.

III- Effet de l'EEP sur les cellules de l'adénocarcinome pulmonaire humain A549 :

L'inhibition du cancer par la propolis est jusqu'à présent la découverte la plus surprenante. À partir de la propolis, plusieurs composés se sont avérés des puissants inhibiteurs de la tumorigenèse. Parmi lesquelles on peut distinguer les flavonoïdes, les dérivés de l'acide cinnamique et certains diterpénoïdes ...etc. (Banskota et al., 2001)

Cette partie d'étude vise à montrer l'effet de notre propolis algérienne sur les cellules d'adénocarcinome bronchique humain A549 utilisés comme modèle de cancer pulmonaire. En effet, les adénocarcinomes bronchiques représentent environ 40% de l'ensemble des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) qui sont les tumeurs les plus fréquentes du poumon, très agressives et très vascularisées, présentant un très mauvais pronostic (Lehman, 2016 ; Tao et al., 2016). La thérapie standard de ces cancers pulmonaires n'augmente que très

marginale le taux de survie avec un taux de récurrence très important, associé aux nombreux effets cytotoxiques (Rivera et al., 2011).

III.1. Effet de l'EEP sur la viabilité et la prolifération cellulaire des A549:

La viabilité cellulaire et mitochondriale (autrement dit la cytotoxicité) et la prolifération des traitements par notre EEP seule ou associée au B(a)P, sur les cellules d'adénocarcinome bronchique humain A549 est déterminée en utilisant le test du MTT, test communément utilisé in vitro pour mesurer le nombre de cellules métaboliquement actives. Ce test est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) de coloration jaune en sel de formazan (coloration pourpre).

La figure 39 montre le pourcentage de viabilité de ces cellules (A549) étudiées en absence ou en présence de l'EEP à différentes concentrations (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml et 100 µg/ml) pour une durée d'incubation de 24h.

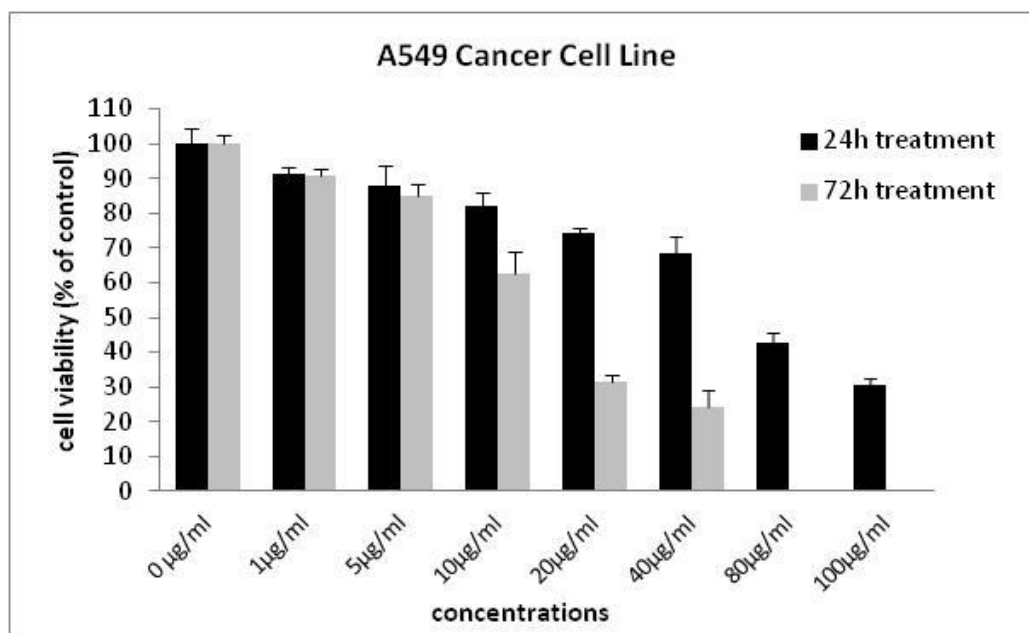


Figure 39 : Effet de différentes concentrations de l'extrait éthanolique de propolis sur la viabilité cellulaire des A549 à 24h et 72h de traitement. Les valeurs sont présentées en moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes.

Les résultats montrent que pour les faibles doses de l'EEP (de 0 µg/ml à 20 µg/ml), elle n'entraîne pas une réduction de la viabilité (réduction varie de 0 à 18%) alors qu'en augmentant la concentration la réduction est de plus en plus importante pour arriver à un pourcentage de 70% enregistré pour la concentration de 100 µg/ml, cela correspond à un

déclin très significatif dans la viabilité témoignant un endommagement des mitochondries pouvant aller à l'apoptose ou la nécrose cellulaire.

L'exposition de ces cellules à des doses croissantes de propolis avait pour résultat une toxicité dose dépendante, confortant des résultats rapportés par Frión-Herrera, 2015. Ces derniers ont montré que la propolis brésilienne peut inhiber la croissance des cellules A549 et que la toxicité exercée sur ces cellules est dose dépendante, de plus cette propolis a montré une sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales par rapport aux cellules normales.

En outre nos résultats montrent que la moyenne des trois expériences indépendantes de la concentration inhibitrice à 50% (IC50) après 24 heures de traitement était de 69,94 µg/ml. Cette valeur est inférieure à celle d'autre propolis comme celle de la Thaïlande avec une valeur de IC50 égale à 104.55 µg/ml (Khacha-ananda et al., 2013) et celle de Tunisie avec une valeur de 200 µg/ml (Kouidhi et al., 2010). Cependant, une étude sur la toxicité de la propolis sur les cellules A549 a révélé que la propolis mexicaine inhibe la prolifération de ces cellules et que la IC50 était 6,2 µM, inférieur à celle d'un médicament anticancéreux ; le 5-fluorouracile (Li et al., 2010).

Les données d'études antérieures ont montré que l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'interférence avec les voies métaboliques ont été reconnues comme les mécanismes les plus importants de l'effet antitumoral de la propolis et de ses composants (Patel, 2016). L'action antiproliférative de la propolis et de ces flavonoïdes comme la chrysin, ainsi que d'autres constituants comme le CAPE, dans la diminution de la progression tumorale a été démontré (Sawicka et al., 2012). Le CAPE inhibe la croissance des cellules A549 en utilisant des voies de stress oxydatifs couplées à des voies indépendantes de p53, en supprimant efficacement le facteur de croissance transformant TGF-β-renforçant la motilité cellulaire et la TGF-β inductrice de l'Akt (protéine kinase β) (Ozturk 2012). De plus, la naringénine (Jin et al., 2011), l'apigénine, le kaempférol et la quercétine, ont augmenté nettement l'apoptose en modulant l'expression et en renforçant l'activité apoptotique du TRAIL contre les cellules du cancer bronchique A549 qui sont résistantes à la cytotoxicité médiée par ce dernier, alors que d'autres recherches ont montré que l'effet tumoral de la propolis sur ces cellules peut être lié à son effet sur le stress oxydatif en épuisant les réserves intracellulaires en GSH et rendre de ce fait les cellules plus sensibles à l'apoptose induite par le stress oxydatif (Chen et al., 2004).

La composition ainsi que la concentration de l'extrait de propolis, ont été rapportées par Sawicka et al. (2012) comme les deux critères qui influencent l'apoptose, considérés comme le mécanisme principal pour l'activité antitumorale décrite de la propolis. En outre, plusieurs

études ont démontré que la propolis et ses composés isolés peuvent induire les voies intrinsèques (par les mitochondries et les protéines pro-apoptotiques) ou extrinsèques de l'apoptose (Sawicka et al., 2012).

Nous avons étudié l'effet de la propolis sur la prolifération des cellules pour une durée de 72h d'incubation. Les résultats mentionnés dans la figure 39 montrent que la concentration inhibitrice IC₅₀ à 72 h de notre propolis est 14,32 µg/ml. Cette dernière est inférieure à celle d'autres pays comme le Brésil et la Thaïlande avec une IC₅₀ de 69,17 et 85,05 µg/ml, respectivement (Khacha-ananda et al., 2013 ; Frión-Herrera et al., 2015).

La figure 40 montre la diminution de la viabilité des cellules A549 après incubation pendant 24h avec l'EEP à différentes concentrations (1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 80 µg/ml).

Nos résultats indiquent que l'extrait de propolis algérienne avait une toxicité plus élevée par rapport aux nombreuses propolis du monde entier sur les cellules cancéreuses du poumon, et que l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses peut être liée au contenu des composés phénoliques (flavonoïdes, acides aromatiques) qui peuvent être l'un des constituants de propolis liés à son effet antiprolifératif et cytotoxique contre les cellules A549 (Frión-Herrera et al., 2015) et dépendait donc de la géographie et de la source de la propolis qui ont affecté leur composition.

La grande variété des zones écologiques en Algérie lui ont conféré un patrimoine naturel très riche qui a influencé sur la teneur de sa propolis en composés bioactifs. La propolis jijilienne a montré une composition polyphénolique très importante selon plusieurs études, elle est trouvée très riche en flavonoïdes y compris la pinstrobine chalcone, la pinocébrine, la galangine (flavanol), la naringénine (flavanon) et la chrysin, la tectochrysin, l'apigénine, la ladaneine, la pilosine et la pectolinarigénine (flavone) (lahouel et al., 2010, Segueni et al., 2011).

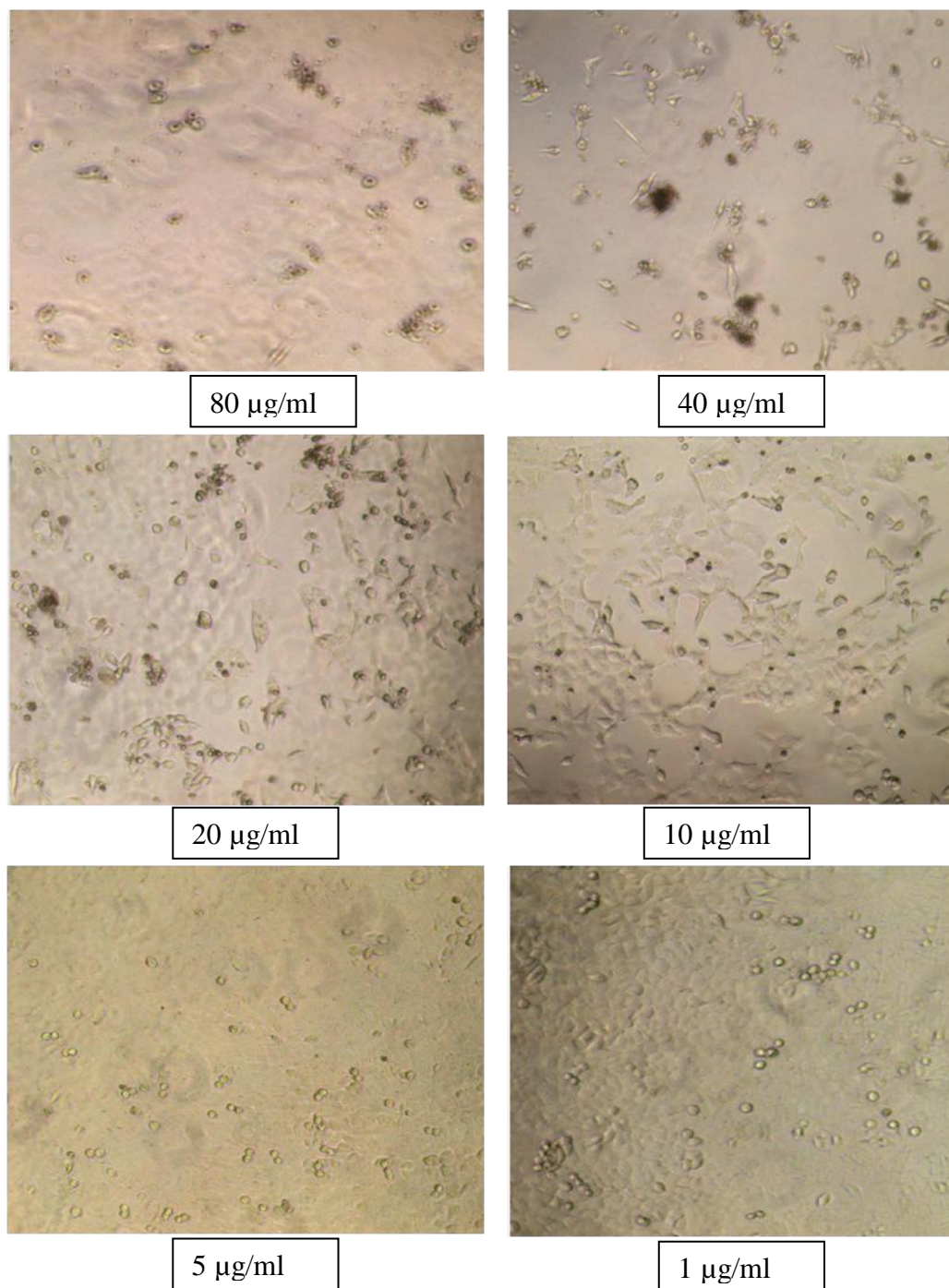


Figure 40 : Photomicrographie des cellules A549 après incubation pendant 24h avec l'extrait éthanolique de propolis à différentes concentrations (n=3).

III.2. Effet de l'EEP sur la viabilité des cellules A549 pré-incubées avec le B(a)P :

Nous avons procédé à étudier l'effet de la propolis sur la lignée cellulaire du cancer du poumon exposée au B(a)P, pour cela le test MTT a été effectué sur les cellules A549 préalablement traitées par ce carcinogène à une dose de 20 µM pendant 48h. Nous avons utilisé la cellule pulmonaire A549 puisque en ce qui concerne la génotoxicité, ces cellules ont été considérées comme un bon modèle de cellule épithéliale du poumon in vitro. La A549 est

une lignée alvéolaire et provient donc de la partie du poumon la plus exposée aux particules atmosphériques contenant des HAP (Genies et al., 2016), ainsi elle a été considérée comme un modèle cellulaire pertinent en terme de formation d'adduits d'ADN lors de l'exposition au B(a)P pur et donc pour comprendre les effets du B(a)P sur le tissu épithélial alvéolaire humain (Pei et al., 2002 ; Genies et al., 2013) et peuvent également servir de sites majeurs pour la production de métabolites toxiques ultimes qui interagissent avec d'autres cellules (Garçon et al., 2001).

La dose de 20 μ M choisie n'entraîne pas une inhibition de la viabilité de nos cellules (Wang et al., 2014). Les résultats du test ont été représentés dans la figure 41.

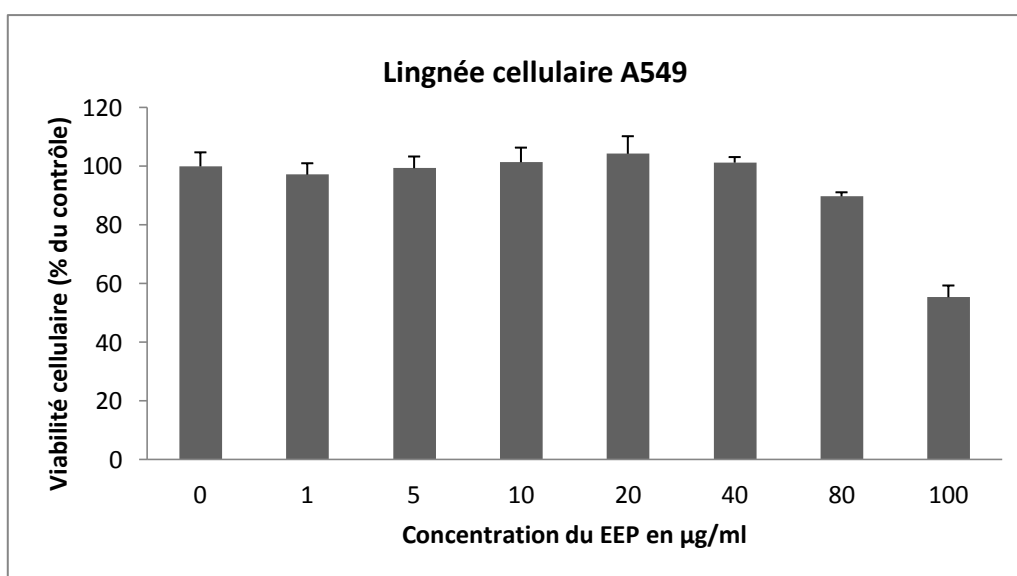


Figure 41 : Effet de l'EEP sur la viabilité de cellule A549 pré-traitées par le B(a)P.

La viabilité des cellules n'a pas été affectée par les doses croissantes de la propolis, sauf à la dose de 100 μ g/ml où le pourcentage de viabilité a été diminué pour arriver à un taux de 55,41 %. Ce dernier est plus important que celui enregistré à la même concentration de propolis mais en absence du B(a)P (30%). Sur la base de ces observations, on peut admettre que les cellules en contact avec le B(a)P sont devenues plus résistantes à l'action cytotoxique de la propolis et donc une augmentation des concentrations de cette dernière est nécessaire pour avoir l'effet antiprolifératif sur les cellules. Le B(a)P en contact avec les cellules A549 pourrait non seulement entraîner des dommages à l'ADN mais aussi entraîne des changements au niveau d'expression des gènes impliqués dans la réparation nucléotidique par excision au niveau de l'excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) et les groupes B, C, G du xeroderma pigmentosum (XPB, XPC, XPG) (Wu et al., 2002).

Une étude élaborée par Ulasli et ses collaborateurs a montré un effet anticancéreux de trois substances naturelles dont figure le CAPE sur les cellules A549 exposées au B(a)P. L'effet anti-tumoral trouvé est caractérisé principalement par une induction de l'arrêt du cycle cellulaire G2/M et l'augmentation des niveaux de p53 (Ulasli et al., 2013).

III.3. Effet de l'EEP sur l'adhésion des cellules A549 :

L'adhésion fait partie des étapes de l'angiogenèse qui est un processus essentiel de la progression du cancer puisque elle permet aux cellules malignes de se bénéficier des nutriments et de l'oxygène, favorisant donc leurs croissances (Alghisi, 2006). Le développement de nouveaux vaisseaux sanguins par l'excroissance ou le bourgeonnement de vaisseaux préexistants dans la tumeur, facilite également la formation de métastases (Rivera et al., 2011). Bien que l'adhésion de la cellule tumorale à la monocouche de cellules endothéliales soit cruciale dans le processus d'extravasation (envahissement d'autres tissus des cellules cancéreuses en circulant dans le système sanguin), cette adhésion nécessite la présence d'une superfamille des protéines d'adhérence cellulaire qui sont les intégrines. Ces derniers jouent un rôle central dans la malignité et la progression tumorale (Felding-habermann et al., 2001). En effet, les intégrines déclenchent diverses voies de signalisation dans les cellules tumorales, stimulant principalement la prolifération, la croissance, la survie et la motilité, fonctions nécessaires pour la formation des métastases. De plus, elles coopèrent avec les protéases à sérine et des métalloprotéases pour permettre l'invasion tumorale des tissus environnants et la néo-angiogenèse tumorale. Pour cette raison, les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) sont considérées comme des cibles potentielles pour les agents pharmacologiques dans le traitement des tumeurs malignes dans le but de contrôler la propagation métastatique (Akalu et al., 2005).

Nous avons évalué l'effet de la propolis sur l'adhésion cellulaire en utilisant des protéines de la MEC purifiées. Ainsi, les cellules A549 ont été traitées ou non avec des concentrations croissantes de la propolis (10, 20 et 40 µg/ml) avant d'être rajoutées dans les puits préalablement recouverts avec différentes MEC à savoir le fibrinogène (Fg), le collagène I (Coll I) et la poly-L Lysine (PL).

Les résultats obtenus montrent que notre propolis inhibe spécifiquement l'adhésion des cellules A549 sur le fibrinogène (Figure 42). Cette inhibition est dose dépendante.

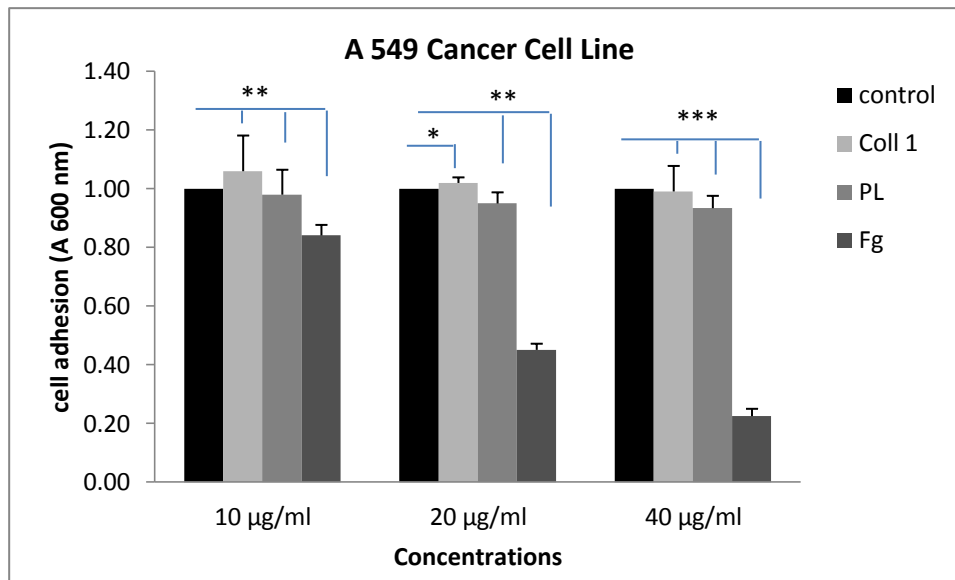


Figure 42 : Effet de l’EEP sur l’adhésion des cellules A549. Les cellules ont été pré-incubées avec différentes concentrations de propolis, puis ajoutées aux puits revêtus de 50 µg/ml de fibrinogène (Fg), 10 µg/ml de collagène I (Coll I) et 10 µg/ml de poly-L-lysine (PL). Les valeurs sont présentées en moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes. $P < 0,05$: significatif (*), $p < 0,01$: très significatif (**), $p < 0,001$: très significatif (***), NS (non significatif).

Cependant, la propolis semble ne pas affecter l’adhésion de ces cellules sur le collagène I (Coll I) ainsi aucune inhibition n’a pu être observée sur la poly-L Lysine (PL) qui est un substrat d’adhésion indépendant des intégrines. Ce qui suggère que l’effet de la propolis sur l’adhésion cellulaire pourrait impliquer des récepteurs membranaires de type intégrines. Ces derniers représentent une cible potentielle pour les agents pharmacologiques dans le traitement des tumeurs malignes tumorales dans le but de contrôler la propagation métastatique.

Notre résultat montre aussi que toutes les intégrines ne sont probablement pas affectées, car l’inhibition n’a pas été observée dans le collagène I. l’effet antiadhésif de notre propolis supporte celui de Benguedouar et al. 2016 où leurs résultats, sur un modèle de mélanome, ont montré que la galangine, l’un des flavonoïdes les plus abondants dans la même propolis jijiilienne, réduit l’expression de nombreuses intégrines qui jouent un rôle clé dans la régulation de la signalisation mitogène, de l’adhésion cellulaire et de la migration cellulaire (Benguedouar et al., 2016). Il a été aussi rapporté que l’EEP brésilienne a un effet antiangiogénique. Cet extrait réduit le nombre de vaisseaux sanguins nouvellement formés et inhibe la prolifération des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine par l’induction de l’apoptose et l’inactivation de la voie de signalisation extracellulaire des kinases (ERK 1/2 pour extracellular signal-regulated kinase 1/2) (Kunimasa et al., 2011).

La problématique de notre thèse était d'évaluer l'activité anticancéreuse, chimiopréventive et anti-inflammatoire de la propolis jijiienne sur le cancer pulmonaire induit expérimentalement par un des puissants HAP ; le B(a)P.

L'étude a été initiée par la récolte et la préparation de l'extrait éthanolique de la propolis à une dose finale de 25 mg/kg afin d'évaluer *in vivo*, son effet protecteur et antioxydant sur les rats Wistar albinos. Ces derniers ont reçu une seule injection de 200 mg/kg de B(a)P dissout dans son véhicule pendant une période de 20 semaines.

- Nous avons pu démontrer que la physiopathologie du cancer pulmonaire induit par le B(a)P est associée au stress oxydatif, par une synthèse importante de ROS conduisant à une inflammation et une transformation maline du tissu pulmonaire avec des altérations mitochondriales montrés *in vitro* sur mitochondrie isolée.
- Le stress oxydatif des cellules pulmonaires a été diminué par l'utilisation de la l'extrait éthanolique de la propolis jijiienne suite a une augmentation du taux tissulaire de la GSH et une augmentation de l'activité enzymatique de la SOD, CAT et GST ainsi qu'une diminution de la peroxydation lipidique membranaire
- Une protection mitochondriale de notre propolis par la diminution de la production importante de ROS mitochondriale principalement l' $O_2^{\bullet-}$ *in vitro* ainsi qu'une diminution du gonflement mitochondriale contrairement à celle enregistré en utilisant le B(a)P.
- La propolis induit la diminution de la prolifération cellulaire, démontré par la diminution de l'expression du Ki-67 et de l'expression de PCNA chez le rat Wistar. cette diminution est accompagnée par un effet pro-apoptotique de ce dernier traduit par une surexpression des Bax et Caspase 3 clivé ainsi qu'une diminution d'expression des NOS-3.
- Une diminution des médiateurs pro-inflammatoires à savoir NF- κ B et COX-2 a été démontrée après le traitement par notre extrait de propolis freinant ainsi l'inflammation qui joue un rôle critique dans le processus de cancérogenèse et de progression tumorale.
- L'examen microscopique des sections pulmonaires a montré une protection des alvéoles, une diminution d'infiltrations des cellules immunitaires et une protection tissulaire contre l'agression du B(a)P, renforçant de ce fait nos résultats *in vivo*

- Nos résultats confirment aussi qu'un prétraitement avec la propolis peut réduire les effets indésirables des médicaments chimiothérapeutiques sur les cellules normales sans affecter leurs efficacités. En outre, ces résultats nous donnent l'espoir que l'utilisation de la propolis et ces flavonoïdes peuvent conférer dans la prévention et la réduction des effets secondaires dus aux agents chimiothérapeutiques, et peuvent être utilisés chez les humains à l'avenir comme complément à thérapie standard contre le cancer.
- Nous avons aussi étudié l'effet de notre extrait in vitro sur les cellules cancéreuses pulmonaires humaines A549 en culture. L'extrait de propolis inhibe la survie et réduit la prolifération des cellules en culture étudiée par test MTT à une concentration inhibitrice à 50% (IC50) de 69,94 µg/ml et 14,32 µg/ml respectivement et bloque l'adhésion sur le fibrinogène.

Pour conclure, les propriétés bénéfiques de la propolis ; riche en flavonoïdes ; sur les cellules pulmonaires, qui ont été attribuées à la suppression de la prolifération, au statut antioxydant renforcé, au blocage des voies de signalisation spécifiques, à l'anti-angiogenèse, à l'effet pro-apoptotique, à l'effet anti-inflammatoire, à la protection contre les altérations mitochondriales, à l'atténuation des effets secondaires induits par les médicaments anticancéreuses et à la valorisation des chimiothérapies, permettent de suggérer son utilisation pour améliorer la santé du grand public et pour la prévention de plusieurs maladies telles que l'inflammation et le cancer.

Ces résultats prennent un intérêt majeur et ouvrent de grandes perspectives :

Dans le prolongement de cette thèse, il serait intéressant d'étudier et d'analyser d'éventuels effets de la propolis sur la dissémination métastatique du cancer pulmonaire induit par le B(a)P puisque cette dernière, cible également d'autres organes. Nous pouvons compléter nos résultats sur l'adhésion cellulaire qui constitue une étape cruciale de l'angiogenèse et d'invasion, par la vérification de l'expression au sein de la tumeur de l'un des facteurs inducteurs de l'angiogenèse tumorale tels que le VEGF, ainsi que de mettre en évidence l'expression des protéases métalloprotéinases matricielles (MMPs) impliquées dans le phénotype invasif des tumeurs.

Il est nécessaire d'appuyer davantage des résultats de notre propolis d'Algérie sur le cancer pulmonaire en profitant des avantages de la combiner avec des nouvelles thérapies tel que les molécules ciblant la mutation du gène ALK responsable de l'augmentation de la durée de vie des patients.

Enfin, pensé à une administration de la propolis par voie pulmonaire afin d'augmenter la surface d'exposition, et cela par la préparation d'aérosols de propolis micronisées (moins de 5 micromètre) suivis de testes pharmacobiochimiques dans différentes situations expérimentales *in vivo* et *in vitro*, ainsi que des études approfondies pharmacocinétiques et pharmacodynamiques pour la détermination des doses effectives extrapolables chez l'humain et de confirmer l'absence de survenue d'effets indésirables à long terme.

- Abdel-Salam, O. M. E., Youness, E. R. and Hafez., H. F. (2011) 'The antioxidant status of the plasma in patients with breast cancer undergoing chemotherapy', *Open Journal of Molecular and Integrative Physiology*, 01, pp. 29–35.
- Aggarwal, B. B. (2004) 'Nuclear factor- κ B: the enemy within', *Cancer cell*, 6, pp. 203–208.
- Ahn, J. C., Biswas, R. and Chung, P. S. (2013) 'Synergistic effect of radachlorin mediated photodynamic therapy on propolis induced apoptosis in AMC-HN-4 cell lines via caspase dependent pathway', *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10, pp. 236–243.
- Akalu, A., Cretu, A. and Brooks, P. C. (2005) 'Targeting integrins for the control of tumour angiogenesis', *Expert opinion on investigational drugs*, 14, pp. 1475–1486.
- Akyol, S., Gulec, M. A., Erdemli, H. K. and Akyol, O. (2016) 'Can propolis and caffeic acid phenethyl ester be promising agents against cyclophosphamide toxicity?', *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5, p. 105.
- Al-amoudi, W. (2015) 'Ameliorative Role and Antioxidant Effect of Propolis against Hepatotoxicity of Fenvalerate in Albino Rats', *Cytology & Histology*, 6, pp. 1–5.
- Al-ghamdi, A. A., Bayaqoob, N. I. M., Rushdi, A. I., Alattal, Y., Simoneit, B. R. T., El-mubarak, A. H. and Al-mutlaq, K. F. (2017) 'Chemical compositions and characteristics of organic compounds in propolis from Yemen', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, pp. 1094–1103.
- Al-Waili, N., Salom, K., Al-Ghamdi, A. and Ansari, M. J. (2012) 'Antibiotic, pesticide, and microbial contaminants of honey: human health hazards', *The scientific world Journal*, 2012, pp. 1–9.
- Aldahmash, B. A., El-Nagar, D. M. and Ibrahim, K. E. (2016) 'Reno-protective effects of propolis on gentamicin-induced acute renal toxicity in swiss albino mice', *Nefrología*, 36, pp. 643–652.
- Alghisi, G. C. (2006) 'Vascular Integrins in Tumor Angiogenesis : Mediators and Therapeutic Targets Curzio R uegg', *Endothelium*, 13, pp. 113–135.
- Alnemri, E. S. (1997) 'Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases', *Journal of cellular biochemistry*, 64, pp. 33–42.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D. and Trinajstić, N. (2003) 'Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids', *Croatica chemica acta*, 76, pp. 55–61.
- Anand, J. R., Rijhwani, H., Malapati, K., Kumar, P., Saikia, K. and Lakhar, M. (2013) 'Anticancer activity of esculetin via-modulation of Bcl-2 and NF- κ B expression in benzo[a]pyrene induced lung carcinogenesis in mice', *Biomedicine and Preventive Nutrition*, 3, pp. 107–112.

- Anandakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Vinodhkumar, R. and Devaki, T. (2008) 'Stabilization of pulmonary mitochondrial enzyme system by capsaicin during benzo(a)pyrene induced experimental lung cancer', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 62, pp. 390–394.
- Anbarasi, K., Sabitha, K. E. and Devi, C. S. S. (2005) 'Lactate dehydrogenase isoenzyme patterns upon chronic exposure to cigarette smoke: Protective effect of bacoside A', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20, pp. 345–350.
- Anto, R. J., Mukhopadhyay, A., Shishodia, S., Gairola, C. G. and Aggarwal, B. B. (2002) 'Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor- κ B through phosphorylation and degradation of I κ B α : correlation with induction of cyclooxygenase-2', *Carcinogenesis*, 23, pp. 1511–1518.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. and Martinou, J.-C. (2001) 'Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells', *Journal of Biological Chemistry*, 276, pp. 11615–11623.
- Aso, K., Kanno, S., Tadano, T., Satoh, S. and Ishikawa, M. (2004) 'Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, pp. 727–730.
- Ates, B., Ilker Dogru, M., Gul, M., Erdogan, A., Dogru, A. K., Yilmaz, I., Yurekli, M. and Esrefoglu, M. (2006) 'Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress', *Fundamental & clinical pharmacology*, 20, pp. 283–289.
- De Azambuja, E., Ameye, L., Diaz, M., Vandenbossche, S., Aftimos, P., Hernandez, S. B., Shih-Li, C., Delhaye, F., Focan, C., Cornez, N., Vindevoghel, A., Beauduin, M., Lemort, M., Paesmans, M., Suter, T. and Piccart-Gebhart, M. (2015) 'Cardiac assessment of early breast cancer patients 18 years after treatment with cyclophosphamide-, methotrexate-, fluorouracil- or epirubicin-based chemotherapy', *European Journal of Cancer*, 51, pp. 2517–2524.
- Balansky, R. M., D'Agostini, F. and De Flora, S. (1999) 'Induction, persistence and modulation of cytogenetic alterations in cells of smoke-exposed mice', *Carcinogenesis*, 20, pp. 1491–1498.
- Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001) 'Inflammation and cancer: back to Virchow?', *The lancet*, 357, pp. 539–545.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L. and Marcucci, M. C. (2000) 'Propolis: recent advances in chemistry and plant origin', *Apidologie*, 31, pp. 3–15.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y. and Kadota, S. (2001) 'Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis', *Phytotherapy Research*, 15, pp. 561–571.
- Bartosek, I., Guitani, A., Modica, R., Fiume, M. and Urso, R. (1984) 'Comparative kinetics of oral benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats: study with hydrocarbon mixtures', *Toxicology Letters*, 23, pp. 333–339.

- Baykara, M., Silici, S. and Bilgen, M. (2015) 'In vivo nephroprotective efficacy of propolis against contrast- induced nephropathy', *Diagnostic and Interventional Radiology*, 21, p. 317.
- Bazmandegan, G., Boroushaki, M. T., Shamsizadeh, A., Ayoobi, F., Hakimizadeh, E. and Allahtavakoli, M. (2017) 'Brown propolis attenuates cerebral ischemia-induced oxidative damage via affecting antioxidant enzyme system in mice', *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 85, pp. 503–510.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971) 'Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels', *Analytical biochemistry*, 44, pp. 276–287.
- Benguedouar, L., Lahouel, M., Gangloff, S., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P. and Antonicelli, F. (2016) 'Ethanol Extract of Algerian Propolis and Galangin Decreased Murine Melanoma T', *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16, pp. 1172–1183.
- Bensasson, R. V., Zoete, V., Jossang, A., Bodo, B., Arimondo, P. B. and Land, E. J. (2011) 'Potency of inhibition of human DNA topoisomerase α by flavones assessed through physicochemical parameters', *Free Radical Biology and Medicine*, 51, pp. 1406–1410.
- Berson, A. (2005) 'Hépatotoxicité médicamenteuse par atteinte mitochondriale', *Hépatogastro & Oncologie Digestive*, 12, pp. 191–198.
- Bhadauria, M., Nirala, S. K. and Shukla, S. (2007) 'Propolis protects CYP 2E1 enzymatic activity and oxidative stress induced by carbon tetrachloride', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 302, pp. 215–224.
- Bicker, J., Alves, G., Fortuna, A. and Falcão, A. (2014) 'Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87, pp. 409–432.
- Billiard, S. M., Hahn, M. E., Franks, D. G., Peterson, R. E., Bols, N. C. and Hodson, P. V. (2002) 'Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs)', *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133, pp. 55–68.
- Bradford, M. M. (1976) 'A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding', *Analytical biochemistry*, 72, pp. 248–254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995) 'Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity', *LWT - Food Science and Technology*, 28, pp. 25–30.
- Breckenridge, D. G. and Xue, D. (2004) 'Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by BCL-2 family proteins and caspases', *Current Opinion in Cell Biology*, 16, pp. 647–652.
- Breen, A. P. and Murphy, J. A. (1995) 'Reactions of oxyl radicals with DNA', *Free Radical Biology and Medicine*, 18, pp. 1033–1077.

- Burczynski, M. E. and Penning, T. M. (2000) 'Genotoxic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon ortho -Quinones Generated by Aldo-Keto Reductases Induce CYP1A1 via Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor 1', *Cancer Research*, pp. 908–915.
- Burdick, A. D., Ii, J. W. D., Liu, K. J., Hudson, L. G., Shi, H., Monske, M. L. and Burchiel, S. W. (2003) 'Benzo (a) pyrene Quinones Increase Cell Proliferation, Generate Reactive Oxygen Species, and Transactivate the Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Epithelial Cells', *Cancer Research*, pp. 7825–7833.
- Burdock, G. a. (1998) 'Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)', *Food and Chemical Toxicology*, 36, pp. 347–363.
- Burrows, C. J. and Muller, J. G. (1998) 'Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission', *Chemical reviews*, 98, pp. 1109–1152.
- Cadenas, E. and Davies, K. J. A. (2000) 'Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹', *Free Radical Biology and Medicine*, 29, pp. 222–230.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.-P., Ravanat, J.-L. and Sauvaigo, S. (1999) 'Hydroxyl radicals and DNA base damage', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 424, pp. 9–21.
- Cai, Y., Pan, L. and Miao, J. (2016) 'In vitro study of the effect of metabolism enzymes on benzo(a)pyrene-induced DNA damage in the scallop *Chlamys farreri*', *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, pp. 92–98.
- Campos, J. F., Santos, U. P. D., Rocha, P. D. S., Damião, M. J., Balestieri, J. B. P., Cardoso, C. A. L., Paredes-Gamero, E. J., Estevinho, L. M., Souza, K. de picoli and Santos, E. L. D. (2015) 'Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí)', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, pp. 1–11.
- Capucho, C., Sette, R., de Souza Predes, F., de Castro Monteiro, J., Pigoso, A. a., Barbieri, R., Dolder, M. A. H. and Severi-Aguiar, G. D. C. (2012) 'Green Brazilian propolis effects on sperm count and epididymis morphology and oxidative stress', *Food and Chemical Toxicology*, 50, pp. 3956–3962.
- Cardinault, N., Cayeux, M. O. and Percie Du Sert, P. (2012) 'La propolis : origine, composition et propriétés', *Phytotherapie*, 10, pp. 298–304.
- Castaldo, S. and Capasso, F. (2002) 'Propolis, an old remedy used in modern medicine', *Fitoterapia*, 73, pp. S1–S6.
- Catchpole, O., Mitchell, K., Bloor, S., Davis, P. and Suddes, A. (2015) 'Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells', *Fitoterapia*, 106, pp. 167–174.
- Challem, J. (1995) 'Medical journals document value of bee propolis, honey, and royal jelly', *The Nutrition Reporter newsletter*. Retrieved July 10, 2008. http://www.thenutritionreporter.com/bee_stuff.html.

- Chalmers, S. and Nicholls, D. G. (2003) 'The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria', *Journal of Biological Chemistry*, 278, pp. 19062–19070.
- Chanvorachote, P., Nimmannit, U., Stehlik, C., Wang, L., Jiang, B.-H., Ongpipatanakul, B. and Rojanasakul, Y. (2006) 'Nitric oxide regulates cell sensitivity to cisplatin-induced apoptosis through S-nitrosylation and inhibition of Bcl-2 ubiquitination', *Cancer research*, 66, pp. 6353–6360.
- Chatterjee, A., Dasgupta, S. and Sidransky, D. (2011) 'Mitochondrial subversion in cancer', *Cancer prevention research*, 4, pp. 638–654.
- Chen, L., Devanesan, P. D., Higginbotham, S., Ariese, F., Jankowiak, R., Small, G. J., Rogan, E. G. and Cavalieri, E. L. (1996) 'Expanded analysis of benzo [a] pyrene– DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: Their significance in tumor initiation', *Chemical research in toxicology*, 9, pp. 897–903.
- Chen, M.-F., Wu, C.-T., Chen, Y.-J., Keng, P. C. and Chen, W.-C. (2004) 'Cell killing and radiosensitization by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in lung cancer cells.', *Journal of radiation research*, 45, pp. 253–260.
- Chen, W., Wang, X., Zhuang, J., Zhang, L. and Lin, Y. (2007) 'Induction of death receptor 5 and suppression of survivin contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by quercetin in non-small cell lung cancer cells', *Carcinogenesis*, 28, pp. 2114–2121.
- Chen, Z. X. and Pervaiz, S. (2010) 'Involvement of cytochrome c oxidase subunits Va and Vb in the regulation of cancer cell metabolism by Bcl-2', *Cell death and differentiation*, 17, p. 408.
- Cheng, L., Sturgis, E. M., Eicher, S. A., Char, D., Spitz, M. R. and Wei, Q. (1999) 'Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck', *International journal of cancer*, 84, pp. 220–224.
- Cheng, T.-Y. D., Cramb, S. M., Baade, P. D., Youlten, D. R., Nwogu, C. and Reid, M. E. (2016) 'The International Epidemiology of Lung Cancer: Latest Trends, Disparities, and Tumor Characteristics', *Journal of Thoracic Oncology*, 11, pp. 1653–1671.
- Chow, L. W. C., Loo, W. T. Y., Wai, C. C. Y., Lui, E. L. H., Zhu, L. and Toi, M. (2005) 'Study of COX-2, Ki67, and p53 expression to predict effectiveness of 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide with celecoxib treatment in breast cancer patients', *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 59, pp. 298–301.
- Chu, W.-H. (2006) 'Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*)', *Fish & shellfish immunology*, 21, pp. 113–117.
- Churg, A., Wang, R. D., Tai, H., Wang, X., Xie, C. and Wright, J. L. (2004) 'Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse', *American journal of respiratory and critical care medicine*, 170, pp. 492–498.

- Cillard, J. and Cillard, P. (2006) 'Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations', *Oleagineux, corps gras, lipides*, 13, pp. 24–29.
- Cirasino, L., Pisati, A. and Fasani, F. (1987) 'Contact dermatitis from propolis', *Contact dermatitis*, 16, pp. 110–111.
- Clamon, G. (2015) 'Chemoprevention and screening for lung cancer: Changing our focus to former Smokers', *Clinical Lung Cancer*, 16, pp. 1–5.
- Conklin, K. a. (2004) 'Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness', *Integrative Cancer Therapies*, 3, pp. 294–300.
- Conklin, K. A. (2009) 'Dietary Antioxidants During Cancer Chemotherapy : Impact on Chemotherapeutic Effectiveness and Development of Side Effects', *Nutrition and Cancer*, 37, pp. 1–18.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003) 'Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease', *The FASEB Journal*, 17, pp. 1195–1214.
- Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D. and Kroemer, G. (2000) 'Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy', *Journal of the National Cancer Institute*, 92, pp. 1042–1053.
- Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M. A. and Meseguer, J. (2005) 'In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses', *Fish & Shellfish Immunology*, 18, pp. 71–80.
- Das, R. K., Banerjee, S. and Bhattacharya, S. (2007) 'Amelioration of benzo(a)pyrene-induced lung carcinogenesis in strain A mice by diphenylmethyl selenocyanate', *Experimental and Toxicologic Pathology*, 58, pp. 351–360.
- Dasgupta, S., Soudry, E., Mukhopadhyay, N., Shao, C., Yee, J., Lam, S., Lam, W., Zhang, W., Gazdar, A. F., Fisher, P. B. and Sidransky, D. (2013) 'Mitochondrial DNA Mutations in Respiratory Complex-I in Never-Smoker Lung Cancer Patients Contribute to Lung Cancer Progression and associated with EGFR gene mutation', *Journal of cellular physiology*, 227, pp. 2451–2460.
- Datta, K., Chin, A., Ahmed, T., Qing, W., Powell, K. L., Simhambhatla, P., Macleod, M. C., Stoica, G. and Kehrer, J. P. (1998) 'Mixed effects of 2 , 6-dithiopurine against cyclophosphamide mediated bladder and lung toxicity in mice', *toxicology*, 125, pp. 1–11.
- Delbridge, A. R. D., Grabow, S., Strasser, A. and Vaux, D. L. (2016) 'Thirty years of BCL-2: Translating cell death discoveries into novel cancer therapies', *Nature Reviews Cancer*, 16, pp. 99–109.
- Deponte, M. (2013) 'Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes', *Biochimica et Biophysica Acta journal*, 1830, pp. 3217–3266.

- Douki, T., Ksoury, Z., Marie, C., Favier, A., Ravanat, J. and Maitre, A. (2008) 'Genotoxicity of combined exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UVA—a mechanistic study', *Photochemistry and photobiology*, 84, pp. 1133–1140.
- El-Khawaga, O.-A. Y., Salem, T. . and Elshal, M. F. (2003) 'Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice', *Clinica Chimica Acta*, 338, pp. 11–16.
- El-naggar, S. A., Alm-eldeen, A. A., Germoush, M. O., El-, K. F. and Elgebaly, H. A. (2015) 'Ameliorative effect of propolis against cyclophosphamide-induced toxicity in mice toxicity in mice', *Pharmaceutical biology*, 53, pp. 235–241.
- Elimadi, A., Bouillot, L., Sapena, R., Tillement, J.-P. and Morin, D. (1998) 'Dose-related inversion of cinnarizine and flunarizine effects on mitochondrial permeability transition', *European journal of pharmacology*, 348, pp. 115–121.
- Ellman, G. L. (1959) 'Tissue Sulfhydryl Groups', *Archives of biochemistry and biophysics*, 82, pp. 70–77.
- Emre, M. H., Aktay, G., Polat, A. and Vardi, N. (2007) 'Effects of benzo(a)pyrene and ethanol on oxidative stress of brain, lung tissues and lung morphology in rats', *Chinese Journal of Physiology*, 50, pp. 143–148.
- Fadillioglu, E., Oztas, E., Erdogan, H., Yagmurca, M., Sogut, S., Ucar, M. and Irmak, M. K. (2004) 'Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats', *Journal of Applied Toxicology*, 24, pp. 47–52.
- Farooqui, T. and Farooqui, A. A. (2012) 'Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases', *Frontiers in Bioscience*, 4, pp. 779–793.
- Felding-habermann, B., Toole, T. E. O., Smith, J. W., Fransvea, E., Ruggeri, Z. M., Ginsberg, M. H., Hughes, P. E., Pampori, N., Shattil, S. J., Saven, A. and Mueller, B. M. (2001) 'Integrin activation controls metastasis in human breast cancer', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, pp. 1853–1858.
- Feng, H., Zhang, Z., Qing, X., Wang, X., Liang, C. and Liu, D. (2016) 'Promoter methylation of APC and RAR- β genes as prognostic markers in non-small cell lung cancer (NSCLC)', *Experimental and Molecular Pathology*, 100, pp. 109–113.
- Feng, Z., Hu, W., Chen, J. X., Pao, A., Li, H., Rom, W., Hung, M.-C. and Tang, M. (2002) 'Preferential DNA damage and poor repair determine ras gene mutational hotspot in human cancer', *Journal of the National Cancer Institute*, 94, pp. 1527–1536.
- Fentiman, I. S. (2012) 'Gamma-glutamyl transferase : risk and prognosis of cancer', *British Journal of Cancer*, 106, pp. 1467–1468.
- Foster, K. A., Oster, C. G., Mayer, M. M., Avery, M. L. and Audus, K. L. (1998) 'Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism', *Experimental cell research*, 243, pp. 359–366.

- Friõn-Herrera, Y., Díaz-García, A., Ruiz-Fuentes, J., Rodríguez-Sánchez, H. and Sforcin, J. M. (2015) 'Brazilian green propolis induced apoptosis in human lung cancer A549 cells through mitochondrial-mediated pathway', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, pp. 1448–1456.
- Fujimori, K. and Fujino, T. (2013) 'Efficient laser desorption ionization mass spectrometry of polycyclic aromatic hydrocarbons using excitation energy transfer from anthracene', *Chemical Physics*, 419, pp. 97–100.
- Gallego, M. A., Ballot, C., Kluza, J., Hajji, N., Martoriati, A., Castera, L., Cuevas, C., Formstecher, P., Joseph, B. and Kroemer, G. (2008) 'Overcoming chemoresistance of non-small cell lung carcinoma through restoration of an AIF-dependent apoptotic pathway', *Oncogene*, 27, p. 1981.
- Gao, D., Luo, Y., Guevara, D., Wang, Y., Rui, M., Goldwyn, B., Lu, Y., Smith, E. C. A., Lebwohl, M. and Wei, H. (2005) 'Benzo [a] pyrene and its metabolites combined with ultraviolet A synergistically induce 8-hydroxy-2 V -deoxyguanosine via reactive oxygen species', *Free Radical Biology and Medicine*, 39, pp. 1177–1183.
- Garçon, G., Zerimech, F., Hannotiaux, M.-H., Gosset, P., Martin, A., Marez, T. and Shirali, P. (2001) 'Antioxidant defense disruption by polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto Fe₂O₃ particles in human lung cells (A549)', *Toxicology*, 166, pp. 129–137.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. and Jore, D. (2003) 'Espèces réactives de l'oxygène', *L'actualité chimique*, p. 91.
- Garewal, H. (1995) 'Antioxidants in oral cancer prevention.', *The American journal of clinical nutrition*, 62, p. 1410S–1416S.
- Gelboin, H. V (1980) 'Benzo [alpha] pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes.', *Physiological reviews*, 60, pp. 1107–1166.
- Genies, C., Jullien, A., Lefebvre, E., Revol, M., Maitre, A. and Douki, T. (2016) 'Inhibition of the formation of benzo [a] pyrene adducts to DNA in A549 lung cells exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons', *Toxicology in Vitro*, 35, pp. 1–10.
- Genies, C., Maître, A., Lefebvre, E., Jullien, A., Chopard-Lallier, M. and Douki, T. (2013) 'The extreme variety of genotoxic response to benzo [a] pyrene in three different human cell lines from three different organs', *PLoS One*, 8, p. e78356.
- Gerger, C. J. and Weber, L. P. (2015) 'Comparison of the acute effects of benzo-a-pyrene on adult zebrafish (*Danio rerio*) cardiorespiratory function following intraperitoneal injection versus aqueous exposure', *Aquatic Toxicology*, 165, pp. 19–30.
- Ghedira, K., Goetz, P. and Le Jeune, R. (2009) 'Propolis', *Phytothérapie*, 7, pp. 100–105.
- Ghisalberti, E. L. (1979) 'Propolis: a review', *Bee world*, 60, pp. 59–84.

- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. and Parks, W. P. (1973) 'In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors', *Journal of the National Cancer Institute*, 51, pp. 1417–1423.
- Gillet, L. C. J. and Schärer, O. D. (2006) 'Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair', *Chemical reviews*, 106, pp. 253–276.
- De Giorgi, F., Lartigue, L., Bauer, M. K. A., Schubert, A., Grimm, S., Hanson, G. T., Remington, S. J., Youle, R. J. and Ichas, F. (2002) 'The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization', *The FASEB journal*, 16, pp. 607–609.
- Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O., Bankova, V. and Chinou, P. I. (2015) 'Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type?', *LWT - Food Science and Technology*, 65, pp. 261–267.
- Gu, Q., Hu, C., Chen, Q. and Xia, Y. (2013) 'Tea polyphenols prevent lung from preneoplastic lesions and effect p53 and bcl-2 gene expression in rat lung tissues', *International journal of clinical and experimental pathology*, 6, p. 1523.
- Gülçin, I. (2012) 'Antioxidant activity of food constituents: an overview', *Archives of toxicology*, 86, pp. 345–391.
- Gupta, M. P., Khanduja, K. L. and Sharma, R. R. (1988) 'Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat', *Toxicology letters*, 41, pp. 107–114.
- Güven, G. S., Güven, M., Onaran, I., Ulutin, T. and Hacıhanefioglu, S. (2006) 'Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo [alpha] pyrene in cultured human lymphocytes: Influence of glutathione S-transferase M1 genotype', *Genetics and Molecular Biology*, 29, pp. 142–147.
- Guyton, K. Z. and Kensler, T. W. (1993) 'Oxidative mechanisms in carcinogenesis', *British medical bulletin*, 49, pp. 523–544.
- Ha, S. K., Lee, P., Park, J. A., Oh, H. R., Lee, S. Y., Park, J.-H., Lee, E. H., Ryu, J. H., Lee, K. R. and Kim, S. Y. (2008) 'Apigenin inhibits the production of NO and PGE2 in microglia and inhibits neuronal cell death in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia mice model', *Neurochemistry international*, 52, pp. 878–886.
- Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974) 'Glutathione S-Transferases', *The journal of biological chemistry*, 249, pp. 7130–7139.
- Haj Mouhamed, D., Ezzaher, A., Neffati, F., Douki, W., Gaha, L. and Najjar, M. F. (2012) 'Etude d'un marqueur du stress oxydant chez les fumeurs: Le malondialdéhyde', *Immuno-Analyse et Biologie Spécialisée*, 27, pp. 153–158.
- Hakura, A., Tsutsui, Y., Sonoda, J., Kai, J., Imade, T., Shimada, M., Sugihara, Y. and Mikami, T. (1998) 'Comparison between in vivo mutagenicity and carcinogenicity in multiple organs by benzo(a) pyrene in the lacZ transgenic mouse (Mutae TM Mouse)', *Mutation research*, 398, pp. 123–130.

- Hamdi Cherif, M., Serraino, D., Mahnane, A., Laouamri, S., Zaidi, Z., Boukharouba, H., Cherka, D., Rakeb, M., Kara, L., Ayat, A., Birri, S., Virdone, S., De Paoli, P. and Bidoli, E. (2014) 'Time trends of cancer incidence in Setif, Algeria, 1986-2010: an observational study.', *BMC cancer*, 14, p. 637.
- Handique, J. G. and Baruah, J. B. (2002) 'Polyphenolic compounds : an overview', *Reactive and functional polymers*, 52, pp. 163–188.
- Hannawi, S., Haluska, B., Marwick, T. H. and Thomas, R. (2007) 'Atherosclerotic disease is increased in recent-onset rheumatoid arthritis: a critical role for inflammation', *Arthritis research & therapy*, 9, pp. 1–9.
- Harir, N., Zeggai, S. and Maalem, A. (2015) 'Epidemiological and pathological profile of lung cancer in West Algeria: About 772 cases', *Journal Africain du Cancer / African Journal of Cancer*, 7, pp. 22–26.
- Havsteen, B. H. (2002) 'The biochemistry and medical significance of the flavonoids', *Pharmacology & Therapeutics*, 96, pp. 67–202.
- Hecht, S. S. (1999) 'Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer', *Journal of the National Cancer Institute*, 91, pp. 1194–1210.
- Hecht, S. S. (2002) 'Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention', *The lancet oncology*, 3, pp. 461–469.
- Heckbert, S. R., Weiss, N. S., Hornung, S. K., Eaton, D. L. and Motulsky, A. G. (1992) 'Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking-related cancers', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 84, pp. 414–422.
- Heckman, C. A., Mehew, J. W. and Boxer, L. M. (2002) 'NF- κ B activates Bcl-2 expression in t (14; 18) lymphoma cells', *Oncogene*, 21, p. 3898.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. and Bobilya, D. J. (2002) 'Flavonoid antioxidants : chemistry , metabolism and structure-activity relationships', *The Journal of nutritional biochemistry*, 13, pp. 572–584.
- Holme, J. A., Gorria, M., Arlt, V. M., Øvrebø, S., Solhaug, A., Tekpli, X., Landvik, N. E., Huc, L., Fardel, O. and Lagadic-Gossmann, D. (2007) 'Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo [a] pyrene in F258 and Hepa1c1c7 cells', *Chemico-biological interactions*, 167, pp. 41–55.
- Horinaka, M., Yoshida, T., Shiraishi, T., Nakata, S., Wakada, M. and Sakai, T. (2006) 'The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand', *Molecular Cancer Therapeutics*, 5, pp. 945–951.
- House, S. W., Warburg, O., Burk, D. and Schade, A. L. (1956) 'On respiratory impairment in cancer cells', *Science*, 124, pp. 267–272.

- IARC (2010) 'IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans', *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 92, p. 1.
- Iggo, R., Bartek, J., Lane, D., Gatter, K. and Harris, A. L. (1990) 'Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer', *The Lancet*, 335, pp. 675–679.
- Inyang, F., Ramesh, A., Kopsombut, P., Niaz, M. S., Hood, D. B., Nyanda, A. M. and Archibong, A. E. (2003) 'Disruption of testicular steroidogenesis and epididymal function by inhaled benzo (a) pyrene', *Reproductive Toxicology*, 17, pp. 527–537.
- Iqbal, M., Sharma, S. D., Okazaki, Y., Fujisawa, M. and Okada, S. (2003) 'Dietary Supplementation of Curcumin Enhances Antioxidant and Phase II Metabolizing Enzymes in ddY Male Mice : Possible Role in Protection against Chemical Carcinogenesis and Toxicity', *Pharmacology & Toxicology*, 92, pp. 33–38.
- Izzi, V., Masuelli, L., Tresoldi, I., Sacchetti, P., Modesti, A., Galvano, F. and Bei, R. (2012) 'The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17, pp. 2396–2418.
- Jacob, J. and Grimmer, G. (1996) 'Metabolism and excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat and in human.', *Central European journal of public health*, 4, pp. 33–39.
- Jain, R. and Jain, S. K. (2012) 'Effect of Buchanania lanzan Spreng . bark extract on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5, pp. 187–191.
- Janero, D. R. (1990) 'Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury', *Free Radical Biology and Medicine*, 9, pp. 515–540.
- Jarari, A. M., Shakila, S., Alsoaeitiv, S. O., Aljarari, N. M. H., Anuradha, A and Peela, J. R. (2013) 'Serum levels of LDH and Gamma GT in Libyan Breast Cancer patients', *Indian journal of applied research*, 12, pp. 32–34.
- Jaruga, P., Zastawny, T. H., Skokowski, J., Dizdaroglu, M. and Olinski, R. (1994) 'Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer.', *FEBS letters*, 341, pp. 59–64.
- Jin, C.-Y., Park, C., Hwang, H. J., Kim, G.-Y., Choi, B. T., Kim, W.-J. and Choi, Y. H. (2011) 'Naringenin up-regulates the expression of death receptor 5 and enhances TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer A549 cells.', *Molecular nutrition & food research*, 55, pp. 300–309.
- Johnston, A. J., Hoogenraad, J., Dougan, D. A., Truscott, K. N., Yano, M., Mori, M., Hoogenraad, N. J. and Ryan, M. T. (2002) 'Insertion and assembly of human Tom7 into the preprotein translocase complex of the outer mitochondrial membrane', *Journal of Biological Chemistry*, 277, pp. 42197–42204.

- Joseph, B., Ekedahl, J., Lewensohn, R., Marchetti, P., Formstecher, P. and Zhivotovsky, B. (2001) 'Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma', *Oncogen*, 20, pp. 2877–2888.
- Juhasz, A. L. and Naidu, R. (2000) 'Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene', *International biodeterioration & biodegradation*, 45, pp. 57–88.
- Kamaraj, S., Anandakumar, P., Jagan, S., Ramakrishnan, G. and Devaki, T. (2010) 'Modulatory effect of hesperidin on benzo (a) pyrene induced experimental lung carcinogenesis with reference to COX-2 , MMP-2 and MMP-9', *European Journal of Pharmacology*, 649, pp. 320–327.
- Kamaraj, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Jagan, S. and Devaki, T. (2009) 'Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice', *Investigational New Drugs*, 27, pp. 214–222.
- Kamaraj, S., Vinodhkumar, R., Anandakumar, P., Jagan, S., Ramakrishnan, G. and Devaki, T. (2007) 'The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a)pyrene.', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30, pp. 2268–2273.
- Kao, J., Patterson, F. K. and Hall, J. (1985) 'Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo [a] pyrene and testosterone', *Toxicology and applied pharmacology*, 81, pp. 502–516.
- Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L. and Dostálek, P. (2015) 'Biotransformations and biological activities of hop flavonoids', *Biotechnology Advances*, 33, pp. 1063–1090.
- Kart, A., Cigremis, Y., Karaman, M. and Ozen, H. (2010) 'Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit', *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62, pp. 45–52.
- Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Madhana, R. M., Dahiay, V., Budhani, M. K., Mallugari, R. R., Maramreddy, S. and Gogoi, R. (2016) 'Chemopreventive effect of chrysin , a dietary flavone against benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice', *Pharmacological Reports*, 68, pp. 310–318.
- Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Sriram, C. S. and Gogoi, R. (2015) 'Benzo(a)pyrene induced lung cancer: Role of dietary phytochemicals in chemoprevention.', *Pharmacological reports : PR*, 67, pp. 996–1009.
- Kaynar, H., Meral, M., Turhan, H., Keles, M., Celik, G. and Akcay, F. (2005) 'Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu–Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer', *Cancer letters*. Elsevier, 227(2), pp. 133–139.

- Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C. H., Greenberg, A. and Rothman, N. (2001) 'Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study', *Food and Chemical Toxicology*, 39, pp. 423–436.
- Kim, G. Y., Lim, S.-J. and Kim, Y. W. (2011) 'Expression of HuR, COX-2, and survivin in lung cancers; cytoplasmic HuR stabilizes cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinomas', *Modern Pathology*, 24, pp. 1336–1347.
- Kim, H. S., Kwack, S. J. and Lee, B. M. (2000) 'Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene.', *Chemico-biological interactions*, 127, pp. 139–150.
- Kim, K. B. and Lee, B. M. (1997) 'Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene.', *Cancer letters*, 113, pp. 205–212.
- Kim, P. M., Deboni, U. and Wells, P. G. (1997) 'Peroxidase-dependent bioactivation and oxidation of DNA and protein in benzo[A]pyrene-initiated micronucleus formation', *Free Radical Biology and Medicine*, 23, pp. 579–596.
- Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., Salih, B. and Selmanoğlu, G. (2002) 'Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats', *Food Chemistry*, 78, pp. 213–217.
- Kouidhi, B., Zmantar, T. and Bakhrouf, A. (2010) 'Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation', *Anaerobe*, 16, pp. 566–571.
- Kuhnle, G., Spencer, J. P. E., Schroeter, H., Shenoy, B., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Rice-Evans, C. and Hahn, U. (2000) 'Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine', *Biochemical and biophysical research communications*, 277, pp. 507–512.
- Kunimasa, K., Ahn, M., Kobayashi, T., Eguchi, R., Kumazawa, S., Fujimori, Y., Nakano, T., Nakayama, T., Kaji, K. and Ohta, T. (2011) 'Brazilian Propolis Suppresses Angiogenesis by Inducing Apoptosis in Tube-Forming Endothelial Cells through Inactivation of Survival Signal ERK 1/2', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, pp. 1–8.
- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M. and Swierczek-Zieba, G. (2014) 'Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis', *Molecules*, 19, pp. 78–101.
- Labbe, G., Pessayre, D. and Fromenty, B. (2008) 'Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies', *Fundamental & clinical pharmacology*, 22, pp. 335–353.
- Lahouel, M., Boutabet, K., Kebsa, W. and Alyane, M. (2010) 'Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4, pp. 712–720.

- Lamberti, M., Porto, S., Marra, M., Zappavigna, S., Grimaldi, A., Feola, D., Pesce, D., Naviglio, S., Spina, A., Sannolo, N. and Caraglia, M. (2012) '5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress', *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31, pp. 1–8.
- Larsen, E., Kwon, K., Coin, F., Egly, J.-M. and Klungland, A. (2004) 'Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA', *DNA repair*, 3, pp. 1457–1468.
- Lebeau, B., Chouaid, C., Baud, M., Masanès, M. J. and Febvre, M. (2010) 'Oral second- and third-line lomustine-etoposide-cyclophosphamide chemotherapy for small cell lung cancer', *Lung Cancer*, 67, pp. 188–193.
- Lehman, M. (2016) 'Improving Therapeutic Outcomes in Non-small Cell Lung Cancer not Suitable for Curative Intent Therapy — A Review of the Role of Radiation Therapy in an Era of Increasing Systemic Therapy Options', *Clinical Oncology*, 28, pp. 327–333.
- Levin, W., Wood, A. W., Chang, R. L., Slaga, T. J., Yagi, H., Jerina, D. M. and Conney, A. H. (1977) 'Marked differences in the tumor-initiating activity of optically pure (+)-and (-)-trans-7, 8-dihydroxy-7, 8-dihydrobenzo (a) pyrene on mouse skin', *Cancer research*, 37, pp. 2721–2725.
- Levine, R. L. (2002) 'Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease', *Free Radical Biology and Medicine*, 32, pp. 790–796.
- Leyva-lópez, N., Gutierrez-grijalva, E. P., Ambriz-perez, D. L. and Heredia, J. B. (2016) 'Flavonoids as Cytokine Modulators : A Possible Therapy for Inflammation-Related Diseases', *International journal of molecular sciences*, 17, pp. 1–15.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y. and Kadota, S. (2010) 'Cytotoxicity of constituents from Mexican propolis against a panel of six different cancer cell lines', *Natural product communications*, 5, pp. 1601–1606.
- Li, Q., Hu, K., Tang, S., Xu, L. and Luo, Y. (2016) 'Anti-tumor activity of tanshinone IIA in combined with cyclophosphamide against Lewis mice with lung cancer', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9, pp. 1084–1088.
- Li, X., Wang, J.-N., Huang, J.-M., Xiong, X.-K., Chen, M.-F., Ong, C.-N., Shen, H.-M. and Yang, X.-F. (2011) 'Chrysin promotes tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis in human cancer cell lines', *Toxicology in vitro*, 25, pp. 630–635.
- Likhachev, a. J., Beniashvili, S. D., Bykov, V. J., Dikun, P. P., Tyndyk, M. L., Savochkina, I. V., Yermilov, V. B. and Zabezhinski, M. a. (1992) 'Biomarkers for individual susceptibility to carcinogenic agents: Excretion and carcinogenic risk of benzo[a]pyrene metabolites', *Environmental Health Perspectives*, 98, pp. 211–214.

- Lipshultz, S. E., Adams, M. J., Colan, S. D., Constine, L. S., Herman, E. H., Hsu, D. T., Hudson, M. M., Kremer, L. C., Landy, D. C. and Miller, T. L. (2013) 'Long-term cardiovascular toxicity in children, adolescents, and young adults who receive cancer therapy: pathophysiology, course, monitoring, management, prevention, and research directions: a scientific statement from the American Heart Association', *Circulation*, 128, pp. 1927–1995.
- Liu, Y., Fiskum, G. and Schubert, D. (2002) 'Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain', *Journal of neurochemistry*, 80, pp. 780–787.
- Lo, Y. L. and Wang, W. (2013) 'Formononetin potentiates epirubicin-induced apoptosis via ROS production in HeLa cells in vitro', *Chemico-Biological Interactions*, 205, pp. 188–197.
- Lopes, A. A., Ferreira, T. S., Nesi, R. T., Lanzetti, M., Pires, K. M. P., Silva, A. M., Borges, R. M., Silva, A. J. R., Valença, S. S. and Porto, L. C. (2013) 'Bioorganic & Medicinal Chemistry Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21, pp. 7570–7577.
- Lotfy, M. (2006) 'Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7, pp. 22–31.
- Luanpitpong, S., Chanvorachote, P., Stehlik, C., Tse, W., Callery, P. S., Wang, L. and Rojanasakul, Y. (2013) 'Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells', *Molecular biology of the cell*, 24, pp. 858–869.
- Luanpitpong, S., Nimmannit, U., Chanvorachote, P., Leonard, S. S., Pongrakhananon, V., Wang, L. and Rojanasakul, Y. (2011) 'Hydroxyl radical mediates cisplatin-induced apoptosis in human hair follicle dermal papilla cells and keratinocytes through Bcl-2-dependent mechanism', *Apoptosis*, 16, pp. 769–782.
- Ludeman, S. M. (1999) 'The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide', *Current pharmaceutical design*, 5, pp. 627–644.
- Ma, J.-Q., Liu, C.-M., Qin, Z.-H., Jiang, J.-H. and Sun, Y.-Z. (2011) 'Ganoderma applanatum terpenes protect mouse liver against benzo (α) pyren-induced oxidative stress and inflammation', *Environmental toxicology and pharmacology*, 31, pp. 460–468.
- Magesh, V., DurgaBhavani, K., Senthilnathan, P., Rajendran, P. and Sakthisekaran, D. (2009) 'In vivo protective effect of crocetin on benzo (a) pyrene-induced lung cancer in Swiss albino mice', *Phytotherapy research*, 23, pp. 533–539.
- Makashvili, Z. A. (1978) 'From the history of propolis. composition, biological properties and the In Remarkable hive product: Propolis. Scientific data therapeutic activity', *Apidologie*, 26, pp. 83–99.
- Mallika, V., Goswami, B. and Rajappa, M. (2007) 'Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective', *Angiology*, 58, pp. 513–522.
- Manchester, D. K. and Jacoby, E. H. (1982) 'Glutathione S-transferase activities in placentas from smoking and non-smoking women', *Xenobiotica*, 12, pp. 543–547.

- Manna, S., Mukherjee, S., Roy, A., Das, S. and Panda, C. K. (2009) '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', *The Journal of nutritional biochemistry*, 20, pp. 337–349.
- Marcucci, M. (1995) 'Propolis : chemical composition , biological properties and therapeutic activity', *Apidologie*, 26, pp. 83–99.
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., Custódio, A. R., Ferreira, M. M. C., Bankova, V. S., García-Viguera, C. and Bretz, W. A. (2000) 'Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55, pp. 76–81.
- Marie, C., Bouchard, M., Heredia-Ortiz, R., Viau, C. and Maître, A. (2010) 'A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats', *Journal of Applied Toxicology*, 30, pp. 402–410.
- Marnett, L. J. (2000) 'Oxyradicals and DNA damage', *carcinogenesis*, 21, pp. 361–370.
- Martin, B., Paesmans, M., Mascaux, C., Berghmans, T., Lothaire, P., Meert, A., Lafitte, J. and Sculier, J. (2004) 'Ki-67 expression and patients survival in lung cancer : systematic review of the literature with meta-analysis', *British Journal of Cancer*, 91, pp. 2018–2025.
- Masri, F. A., Comhair, S. A. A., Koeck, T., Xu, W., Janocha, A., Ghosh, S., Dweik, R. A., Golish, J., Kinter, M., Stuehr, D. J., Erzurum, S. C. and Aulak, K. S. (2005) 'Abnormalities in Nitric Oxide and Its Derivatives in Lung Cancer', *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172, pp. 597–605.
- McIlwain, D. R., Berger, T. and Mak, T. W. (2013) 'Caspase functions in cell death and disease', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5, p. a008656.
- Meister, A. (1995) 'Glutathione metabolism', *Methods in enzymology*, 251, pp. 3–7.
- Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J. and Huang, G. (2013) 'Lactate Dehydrogenase A in Cancer : A Promising Target for Diagnosis and Therapy', *International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB life)*, 65, pp. 904–910.
- Miller, K. P. and Ramos, K. S. (2001) 'Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons', *Drug Metabolism Reviews*, 33, pp. 1–35.
- Min, L., He, S., Chen, Q., Peng, F., Peng, H. and Xie, M. (2011) 'Comparative proteomic analysis of cellular response of human airway epithelial cells (A549) to benzo(a)pyrene', *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21, pp. 374–382.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L. (2004) 'Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity', *Pharmacological reviews*, 56, pp. 185–229.
- Modica, R., Fiume, M., Guitani, A. and Bartosek, I. (1983) 'Comparative kinetics of benz (a) anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration: I. Study with single compounds', *Toxicology letters*, 18, pp. 103–109.

- Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N. and Ostad, S. N. (2007) 'Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis', *Food chemistry*, 103, pp. 1097–1103.
- Montillet, J.-L., Chamnongpol, S., Rustérucci, C., Dat, J., Van De Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inzé, D., Van Breusegem, F. and Triantaphylidès, C. (2005) 'Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves', *Plant physiology*, 138, pp. 1516–1526.
- Morin, D., Barthélémy, S., Zini, R., Labidalle, S. and Tillement, J. P. (2001) 'Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation', *FEBS Letters*, 495, pp. 131–136.
- Moron, M. S., Depierre, J. W. and Mannervik, B. (1979) 'Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 582, pp. 67–78.
- Mosmann, T. (1983) 'Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays', *Journal of Immunological Methods*, 65, pp. 55–63.
- Mouhoubi-tafinine, Z., Ouchemoukh, S. and Tamendjari, A. (2016) 'Antioxydant activity of some algerian honey and propolis', *Industrial Crops & Products*, 88, pp. 85–90.
- Murphy, M. P. (2009) 'How mitochondria produce reactive oxygen species', *Biochemical Journal*, 417, pp. 1–13.
- Murtaza, G., Sajjad, A., Mehmood, Z., Shah, S. H. and Siddiqi, A. R. (2015) 'Possible molecular targets for therapeutic applications of caffeic acid phenethyl ester in inflammation and cancer', *journal of food and drug analysis*, 23, pp. 11–18.
- Nagai, T., Nagashima, T., Myoda, T. and Inoue, R. (2004) 'Preparation and functional properties of extracts from bee bread', *Molecular Nutrition & Food Research*, 48, pp. 226–229.
- Natarajan, K., Singh, S., Burke, T. R., Grunberger, D. and Aggarwal, B. B. (1996) 'Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, pp. 9090–9095.
- Nebert, D. W., Roe, A. L., Dieter, M. Z., Solis, W. A., Yang, Y. I. and Dalton, T. P. (2000) 'Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis', *Biochemical pharmacology*, 59, pp. 65–85.
- Nedji, N. and Loucif-ayad, W. (2014) 'Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition', *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, pp. 433–437.
- Ngo., E. O. and Nutter, L. M. (1994) 'Status of glutathione and glutathione-metabolizing enzymes in menadione-resistant human cancer cells', *Biochemical pharmacology*, 47, pp. 421–424.

- Nguyen, T. T. T., Tran, E., Nguyen, T. H., Do, P. T. and Huynh, T. H. (2004) 'The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells', *Carcinogenesis*, 25, pp. 647–659.
- Nguyen, V. N. and Mir, P. (2000) 'Expression of cyclin D1 , Ki-67 and PCNA in non- small cell lung cancer : prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2', *Acta cirurgica brasileira*, 102, pp. 323–338.
- Nie, W., Ge, H., Yang, X., Sun, X., Huang, H., Tao, X., Chen, W. and Li, B. (2016) 'LncRNA- UCA1 exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer by targeting miR-193a-3p', *Cancer Letters*, 371, pp. 99–106.
- Niki, E. (2009) 'Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects', *Free Radical Biology and Medicine*, 47, pp. 469–484.
- Ogata, S., Ozeki, Y., Nakanishi, K., Fujita, Y., Tanaka, F., Hasegawa, S., Mio, T., Wada, H., Hiroi, S., Tominaga, S., Aida, S., Takeuchi, K. and Kawai, T. (2011) 'A pilot study of mRNA expressions of 5-fluorouracil pathway genes in peripheral blood mononuclear cells and tumor tissues in patients with lung adenocarcinoma', *Lung Cancer*, 71, pp. 199–204.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. (1979) 'Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues Thiobarbituric Acid Reaction', *Analytical biochemistry*, 95, pp. 351–358.
- Ohshima, H., Tazawa, H., Sylla, B. S. and Sawa, T. (2005) 'Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 591, pp. 110–122.
- Oka, S., Uramoto, H., Shimokawa, H., Iwanami, T. and Tanaka, F. (2011) 'The Expression of Ki-67 , but Not Proliferating Cell Nuclear Antigen , Predicts Poor Disease Free Survival in Patients with Adenocarcinoma of the Lung', *anticancer research*, 4282, pp. 4277–4282.
- Olsen, J. H., Friis, S., Poulsen, A. H., Fryzek, J., Harving, H., Tjønneland, A., Sørensen, H. T. and Blot, W. (2008) 'Use of NSAIDs, smoking and lung cancer risk', *British journal of cancer*, 98, p. 232.
- Orsi, R. O., Sforcin, J. M., Funari, S. R. C. and Gomes, J. C. (2005) 'Effect of propolis extract on guinea pig lung mast cell orsi', *journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 11, pp. 76–83.
- Oršolić N, Car N, Lisičić D, Benković V, Knežević AH, Đ. D. and Petrik, J. (2013) 'Synergism between propolis and hyperthermal intraperitoneal chemotherapy with cisplatin on Ehrlich ascites tumor in mice', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102, pp. 4395–4405.
- Oršolić, N., Benković, V., Lisičić, D., Đikić, D., Erhardt, J. and Knežević, A. H. (2010) 'Protective effects of propolis and related polyphenolic/flavonoid compounds against toxicity induced by irinotecan', *Medical Oncology*, 27, pp. 1346–1358.
- Ostrowska, J. and Skrzydlewska, E. (2005) 'The biological activity of flavonoids', *Postępy Fitoterapii*, 3, pp. 71–79.

- Ozturk, G., Ginis, Z., Akyol, S., Erden, G., Gurel, A. and Akyol, O. (2012) 'The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers', *European review for medical and pharmacological sciences*, 16, pp. 2064–2068.
- Padmavathi, R., Senthilnathan, P., Chodon, D. and Sakthisekaran, D. (2006) 'Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats', *Life Sciences*, 78, pp. 2820–2825.
- Pahl, H. L. (1999) 'Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors', *Oncogene*, 18, p. 6853.
- Patel, S. (2016) 'Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents', *Journal of Dietary Supplements*, 13, pp. 245–268.
- Paul, S., Bhattacharyya, S. S., Samaddar, A., Boujedaini, N. and Khuda-Bukhsh, A. R. (2011) 'Anticancer potentials of root extract of *Polygala senega* against benzo [a] pyrene-induced lung cancer in mice', *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 9, pp. 320–327.
- Pei, X.-H., Nakanishi, Y., Inoue, H., Takayama, K., Bai, F. and Hara, N. (2002) 'Polycyclic aromatic hydrocarbons induce IL-8 expression through nuclear factor κ B activation in A549 cell line', *Cytokine*, 19, pp. 236–241.
- Pelkonen, O. and Nebert, D. W. (1982) 'Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis.', *Pharmacological reviews*, 34, pp. 189–222.
- Penning, T. M., Burczynski, M. E., Hung, C.-F., McCoull, K. D., Palackal, N. T. and Tsuruda, L. S. (1999) 'Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones', *Chemical research in toxicology*, 12, pp. 1–18.
- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S. and Vianello, A. (2013) 'Plant flavonoids—biosynthesis, transport and involvement in stress responses', *International journal of molecular sciences*, 14, pp. 14950–14973.
- Petruzzelli, S., Camus, A.-M., Carrozzi, L., Ghelarducci, L., Rindi, M., Menconi, G., Angeletti, C. A., Ahotupa, M., Hietanen, E. and Aitio, A. (1988) 'Long-lasting effects of tobacco smoking on pulmonary drug-metabolizing enzymes: a case-control study on lung cancer patients', *Cancer research*, 48, pp. 4695–4700.
- Pezzella, F., Turley, H., Kuzu, I., Tungekar, M. F., Dunnill, M. S., Pierce, C. B., Harris, A., Gatter, K. C. and Mason, D. Y. (1993) 'bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma', *New England Journal of Medicine*, 329, pp. 690–694.
- Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S. and Hainaut, P. (2002) 'Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers', *Oncogene*, 21, p. 7435.

- Piccinelli, A. L., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R. P. and Rastrelli, L. (2013) 'Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian Propolis', *Journal of Agricultural and Food Chemistry* two, 61, pp. 5080–5088.
- Pietta, P.-G. (2000) 'Flavonoids as antioxidants', *Journal of natural products*, 63, pp. 1035–1042.
- Powers, S. K. and Jackson, M. J. (2008) 'Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production', *Physiological reviews*, 88, pp. 1243–1276.
- Premratanachai, P. and Chanchao, C. (2014) 'Review of the anticancer activities of bee products', *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, pp. 337–344.
- Qiao, J., Gu, C., Shang, W., Du, J., Yin, W., Zhu, M., Wang, W., Han, M. and Lu, W. (2011) 'Effect of green tea on pharmacokinetics of 5-fluorouracil in rats and pharmacodynamics in human cell lines in vitro', *Food and Chemical Toxicology*, 49, pp. 1410–1415.
- Rahman, I. and Macnee, W. (1999) 'Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease', *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 277, pp. 1067–1088.
- Rashid, S., Ali, N., Nafees, S., Ahmad, S. T., Hasan, S. K. and Sultana, S. (2013) 'Abrogation of 5-fluorouracil induced renal toxicity by bee propolis via targeting oxidative stress and inflammation in Wistar rats', *Journal of Pharmacy Research*, 7, pp. 189–194.
- Rashid, S. and Sultana, S. (2015) 'Modulation of chemically induced renal carcinogenesis by Chrysin via inhibition of oxidative stress, hyper-proliferation and inflammation at preclinical stage', *Journal for immunotherapy of cancer*, 3, p. P69.
- Ravichandran, N., Suresh, G., Ramesh, B. and Siva, G. V. (2011) 'Fisetin, a novel flavonol attenuates benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice', *Food and Chemical Toxicology*, 49, pp. 1141–1147.
- Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M. and Matsuyama, S. (1998) 'Bcl-2 family proteins and mitochondria.', *Biochimica et biophysica acta*, 1366, pp. 127–137.
- Reznick, A. Z., Cross, C. E., Hu, M.-L., Suzuki, Y. J., Khwaja, S., Safadi, A., Motchnik, P. A., Packer, L. and Halliwell, B. (1992) 'Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation', *Biochemical Journal*, 286, pp. 607–611.
- Rivera, S., Rivera, C., Loriot, Y., Hennequin, C., Vozenin, M. C. and Deutsch, É. (2011) 'Cellules souches cancéreuses: Nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des cancers bronchopulmonaires', *Cancer/Radiothérapie*, 15, pp. 355–364.
- Rodin, D., Grover, S., Xu, M. J., Hanna, T. P., Olson, R., Schreiner, L. J., Munshi, A., Mornex, F., Palma, D. and Gaspar, L. E. (2016) 'Radiotherapeutic Management of Non–Small Cell Lung Cancer in the Minimal Resource Setting', *Journal of Thoracic Oncology*, 11, pp. 21–29.

- Rogot, E. and Murray, J. L. (1980) 'Smoking and causes of death among U.S. veterans: 16 years of observation', *Public health reports*, 95, pp. 213–222.
- Romero, D. L., Mounho, B. J., Lauer, F. T., Born, J. L. and Burchiel, S. W. (1997) 'Depletion of glutathione by benzo (a) pyrene metabolites, ionomycin, thapsigargin, and phorbol myristate in human peripheral blood mononuclear cells', *Toxicology and applied pharmacology*, 144, pp. 62–69.
- Ross, J. A., Nelson, G. B., Wilson, K. H., Rabinowitz, J. R., Galati, A., Stoner, G. D., Nesnow, S. and Mass, M. J. (1995) 'Adenomas induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mouse lung correlate with time-integrated DNA adduct levels', *Cancer research*, 55, pp. 1039–1044.
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T. and Fernie, A. R. (2013) 'The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: structural and genetic diversity', *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, pp. 21–34.
- Samir, M. and Kholy, N. M. E. L. (1999) 'Thiobarbituric acid reactive substances in patients with laryngeal cancer', *Clinical Otolaryngology*, 24, pp. 232–234.
- Sampietro, D. A., Vattuone, M. M. S. and Vattuone, M. A. (2016) 'Immunomodulatory activity of Apis mellifera propolis from the North of Argentina', *LWT-Food Science and Technology*, 70, pp. 9–15.
- Sandler, A. B. and Dubinett, S. M. (2004) 'COX-2 inhibition and lung cancer', in *Seminars in oncology*, pp. 45–52.
- Sang, H., Zhang, L. and Li, J. (2012) 'Anti-benzopyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induces apoptosis via mitochondrial pathway in human bronchiolar epithelium cells independent of the mitochondria permeability transition pore.', *Food and chemical toxicology*, 50, pp. 2417–23.
- dos Santos, H. S. and de Souza Cruz, W. M. (2001) 'Aterapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico', *Revista Brasileira de Cancerologia*, 47, pp. 303–308.
- Sawicka, D., Car, H., Borawska, M. H. and Nikliński, J. (2012) 'The anticancer activity of propolis', *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 50, pp. 25–37.
- Segueni, N., Magid, A. A., Decarme, M., Rhouati, S. and Lahouel, M. (2011) 'Inhibition of Stromelysin-1 by Caffeic Acid Derivatives from a Propolis Sample from Algeria', *Planta Medica*, 77, pp. 999–1004.
- Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M. and Rhouati, S. (2016) 'Flavonoids from Algerian propolis', *Arabian Journal of Chemistry*, 9, pp. S425–S428.
- Selamoglu, Z. S., Ozdemir, I., Ciftci, O., Gulhan, M. F. and Savci, A. (2015) 'Antioxidant effect of ethanolic extract of propolis in liver of L-name treated rats', *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 24, pp. 227–232.

- Selvakumar, E., Prahalathan, C., Mythili, Y. and Varalakshmi, P. (2005) 'Mitigation of oxidative stress in cyclophosphamide-challenged hepatic tissue by DL- α -lipoic acid', *Molecular and cellular biochemistry*, 272, pp. 179–185.
- Selvendiran, K., Senthilnathan, P., Magesh, V. and Sakthisekaran, D. (2004) 'Modulatory effect of Piperine on mitochondrial antioxidant system in Benzo (a) pyrene-induced experimental lung carcinogenesis', *Phytomedicine*, 11, pp. 85–89.
- Sen, R. and Baltimore, D. (1986) 'Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences', *cell*, 46, pp. 705–716.
- Seon, Y., Park, E., Min, G., Sue, Y., Kim, M. and Jin, C. (2002) 'Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity', *Journal of Ethnopharmacology*, 80, pp. 155–161.
- Seydi, E., Hosseini, S. A., Salimi, A. and Pourahmad, J. (2016) 'Propolis induce cytotoxicity on cancerous hepatocytes isolated from rat model of hepatocellular carcinoma: Involvement of ROS-mediated mitochondrial targeting', *PharmaNutrition*, 4, pp. 143–150.
- Sforcin, J. M. and Bankova, V. (2011) 'Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?', *Journal of Ethnopharmacology*, 133, pp. 253–260.
- Shen, S., Chen, Y., Hsu, F. and Lee, W. (2003) 'Differential apoptosis-inducing effect of quercetin and its glycosides in human promyeloleukemic HL-60 cells by alternative activation of the caspase 3 cascade', *Journal of cellular biochemistry*, 89, pp. 1044–1055.
- Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S. and Aggarwal, B. B. (2003) 'Ursolic acid inhibits nuclear factor- κ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1', *Cancer research*, 63, pp. 4375–4383.
- Shivji, M. K. K., Podust, V. N., Hubscher, U. and Wood, R. D. (1995) 'Nucleotide Excision Repair DNA Synthesis by DNA Polymerase E in the Presence of PCNA, RFC, and RPA', *Biochemistry*, 34, pp. 5011–5017.
- Silva-carvalho, R., Baltazar, F. and Almeida-aguiar, C. (2015) 'Propolis : A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, pp. 1–29.
- Silva, B. A. K., Silva, I. S., Pereira, D. M., Aydos, R. D., Carvalho, P. D. T. C. and Facco, G. G. (2007) 'Experimental model of pulmonary carcinogenesis in Wistar rats.', *Acta cirurgica brasileira*, 22, pp. 16–20.
- da Silva, J. F. M., Souza, M. C. de, Matta, S. R., Andrade, M. R. de and Vidal, F. V. N. (2006) 'Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities', *Food Chemistry*, 99, pp. 431–435.

- da Silva, R. O., Andrade, V. M., Rêgo, E. S. B., Dória, G. A. A., Lima, B. dos S., Silva, F. A. da, Araújo, A. A. de S., Júnior, R. L. C. de A., Cardoso, J. C. and Gomesa, M. Z. (2015) 'Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats', *Journal of Ethnopharmacology*. Elsevier, 170, pp. 66–71. doi: 10.1016/j.jep.2015.05.009.
- Singh, L., Pushker, N., Saini, N., Sen, S., Sharma, A., Bakhshi, S., Chawla, B. and Kashyap, S. (2015) 'Expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins in human retinoblastoma', *Clinical & experimental ophthalmology*, 43, pp. 259–267.
- Sinha, A. (1972) 'Colorimetric assay of catalase.', *Analytical biochemistry*, 47, pp. 389–394.
- Solaini, G., Sgarbi, G. and Baracca, A. (2011) 'Oxidative phosphorylation in cancer cells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807, pp. 534–542.
- Soltani, E., Cerezuela, R., Charef, N., Mezaache-Aichour, S., Esteban, M. A. and Zerroug, M. M. (2017) 'Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in vitro effects on gilthead seabream innate immune responses', *Fish and Shellfish Immunology*, 62, pp. 57–67.
- Song, Y. S., Park, E.-H., Jung, K. J. and Jin, C. (2002) 'Inhibition of angiogenesis by propolis.', *Archives of pharmacal research*, 25, pp. 500–504.
- Stadtman, E. R. and Levine, R. L. (2000) 'Protein oxidation', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, pp. 191–208.
- Suzuki, I., Hayashi, I., Takaki, T., Groveman, D. S. and Fujimiya, Y. (2002) 'Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents', *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 17, pp. 553–562.
- Szliszka, E., Czuba, Z. P., Domino, M., Mazur, B., Zydowicz, G. and Krol, W. (2009) 'Ethanol extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells', *Molecules*, 14, pp. 738–754.
- Szliszka, E. and Krol, W. (2013) 'Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells', *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, pp. 1–10.
- Szliszka, E., Zydowicz, G., Janoszka, B., Dobosz, C., Kowalczyk-Ziomek, G. and Krol, W. (2011) 'Ethanol extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis', *International Journal of Oncology*, 38, pp. 941–953.
- Tamatani, M., Che, Y. H., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., Miyake, S., Mizuno, T. and Tohyama, M. (1999) 'Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFκB activation in primary hippocampal neurons', *Journal of Biological Chemistry*, 274, pp. 8531–8538.
- Tan-No, K., Nakajima, T., Shoji, T., Nakagawasai, O., Nijima, F., Ishikawa, M., Endo, Y., Sato, T., Satoh, S. and Tadano, T. (2006) 'Anti-inflammatory Effect of Propolis through Inhibition of Nitric Oxide Production on Carrageenin-Induced Mouse Paw Edema', *Biological & pharmaceutical bulletin*, 29, pp. 96–99.

- Tan, A. C., Konczak, I., Sze, D. M.-Y. and Ramzan, I. (2011) 'Molecular Pathways for Cancer Chemoprevention by Dietary Phytochemicals', *Nutrition and Cancer*, 63, pp. 495–505.
- Tao, H., Yang, J.-J., Zhou, X., Deng, Z.-Y., Shi, K.-H. and Li, J. (2016) 'Emerging role of long noncoding RNAs in lung cancer: Current status and future prospects', *Respiratory Medicine*, 110, pp. 12–19.
- Tarantini, A. (2010) *Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges*. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Tessitore, L., Costelli, P. and Baccino, F. M. (1994) 'Pharmacological interference with tissue hypercatabolism in tumour-bearing rats', *Biochemical journal*, 299, pp. 71–78.
- Tokito, T., Azuma, K., Kawahara, A., Ishii, H., Yamada, K., Matsuo, N., Kinoshita, T., Mizukami, N., Ono, H., Kage, M. and Hoshino, T. (2016) 'Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy', *European Journal of Cancer*, 55, pp. 7–14.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Müller-Hermelink, H. K. and Harris, C. (2004) 'World Health Organization classification of tumours.', *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*, 10, pp. 179–84.
- Trushin, N., Alam, S., El-Bayoumy, K., Krzeminski, J., Amin, S. G., Gullett, J., Meyers, C. and Prokopczyk, B. (2012) 'Comparative metabolism of benzo [a] pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes', *Journal of carcinogenesis*, 11, pp. 1–7.
- Tung, E. W. Y., Philbrook, N. A., Belanger, C. L., Ansari, S. and Winn, L. M. (2014) 'Benzo [a] pyrene increases DNA double strand break repair in vitro and in vivo: a possible mechanism for benzo [a] pyrene-induced toxicity', *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 760, pp. 64–69.
- Turrens, J. F. (2003) 'Mitochondrial formation of reactive oxygen species.', *The Journal of physiology*, 552, pp. 335–344.
- Ulasli, S. S., Celik, S., Gunay, E., Ozdemir, M., Ozyurek, A., Koyuncu, T. and Unlu, M. (2013) 'Anticancer Effects of Thymoquinone, Caffeic Acid Phenethyl Ester and Resveratrol on A549 Non-small Cell Lung Cancer Cells Exposed to Benzo (a) pyrene', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14, pp. 6159–6164.
- Uno, S., Dalton, T. P., Dragin, N., Curran, C. P., Derkenne, S., Miller, M. L., Shertzer, H. G., Gonzalez, F. J. and Nebert, D. W. (2006) 'Oral benzo [a] pyrene in Cyp1 knockout mouse lines: CYP1A1 important in detoxication, CYP1B1 metabolism required for immune damage independent of total-body burden and clearance rate', *Molecular pharmacology*, 69, pp. 1103–1114.
- Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A.-M., Avila, G., Franzblau, S., Singh, M. P., Maiese, W. M. and Timmermann, B. N. (1999) 'Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from Central Chile', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 54, pp. 406–416.

- Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L. and Carvalho, M. (2011) 'Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro', *Food and Chemical Toxicology*, 49, pp. 86–92.
- Velikova, M., Bankova, V., Sorkunb, K., Houcinec, S., Tsvetkovad, I. and Kujungiev, A. (2000) 'Propolis from the Mediterranean Region : Chemical Composition and Antimicrobial Activity', *eitschrift für Naturforschung C*, 55, pp. 790–793.
- Virchow, R. (1862) *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. berlin, germany.
- De Visser, K. E., Eichten, A. and Coussens, L. M. (2006) 'Paradoxical roles of the immune system during cancer development', *Nature reviews cancer*, 6, p. 24.
- Wakx, A., Regazzetti, A., Dargère, D., Auzeil, N., Gil, S., Evain-Brion, D., Laprévotte, O. and Rat, P. (2016) 'New in vitro biomarkers to detect toxicity in human placental cells: The example of benzo[A]pyrene', *Toxicology in Vitro*, 32, pp. 76–85.
- Wang, H., Yang, T. and Wu, X. (2015) '5-Fluorouracil preferentially sensitizes mutant KRAS non-small cell lung carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis', *Molecular oncology*, 9, pp. 1815–1824.
- Wei, M. C., Zong, W.-X., Cheng, E. H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J. (2001) 'Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death', *Science*, 292, pp. 727–730.
- Weng, M. S., Liao, C. H., Chen, C. N., Wu, C. L. and Lin, J. K. (2007) 'Propolin H from Taiwanese propolis induces G1 arrest in human lung carcinoma cells', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, pp. 5289–5298.
- Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M. D. and Daniel, H. (2000) 'Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells', *Cancer research*, 60, pp. 3823–3831.
- Weschler, C. J. and Nazaroff, W. W. (2013) 'Dermal uptake of organic vapors commonly found in indoor air', *Environmental science & technology*, 48, pp. 1230–1237.
- Wiel, J. A. G. Van De, Fijneman, P. H. S., Duijf, C. M. P., Anzion, R. B. M., Theuws, J. L. G. and Bos, R. P. (1993) 'Excretion of benzo [a] pyrene and metabolites in urine and feces of rats : influence of route of administration , sex and long-term ethanol treatment', *Toxicology*, 80, pp. 103–115.
- Willet, K., Detry, O. and Sluse, F. E. (2000) 'Resistance of isolated pulmonary mitochondria during in vitro anoxia/reoxygenation', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1460, pp. 346–352.
- Withey, J. R., Law, F. C. P. and Endrenyi, L. (1991) 'Pharmacokinetics and bioavailability of pyrene in the rat', *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 32, pp. 429–447.

- Wu, J., Omene, C., Karkoszka, J., Bosland, M., Eckard, J., Klein, C. B. and Frenkel, K. (2011) 'Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer', *Cancer Letters*, 308, pp. 43–53.
- Wu, J., Xue, X., Zhang, B., Jiang, W., Cao, H., Wang, R., Sun, D. and Guo, R. (2016) 'The protective effects of paeonol against epirubicin-induced hepatotoxicity in 4T1-tumor bearing mice via inhibition of the PI3K/Akt/NF- κ B pathway', *Chemico-Biological Interactions*, 244, pp. 1–8.
- Wu, X., Zhou, Y., Wang, Z., Hao, Q. and Ren, S. (2002) 'Effect of benzo [a] pyrene on DNA damage and expression of genes involved in nucleotide excision repair in lung cancer cells', *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi= Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases*, 20, pp. 443–445.
- Wyrobek, A. J., Gordon, L. A., Burkhart, J. G., Francis, M. W., Kapp Jr, R. W., Letz, G., Malling, H. V, Topham, J. C. and Whorton, M. D. (1983) 'An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program', *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 115, pp. 1–72.
- Xia, B., Pang, L., Zhuang, Z. X. and Liu, J. J. (2016) 'Biotin-mediated epigenetic modifications: Potential defense against the carcinogenicity of benzo[a]pyrene', *Toxicology Letters*, 241, pp. 216–224.
- Xue, W. and Warshawsky, D. (2005) 'Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 206, pp. 73–93.
- Yamazaki, H. and Kakiuchi, Y. (1989) 'The uptake and distribution of benzo(a)pyrene in rat after continuous oral administration', *Toxicological & Environmental Chemistry*, 24, pp. 95–104.
- Yang, N., Qin, S., Wang, M., Chen, B., Yuan, N., Fang, Y., Yao, S., Jiao, P., Yu, Y., Zhang, Y. and Wang, J. (2013) 'Pinocembrin, a major flavonoid in propolis, improves the biological functions of EPCs derived from rat bone marrow through the PI3K-eNOS-NO signaling pathway', *Cytotechnology*, 65, pp. 541–551.
- Yang, Z., Zhuan, B., Yan, Y., Jiang, S. and Wang, T. (2016) 'Identification of gene markers in the development of smoking-induced lung cancer', *Gene*, 576, pp. 451–457.
- Yildiz, O. G., Soyuer, S., Saraymen, R. and Eroglu, C. (2008) 'Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on radiation induced lung injury in rats', *Clinical and investigative medicine.Medecine clinique et experimentale*, 31, pp. 242–247.
- Yoshida, T., Konishi, M., Horinaka, M., Yasuda, T., Goda, A. E., Taniguchi, H., Yano, K., Wakada, M. and Sakai, T. (2008) 'Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375, pp. 129–133.

Yoshida, T., Tanaka, S., Mogi, A., Shitara, Y. and Kuwano, H. (2004) 'Original article The clinical significance of Cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer', 15, pp. 252–256.

Zhang, C., Wang, G., Han, X., Ren, Z. and Duo, J. (2016) 'Comparison of the therapeutic effects of surgery combined with postoperative radiotherapy and standalone radiotherapy in treating spinal metastases of lung cancer', *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 141, pp. 38–42.

Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J. and Chen, W.-S. (2008) '5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies', *Molecules*, 13, pp. 1551–1569.

Zhang, Y., Wu, X., Guo, D., Rechkoblit, O., Geacintov, N. E. and Wang, Z. (2002) 'Two-step error-prone bypass of the (+)- and (–)-trans-anti-BPDE-N 2-dG adducts by human DNA polymerases η and κ ', *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 510, pp. 23–35.

1. Tampon utilisés pour le dosage des paramètres du stress oxydatif :

- **Tampon phosphate (0,1 M) contenant KCl (1,17 %) pour la préparation de la fraction cytosolique :**

KH ₂ PO ₄ (0.1M).....	1.36g
K ₂ HPO ₄ (0.1M)	1.74g
Eau distillée.....	100ml
KCl.....	1.17g
pH 7.4	

- **Préparation du Bradford pour le dosage protéique:**

Bleu brillant de Coomassie	100 mg
Ethanol (95%).....	50 ml
Agitation pendant 4 heures, puis ajouter 100 ml d'acide phosphorique (85 %) et compléter le volume à 1000 ml par l'eau distillée. Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1 mois au maximum à 4 °C et à l'abri de la lumière.	

2. Tampon utilisés avec les mitochondries du poumon :

- **Tampon d'isolement :** TSE : 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 5 mM Tris-HCl, 0,5% BSA, pH=7,4
- **Tampon d'incubation :** tampon respirant avec roténone : 250 mM sucrose, 5 mM KH₂PO₄, pH=7,4 à 25°C puis addition de 1 uM roténone

3. Tampon utilisés pour le western-blot :

- **Tampon d'extraction des protéines :** tampon RIPA : 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% dodécylsulfate de sodium (SDS), 1% NP-40, 0,5% désoxycholate de sodium, 1 mM phénylméthyl sulfonyle fluorure, 2 mM EDTA en présence d'inhibiteur de protéase (préparé au 1/1000^{ème}), pH= 8
- **Tampon de migration pH 8,3 :**

Tris base 25mM (1X).....	3,05g
Glycine 190 mM	14,25g
SDS 0,1%.....	1g
H ₂ O qsp.....	1L
- **Tampon de transfert :**

Tris	15.125g
------------	---------

Glycine.....	72g
Methanol.....	100 ml
H2O qsp.....	5L

- **Rouge Ponceau:**

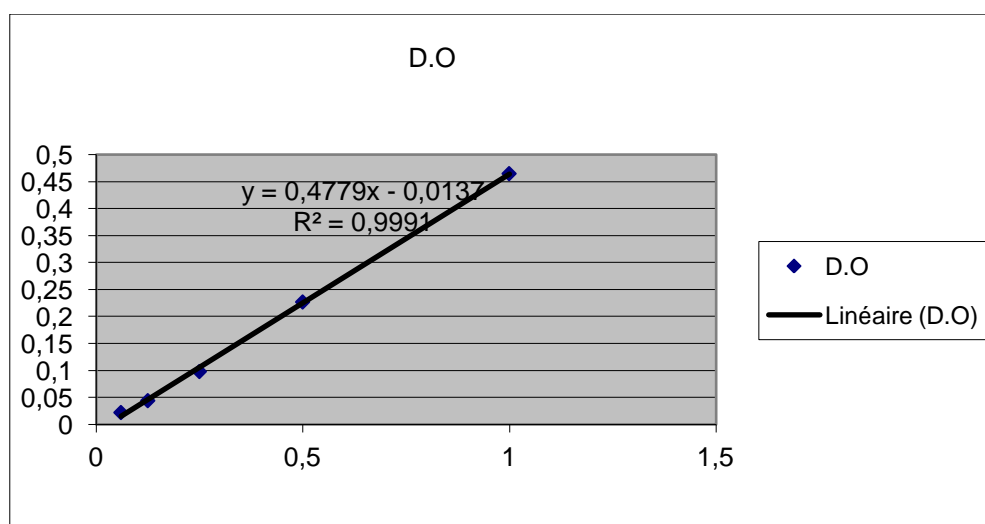
rouge pnceau.....	0.5g
TCA.....	15g
H2O qsp.....	500ml

4. Tampon et milieu de culture pour ligné cellulaire :

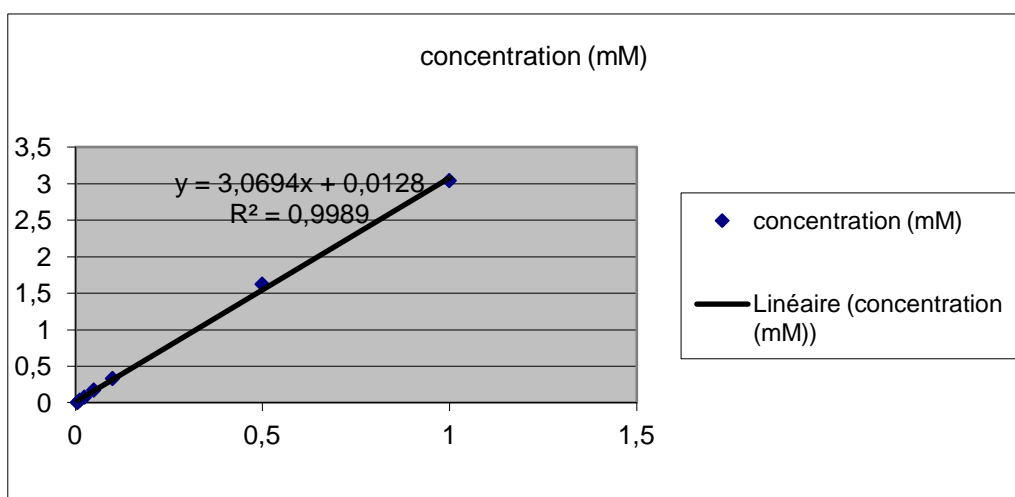
- Pénicilline-Streptomycine: 10000 U/ml/ et 10000% µg/ml respectivement. Stock aliquoté par 2.5 ml et stocké à -20°C.
- Sérum de veau fœtal (SVF): conservé à -20° et aliquoté par 10 ml.
- Milieu de congélation: 25 de SVF, 25% de DMSO et 50 % de milieu complet.
- Milieu de culture: RPMI : 10 ml SVF (10% final) + 1ml glutamine (1%) + 1ml pyruvate (1%) + 1ml Pénicilline-Streptomycine (1%) + 86 ml de milieu.
- Tampon d'adhésion : RPMI, NaHCO₃ 1,2 g/l, HEPES 15 mM pH 7,3 et BSA 0,2 %

5. Gamme étalon :

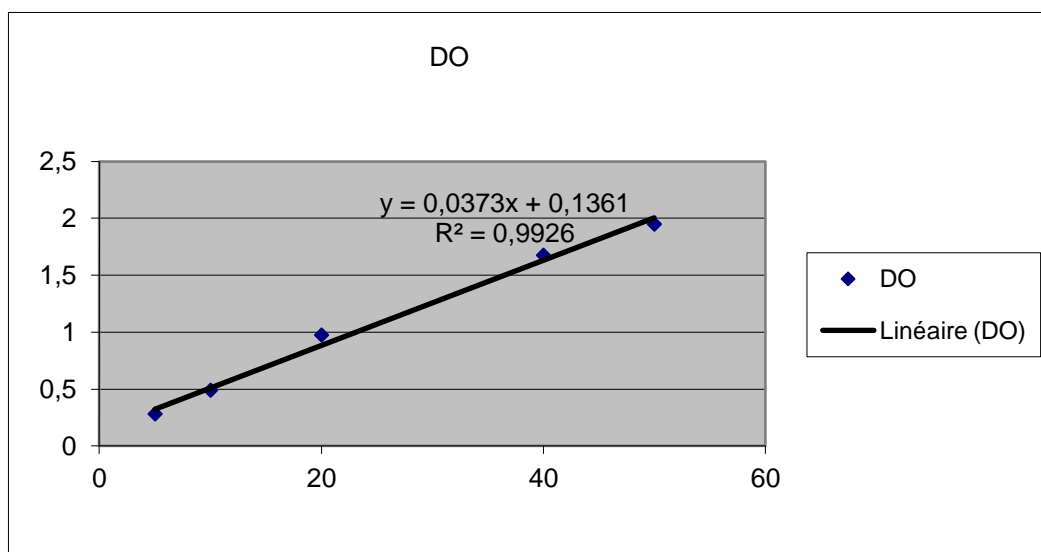
➤ **Gamme étalon de protéines :**



➤ **Gamme étalon du GSH :**



➤ **Gamme étalon du MDA**



Résumé

La propolis, est une source potentielle d'antioxydants naturels tels que les flavonoïdes. Cette substance bioactif a un double effet chimopréventif et antiprolifératif contre une large gamme de cancers dont le cancer du poumon qui est la principale cause de décès par cancer dans le monde. **Objectif** : Le but de notre thèse est d'étudier l'implication du stress oxydatif dans le cancer pulmonaire expérimental induit par le B(a)P et d'étudier l'effet de l'extrait de propolis sur ce cancer *in vivo* chez le rat Wistar en ciblant différents protéines et *in vitro* sur les cellules A549. **Matériels et méthodes** : L'effet antiprolifératif des différentes concentrations de l'EEP sur les cellules A549 a été évalué en utilisant le test MTT et le teste d'adhésion. L'effet chimiopréventif a été évalué sur Cinq groupes de rats Wistar Albinos qui ont reçu différents traitement de B(a)P, de l'EEP et des anticancéreux. De plus l'impacte de ces trois traitements sur le fonctionnement mitochondriale a été évalué sur des mitochondries pulmonaires *in vitro*. **Résultats** : L'EEP a démontré un effet antiprolifératif sur les cellules A549 à 24 et 72 heures d'une manière dose dépendante et une inhibition de l'adhésion de ces cellules par le fibrinogène. De plus, l'EEP a réduit le stress oxydatif généré par le B(a)P et/ ou les anticancéreux montré par l'augmentation des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (SOD, CAT, GST et GSH) ainsi qu'une diminution de la peroxydation lipidique. L'EEP a induit la diminution de la prolifération, de l'expression du Ki-67 et de l'expression de PCNA chez le rat Wistar. une diminution des médiateurs pro-inflammatoires à savoir NF- κ B et COX-2 a été démontrée après le traitement par l'EEP ainsi qu'un effet pro-apoptotique de ce dernier traduit par une surexpression des Bax et Caspase 3 clivé ainsi qu'une diminution d'expression des NOS-3. Au niveau mitochondrial, une diminution importante de la production de l'O₂^{•-} et aussi du gonflement mitochondrial a été observée après traitement par l'EEP. L'analyse histologique a confirmé ces résultats. **Conclusions** : L'effet antiprolifératif, antioxydant, anti-inflammatoire et protecteur contre les altérations mitochondriales de la propolis permet de suggérer son utilisation pour améliorer la santé du grand public et pour la prévention de plusieurs maladies telles que l'inflammation et le cancer.

Mots clés : A549, benzo(a)pyrène, cancer pulmonaire, Propolis, stress oxydatif.

Abstract

Propolis is a potential source of natural antioxidants such as flavonoids. This bioactive substance has a dual effect chemopreventive and antiproliferative, against a wide range of cancers including lung cancer which is the leading cause of cancer deaths worldwide.

Objective: The aim of our thesis is to study the involvement of oxidative stress in experimental pulmonary cancer induced by B(a)P and to study the effect of propolis extract on this cancer in vivo in Wistar rats, by targeting different proteins and in vitro on A549 cells.

Materials and methods: The antiproliferative effect of different concentrations of EEP on A549 cells was assessed using the MTT assay and the adhesion test. The chemopreventive effect was evaluated on five groups of Wistar Albino rats that received different treatment of B(a)P, EEP and anticancer drugs. Moreover, the impact of these three treatments on the mitochondrial function was evaluated in vitro on pulmonary mitochondria. **Results:** EEP demonstrated an antiproliferative effect on A549 cells at 24 and 72 hours in a dose-dependent manner and an inhibition of fibrinogen adhesion in these cells. In addition, EEP reduced the oxidative stress generated by B(a)P and/or anticancer agents as shown by the increase of enzymatic and non-enzymatic antioxidants (SOD, CAT, GST and GSH) as well as decreased lipid peroxidation. EEP induced a decrease in proliferation, Ki-67 expression and PCNA expression in Wistar rats. A decrease in pro-inflammatory mediators, as NF-kB and COX-2, was demonstrated after treatment with PEE and a pro-apoptotic effect of this latter, resulting in overexpression of Bax and cleaved Caspase 3 as well as decreased expression of NOS-3. At the mitochondrial level, a significant decrease in O₂^o production and also mitochondrial swelling was observed after treatment with PEF. Histological analysis confirmed these results. **Conclusions:** The antiproliferative, antioxidant, anti-inflammatory and protective effect against mitochondrial alterations of propolis suggests its use to improve the health of the general public and the prevention of several diseases such as inflammation and cancer.

Key words: A549, Benzo(a)pyrene, lung cancer, propolis, oxidative stress.

ملخص

تعتبر البروبوليس مصدر لمضادات الأكسدة الطبيعية مثل الفلافونويدات. هذه المادة النشطة بيولوجيا لها تأثير ثنائي وقائي كيميائي ومضاد للتكاثر الخلوي لمجموعة واسعة من السرطانات بما في ذلك سرطان الرئة، والذي يعتبر السبب الرئيسي للوفيات بالسرطان في جميع أنحاء العالم. **الهدف** من أطروحتنا هو دراسة دور الأكسدة في تطور سرطان الرئة التجريبي المتسبب فيه حقن مادة البنزوبيرين ودراسة تأثير مستخلص البروبوليس على هذا السرطان عند جردان وبستار وذلك باستهداف مختلف البروتينات وكذلك تأثيره على الخلايا A549. **المواد وطرق العمل**: تم تقييم تأثير مختلف تركيزات البروبوليس ضد تكاثر خلايا A549 باستعمال تجربة MTT واختبار الالتصاق. اما بالنسبة الى التأثير الوقائي فقد تم تقييمه على خمس مجموعات من الجردان وبستار ألبينو التي تلقت معالجات مختلفة من البنزوبيرين، مستخلص البروبوليس والأدوية المضادة للسرطان. وعلاوة على ذلك، تم تقييم تأثير هذه العلاجات الثلاثة على وظيفة الميتوكوندريا الرئوية. **النتائج**: أظهر البروبوليس القدرة على تثبيط تكاثر الخلايا A549 في مدة 24 و 72 ساعة وذلك حسب الجرعة المستعملة بالإضافة إلى منع إلتصاق هذه الخلايا بالفيبيرينوجين. علاوة على ذلك مستخلص البروبوليس قلل من الإجهاد التأكسدي الذي تسبب فيه البنزوبيران و/ أو الأدوية المضادة للسرطان والذي أظهرته الزيادة في مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية (SOD، CAT، GSH و GST) وإنخفاض تأكسد الدهون. البروبوليس خفض وتيرة التكاثر الخلوي وخفض نسبة تعبير Ki-67 و PCNA عند الفئران وبستار. وقد أظهر أيضا إنخفاضا في وسطاء الإلتهابات وهي NF-κB و COX-2 بعد العلاج. فضلا عن القدرة على تحفيز الأوبوتوز المبين بارتفاع نسبة تعبير Bax و 3 clivé Caspase وكذلك إنخفاض تعبير NOS-3. على مستوى الميتوكوندريا، لوحظ انخفاض كبير في إنتاج O₂° وكذلك تورم الميتوكوندريا بعد العلاج. التحليل النسيجي أكد لنا هذه النتائج. **الإستنتاج**: قدرة البروبوليس على تثبيط نمو وتكاثر الخلايا السرطانية و كذا قدرتها المضادة للأكسدة و المضادة للالتهابات وقدرتها الوقائية ضد التغيرات الميتوكوندريية، تأيد إستخدامه لتحسين الصحة العامة والوقاية من العديد من الأمراض مثل الالتهابات والسرطانات.

الكلمات الدالة: A549, البنزوبيرين, سرطان الرئة, البروبوليس, الاجهاد التأكسدي.

Résumé

La propolis, est une source potentielle d'antioxydants naturels tels que les flavonoïdes. Cette substance bioactif a un double effet chimopréventif et antiprolifératif contre une large gamme de cancers dont le cancer du poumon qui est la principale cause de décès par cancer dans le monde. **Objectif** : Le but de notre thèse est d'étudier l'implication du stress oxydatif dans le cancer pulmonaire expérimental induit par le B(a)P et d'étudier l'effet de l'extrait de propolis sur ce cancer *in vivo* chez le rat Wistar en ciblant différents protéines et *in vitro* sur les cellules A549. **Matériels et méthodes** : L'effet antiprolifératif des différentes concentrations de l'EEP sur les cellules A549 a été évalué en utilisant le test MTT et le teste d'adhésion. L'effet chimopréventif a été évalué sur Cinque groupes de rats Wistar Albinos qui ont reçu différents traitement de B(a)P, de l'EEP et des anticancéreux. De plus l'impacte de ces trois traitements sur le fonctionnement mitochondriale a été évalué sur des mitochondries pulmonaires *in vitro*. **Résultats** : L'EEP a démontré un effet antiprolifératif sur les cellules A549 à 24 et 72 heures d'une manière dose dépendante et une inhibition de l'adhésion de ces cellules par le fibrinogène. De plus, l'EEP a réduit le stress oxydatif généré par le B(a)P et/ ou les anticancéreux montré par l'augmentation des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (SOD, CAT, GST et GSH) ainsi qu'une diminution de la peroxydation lipidique. L'EEP a induit la diminution de la prolifération, de l'expression du Ki-67 et de l'expression de PCNA chez le rat Wistar. une diminution des médiateurs pro-inflammatoires à savoir NF- κ B et COX-2 a été démontrée après le traitement par l'EEP ainsi qu'un effet pro-apoptotique de ce dernier traduit par une surexpression des Bax et Caspase 3 clivé ainsi qu'une diminution d'expression des NOS-3. Au niveau mitochondrial, une diminution importante de la production de l'O₂[°] et aussi du gonflement mitochondrial a été observée après traitement par l'EEP. L'analyse histologique a confirmé ces résultats. **Conclusions** : L'effet antiprolifératif, antioxydant, anti-inflammatoire et protecteur contre les altérations mitochondriales de la propolis permet de suggérer son utilisation pour améliorer la santé du grand public et pour la prévention de plusieurs maladies telles que l'inflammation et le cancer.

Mots clés : A549, benzo(a)pyrène, cancer pulmonaire, Propolis, stress oxydatif.

Abstract

Propolis is a potential source of natural antioxidants such as flavonoids. This bioactive substance has a dual effect chemopreventive and antiproliferative, against a wide range of cancers including lung cancer which is the leading cause of cancer deaths worldwide. **Objective**: The aim of our thesis is to study the involvement of oxidative stress in experimental pulmonary cancer induced by B(a)P and to study the effect of propolis extract on this cancer *in vivo* in Wistar rats, by targeting different proteins and *in vitro* on A549 cells. **Materials and methods**: The antiproliferative effect of different concentrations of EEP on A549 cells was assessed using the MTT assay and the adhesion test. The chemopreventive effect was evaluated on five groups of Wistar Albino rats that received different treatment of B(a)P, EEP and anticancer drugs. Moreover, the impact of these three treatments on the mitochondrial function was evaluated *in vitro* on pulmonary mitochondria. **Results**: EEP demonstrated an antiproliferative effect on A549 cells at 24 and 72 hours in a dose-dependent manner and an inhibition of fibrinogen adhesion in these cells. In addition, EEP reduced the oxidative stress generated by B(a)P and/or anticancer agents as shown by the increase of enzymatic and non-enzymatic antioxidants (SOD, CAT, GST and GSH) as well as decreased lipid peroxidation. EEP induced a decrease in proliferation, Ki-67 expression and PCNA expression in Wistar rats. A decrease in pro-inflammatory mediators, as NF- κ B and COX-2, was demonstrated after treatment with PEE and a pro-apoptotic effect of this latter, resulting in overexpression of Bax and cleaved Caspase 3 as well as decreased expression of NOS-3. At the mitochondrial level, a significant decrease in O₂[°] production and also mitochondrial swelling was observed after treatment with PEF. Histological analysis confirmed these results. **Conclusions**: The antiproliferative, antioxidant, anti-inflammatory and protective effect against mitochondrial alterations of propolis suggests its use to improve the health of the general public and the prevention of several diseases such as inflammation and cancer.

Key words: A549, Benzo(a)pyrene, lung cancer, propolis, oxidative stress.

ملخص

تعتبر البروبوليس مصدر لمضادات الأكسدة الطبيعية مثل الفلافونويدات. هذه المادة النشطة بيولوجيا لها تأثير ثنائي وقائي كيميائي ومضاد للتكاثر الخلوي لمجموعة واسعة من السرطانات بما في ذلك سرطان الرئة، والذي يعتبر السبب الرئيسي للوفيات بالسرطان في جميع أنحاء العالم. **الهدف** من أطروحتنا هو دراسة دور الاكسدة في تطور سرطان الرئة التجريبي المتسبب فيه حقن مادة البنزوبيرين ودراسة تأثير مستخلص البروبوليس على هذا السرطان عند جردان ويستار وذلك باستهداف مختلف البروتينات وكذلك تأثيره على الخلايا A549. **المواد وطرق العمل**: تم تقييم تأثير مختلف تركيزات البروبوليس ضد تكاثر خلايا A549 باستعمال تجربة MTT واختبار الالتصاق. اما بالنسبة الى التأثير الوقائي فقد تم تقييمه على خمس مجموعات من الجردان ويستار ألبينو التي تلقت معالجات مختلفة من البنزوبيرين، مستخلص البروبوليس والأدوية المضادة للسرطان. وعلاوة على ذلك، تم تقييم تأثير هذه العلاجات الثلاثة على وظيفة الميتوكوندريا الرئوية. **النتائج**: أظهر البروبوليس القدرة على تثبيط تكاثر الخلايا A549 في مدة 24 و 72 ساعة و ذلك حسب الجرعة المستعملة بالإضافة إلى منع إلتصاق هذه الخلايا بالفيبرينوجين. علاوة على ذلك مستخلص البروبوليس قلل من الإجهاد التأكسدي الذي تسبب فيه البنزوبيرين و/ أو الأدوية المضادة للسرطان والذي أظهرته الزيادة في مضادات الاكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية (SOD، CAT، GSH، GST) وإنخفاض تأكسد الدهون. البروبوليس خفض وتيرة التكاثر الخلوي وخفض نسبة تعبير Ki-67 و PCNA عند الفئران ويستار. وقد أظهر أيضا إنخفاضا في وسطاء الإلتهابات وهي NF- κ B و COX-2 بعد العلاج. فضلا عن القدرة على تحفيز الأوبوتوز المبيّن بارتفاع نسبة تعبير Bax و Caspase 3 clivé وكذلك إنخفاض تعبير NOS-3. على مستوى الميتوكوندريا، لوحظ انخفاض كبير في إنتاج O₂[°] وكذلك تورم الميتوكوندريا بعد العلاج. التحليل النسيجي أكد لنا هذه النتائج. **الإستنتاج**: قدرة البروبوليس على تثبيط نمو وتكاثر الخلايا السرطانية وكذا قدرتها المضادة للأكسدة و المضادة للإلتهابات وقدرتها الوقائية ضد التغيرات الميتوكوندرية، تأيد إستخدامه لتحسين الصحة العامة والوقاية من العديد من الأمراض مثل الإلتهابات والسرطانات.

الكلمات الدالة: A549، البنزوبيرين، سرطان الرئة، البروبوليس، الإجهاد التأكسدي.