الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جـــامعـــة محمد الصديق بن يحـيـــــى جيجـــل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Moléculaire et Cellulaire

كليـة عـــلوم الطـــبيعـة والحـــياة
قســـم: البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Sciences Pharmacologiques

Thème

Evaluation de l'effet préventif de l'huile de fruits du pistachier lentisque de la région de Jijel contre la toxicité aiguë cérébrale et pulmonaire induite par le benzo[a]pyrène *in vivo* chez la souris.

Membres de Jury

Présidente : Dr CHERBAL Asma

Examinateur : Mme KEBSA Widad

Encadreur : Dr BENGUEDOUAR Lamia

Présenté par :

BENANE Radia

BOULMIS Nassima

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) :……..…

Remerciements

D'abord, Nos remerciements s'adressent d'abord à Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la volonté, la santé, le courage et la patience pour réaliser ce travail.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à notre encadrant Dr BENGADOUAR Lamia, Docteur à l'université de Jijel pour avoir dirigé notre travail. Il est à notre avis difficile de trouver une aussi bonne directrice de mémoire tant d'un point de vue scientifique que d'un point de vue humain.

Nous remercions aussi les membres du jury, qui nous font l'honneur de juger notre travail: La présidente Mme CHERBAL A. pour avoir accepté de présider le jury de soutenance ainsi que l'examinatrice Mme KEBSA. W. De nous avoir honorées en acceptant de faire partie du jury et d'examiner notre travail.

Enfin nos remerciements s'adressent à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et tous nos enseignants du Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, pour leurs soutiens et formation veuillez trouver ici nos sincères reconnaissances.

« Nassima » et « Radia »

Dédicace

Avant tout je tiens à remercier Allah le tout puissant pour m'avoir donnée la force, la volonté, la santé et la patience pour mener à terme ce modeste travail que je dédie :

A la lumière de mes yeux, ma raison d'être, ma raison de vivre, ma très chère mère Fedia qui m'apporté son appui durant toutes mes années d'étude, Pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité, Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne serait exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices et les efforts que tu n'as jamais cessé de me donne

A mon très cher père, Yazid en signe de reconnaissance et de gratitude pour tous les soutiens, les sacrifices, la tendresse et les prières tout au long de mes études, Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

A mes très chères sœurs et frères : les mots ne Suffisent guère pour exprimer leur grand amour, leurs encouragements permanents, et leur soutien moral, Vous êtes mes fidèles accompagnants dans les moments les Plus délicats.

A toute ma famille et mes très chères amis Sans oublie tous les professeurs que ce soit de primaire, du moyen, du secondaire, ou de l'enseignement supérieure.

Nassima

Dedication

In the name of Allah, the Most Merciful, and the Most Compassionate. I dedicate this work to:

God Almighty my creator, my strong pillar, my source of inspiration, wisdom, knowledge, understanding, and my strength.

My deepest and warmest gratitude to my endearing parents who provided me with their love and understanding, my father "Abdelkader" and my mother "Fatiha". I really appreciate your trust and your invaluable impute. Thank you for your support, encouragement, patience, and sacrifices.

To the ones who add happiness to my life.to my sisters and brothers.to all members of my family, young and old.

I thank from the bottom of my heart my dear friends, without forgetting all the teachers whether primary, middle, high school or higher education. I am thankful to all those who have believed in me and have provided much friendship and encouragement to help me carry this work out.

Radia

"I've learned that I still have a lot to learn"

Maya Angelou

Table des matières

Liste des Abréviations ……..... i

Liste des figures ……..... ii

Liste des tableaux……. iii

Sommaire

I. Introduction……..... 1

II. Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur le benzo[a]pyrène

1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)……..…….. 3

2. Le benzo[a]pyrène et ses sources d'exposition……..... 3

3. Toxicocinétique du benzo[a]pyrène…….. 5

3.1. Absorption et distribution…… 5

3.1.1. La voie respiratoire…… 5

3.1.2. La voie orale…….. ……..... 5

3.1.3. La voie cutané……... ……. 6

3.2. Métabolisme et élimination…… 6

3.2.1. Métabolisme……..... 6

3.2.1.1. Induction des enzymes de métabolisation via le recepteur AhR…… 7

3.2.1.2. La phase I du métabolisme du B[a]P…….. 8

3.2.1.2.1. Les principales voies du métabolisme du B[a]P……..... 8

3.2.1.2.1.1. La voie du radical cation…… 9

3.2.1.2.1.2. La voie de benzo[a]pyrène diol époxyde (BaPDE)……... 9

3.2.1.2.1.3 La voie d'*o*-quinones ……..... 10

3.2.1.3. La phase II de métabolisme du B[a]P……. 10

3.2.2. Elimination…….. 11

Chapitre 2 : Mécanisme de toxicité pulmonaire et cérébrale du B[a]P

1. Anatomie et physiopathologie pulmonaire et cérébrale…… 12

1.1. Les poumons…….. 12

1.1.1. Les pathologies des poumons……. 13

1.1.2. Les effets toxiques du B[a]P sur les poumons…… 13

1.2. Le système nerveux……. …….. 13

1.2.1. Les pathologies du système nerveux central……... 14

1.2.2. Les dommages du B[a]P sur le cerveau…… 15

2. Les mécanismes possibles de toxicité par le benzo[a]pyrène……..... 15
2.1. Dommages d'ADN par le B[a]P : une bataille entre la formation d'adduits d'ADN et suppression……... 15
2.2. La génération d'ERO par le B[a]P…… 16
2.3. La mitochondrie et le B[a]P……..... 18
2.3.1. Généralités sur la mitochondrie…….. 18
2.3.2. Les dommages de la mitochondrie causés par le benzo[a]pyrène…..... 19
3. Les systèmes antioxydants endogènes…….. 19
4. L'effet du B[a]P sur les anti-oxydants endogènes…… 20
Chapitre 3 : *Pistacia lentiscus* L.
1. Généralités sur *Pistacia lentiscus* L.……. 22
2. Description botanique……... 22
3. Taxonomie et classification botanique de *Pistacia lentiscus* L.…… 23
4. Répartition géographique…….. 23
5. Phytochimie de l'espèce *Pistacia lentiscus* L……. 24
6. Méthode d'extraction de l'huile de *Pistacia lentiscus* L.……..... 25
7. Activités pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus* L…….. 25
III : Matériel et méthodes……..... 27
III.1. Etude phytochimique de l'huile de *Pistacia lentiscus* L.…… 27
III.1.1. Dosage des polyphénols totaux……..... 28
III.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux…….. 28
III.2. Etude de l'effet préventif de l'huile fixe de *Pistacia lentiscus* L. contre la toxicité aiguë induite par le B[a]P…… 29
III.2.1. Entretien des animaux……... 29
III.2.2. Traitement des animaux…… 29
III.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes …….. 29
III.2.4. Examen microscopique……. 30
III.2.5. Evaluation des paramètres cytosoliques du stress oxydatif pulmonaire et cérébral…… 30
III.2.5.1. Dosage du glutathion cellulaire (GSH)…….. 31
III.2.5.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)……..... 32
III.2.5.3. Mesure de l'activité enzymatique de superoxyde dismutase (SOD)……. 32
III.2.5.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA)……. 33
III.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford……... 33

III.4. Analyse statistique…….. 34

IV. Résultats et discussion

IV.1. Résultats et interprétation……..... 35

IV.1.1. Rendement d'extraction des composés phénoliques……..... 35

IV.1.2. Les teneurs en composés phénoliques de l'extrait hydro-méthanolique…….. 35

IV.1.2.1. Teneur en polyphénols totaux…… 35

IV.1.2.2. Teneur en flavonoïdes totaux……..... 35

IV.1.3. Aspect microscopique …….. 35

IV.1.4. Evaluation de l'effet préventif de l'huile fixe de fruit de *Pistacia lentiscus* L. (*in vivo*)……..... 37

IV.1.4.1. La variation des taux du glutathion (GSH) pulmonaire et cérébral……... 38

IV.1.4.2. Activité enzymatique de la Superoxyde Dismutase (SOD)……... 39

IV.1.4.3. Activité enzymatique de la Catalase (CAT)…….. 40

IV.1.4.4. Variations des taux du MDA cytosolique…….. 41

IV.2. Discussion 43

IV.2.1. Rendement des composants phénoliques et flavonoïdes de l'huile fixe de fruit de *Pistacia lentiscus* L……... 43

IV.2.2. Effet protecteur *in vivo* de l'huile fixe de *Pistacia lentiscus* contre les toxicités pulmonaire et cérébrale induites par le benzo[a]pyrène …….. 44

Conclusion……..... 48

Références bibliographiques…….. 49

Liste des annexes

Résumé

^{3}H-BaP : benzo[a]pyrène tritié

6-OHBaP : 6-hydroxy-B[a]P

8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyGuanosine

ADNmt : ADN mitochondrial

AhR : Aryl hydrocarbon Receptor

AIP : AhR de type ImmunoPhiline

AKR : Aldo-céto Réductase

$AlCl_3$: Trichlorure d'aluminium

anti-B[a]PDE : anti-B[a]P-7,8-Dihydrodiol-9,10-Epoxyde

ARE : Elément de Réponse aux Antioxydants

Arnt : Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator

ATP : Adénosine Triphosphate

B[a]P : Benzo[a]pyrène

BaPDE : Benzo[a]pyrène Diol Epoxyde

BBC : Bleu Brillant de Coomassie

BPCO : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive

BPQs : B[a]P-Quinones

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CAT : Catalase

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

DG : Gyrus Denté

DO : Densité Optique

DTNB : 5-5'-Dithiobis-(2-acide NitroBenzoïque)

EAG : Equivalent d'Acide Gallique

EH1 : Epoxyde Hydrolase 1

EpREs : Elément de Réponse aux composés Électrophiles

EQ : Equivalent de Quercétine

ERO : Espèces réactifs de l'oxygène

ETC : Chaîne de Transport d'Électrons

FC : Folin-Ciocalteu

GPx-1 : Glutathion Peroxydase 1

GR : Glutathion Réductase

GSH : Glutathion

GST : Glutathion S-Transférase

HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HFPL : Huile Fixe de *Pistacia lentiscus* L.

Hsp90 : Protéine du choc thermique 90

IMS : Espace Intermembranaire

IP : Intrapéritonéale

IUPAC : Union International de Chimie Pure et Appliquée

LDL : Low-Density Lipoprotein

LPO : Peroxidation Lipidique

MPOC : Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique

NER : Réparation par Excision de Nucléotide

NQO1 : NAD(P)H Quinone Oxydoréductase 1

OXPHOS : Phosphorylation Oxydative

PFC : Cortex Préfrontal

PGH-synthase : Prostaglandine H-synthase

PL : Pistachier Lentisque

POPs : Polluants Organiques Persistants

SOD : Superoxyde Dismutase

SULT : Sulfotransférases

TBA : Acide Thiobarbiturique

TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Substances

TCA : Acide Tricarboxylique

TNB : Thionitrobenzoate

UGT : Uridine Diphosphate Glucuronosyltransférase

XRE : Elément de Réponse aux xénobiotiques

Figures	Titre	Page
Figure 1	Schéma du mécanisme d'induction des gènes par le B[a]P *via* l'intermédiaire de l'AhR.	8
Figure 2	Les trois principales voies d'activation métabolique du benzo[a]pyrène.	9
Figure 3	La région Baie et K du benzopyrène.	10
Figure 4	Description d'un lobule pulmonaire.	12
Figure 5	Les différents éléments structurelles du cerveau.	14
Figure 6	La formation d'adduit entre le trans-anti-BPDE et la nucléotide de la Guanosine.	16
Figure 7	Modification de la nucléotide Guaosine par les ERO	17
Figure 8	Le stress oxydant et sa relation avec la signalisation redox.	18
Figure 9	La phosphorylation oxydative et la chaîne respiratoire mitochondriale.	19
Figure 10	Feuilles et fruits de *P. lentiscus* L.	22
Figure 11	Répartition géographique de *Pistacia lentiscus* L.	23
Figure 12	Schéma de la réaction entre le DTNB et les groupements –SH.	31
Figure 13	Examen histologique des tissus pulmonaires observés en microscope optique (×100).	36
Figure 14	Examen histologique des tissus cérébrales observés en microscope optique (×100)	37
Figure 15	Variations des du GSH cytosolique pulmonaire (A) et cérébral (B).	38
Figure 16	Variations de l'activité enzymatique du SOD cytosolique pulmonaire (A) et cérébrale (B).	39
Figure 17	Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique pulmonaire (A) et cérébrale (B).	40
Figure 18	Variations du taux du MDA cytosolique pulmonaire et cérébral.	43

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Les principales caractéristiques physico-chimiques du B[a]P	4
Tableau 2	Classification taxonomique de *Pistacia lentiscus* L.	23

I. Introduction

Au cours des dernières décennies, la révolution industrielle et le développement technologique ont considérablement compliqué les problèmes de l'environnement (Andra *et al*., 2017). L'explosion démographique de la population mondiale et ses besoins alimentaires et sanitaires sont les principales raisons ayant conduit à une augmentation de la pollution notamment la pollution atmosphérique. De l'échelle locale à l'échelle globale ce transfert atmosphérique concerne principalement les polluants organiques persistants (POPs) tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Ces derniers sont des contaminants organiques issus principalement des activités anthropiques humaines et sont susceptibles d'engendrer l'apparition de plusieurs maladies (Mokbel *et al*., 2015).

Le benzo[a]pyrène est l'un des HAPs produit par la combustion incomplète des composés organiques, il cause après son activation des dommages à l'ADN, ainsi que la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui entraînent l'induction du stress oxydatif (Kumar *et al*., 2017), mais aussi des changements morphologiques et des lésions histopathologiques dans plusieurs tissus de l'organisme (Emre *et al*., 2007; Ji *et al*., 2016).

Parallèlement, il y a eu un progrès considérable de la recherche en toxicologie environnementale ayant abouti à définir avec succès une panoplie de substances susceptibles de prévenir les risques toxiques sur l'organisme vivant et la santé publique (Hatcher *et al*., 2008; Cavas *et al*., 2014) principalement les substances d'origine naturelle (Spyridopoulou *et al*., 2017).

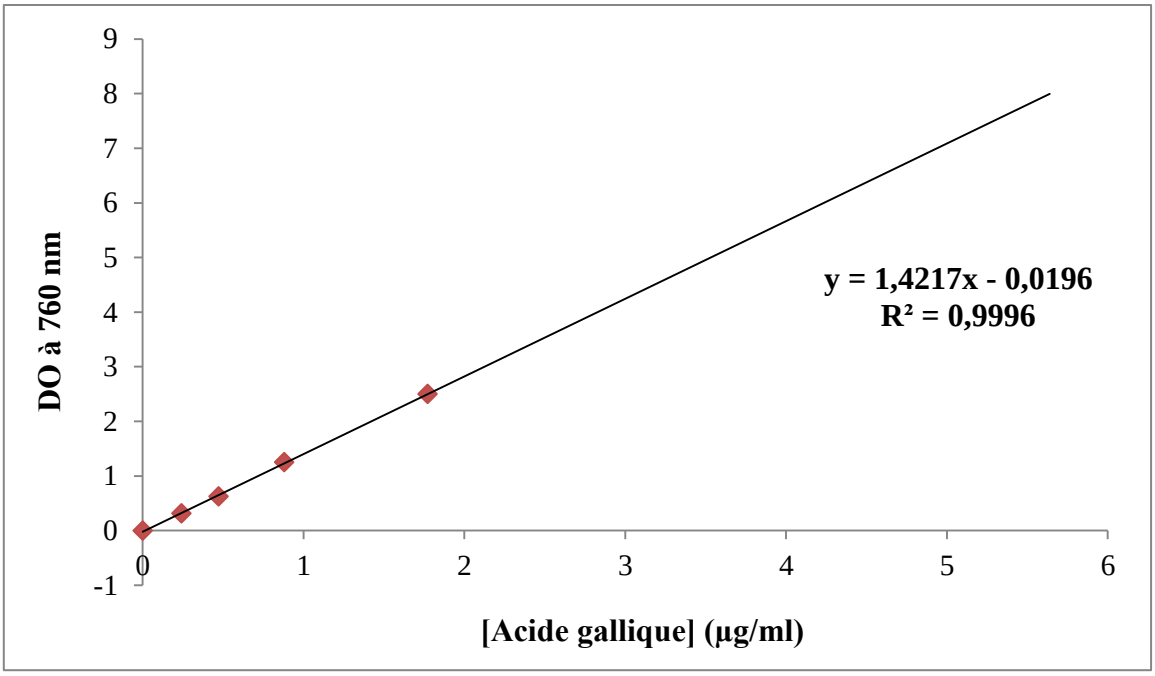
Pistacia lentiscus L. (Anacardiaceae) est l'une des plantes les plus utilisées traditionnellement pour ses propriétés médicinales. Les extraits de différentes parties de la plante présentent diverses activités : anti-inflammatoire, antioxydante, antimicrobienne et anticancéreuse (Mezni *et al*., 2016). En effet, l'huile fixe des fruits du pistachier lentisque est utilisée pour des objectifs thérapeutiques, en particulier pour le traitement des affections de la peau et des troubles des voies respiratoires. Néanmoins, la documentation consultée dans cette étude n'a pas rapporté suffisamment d'informations sur le sujet, et la répartition géographique limitée des utilisateurs de l'huile explique le manque d'études traitant ses effets thérapeutiques. Les études disponibles sont presque exclusivement réalisées par des chercheurs locaux qui ont constaté la popularité croissante de cette huile (Abdeldjelil *et al*., 2014).

Avec cette approche, nous nous sommes intéressées au cours de cette étude à mettre en évidence l'effet préventif de l'huile fixe de pistachier lentisque (PL) contre la toxicité aiguë pulmonaire et cérébrale induite par le benzo[a]pyrène dans un modèle murin. Pour atteindre cet objectif, dans un premier temps nous avons analysé phytochimiquement l'huile de lentisque.

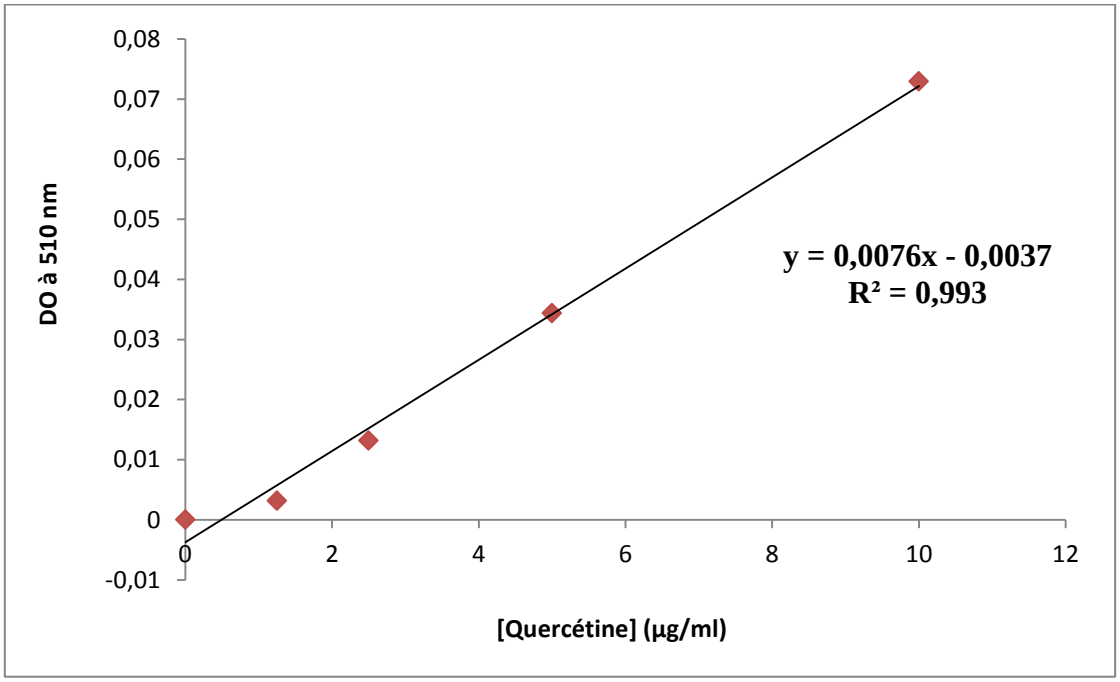
Ensuite, des méthodes expérimentales d'approches, tant biochimiques et histologiques, seront appliquées en commençant par l'examen microscopique des tissus (cérébral et pulmonaire). L'étude de la cytoprotection de l'huile de lentisque a été envisagée par l'évaluation des marqueurs du stress oxydatif :

- ✓ Les antioxydants enzymatiques tels que: la Catalase et la SOD, et non enzymatiques par la mesure des taux de GSH cytosolique.

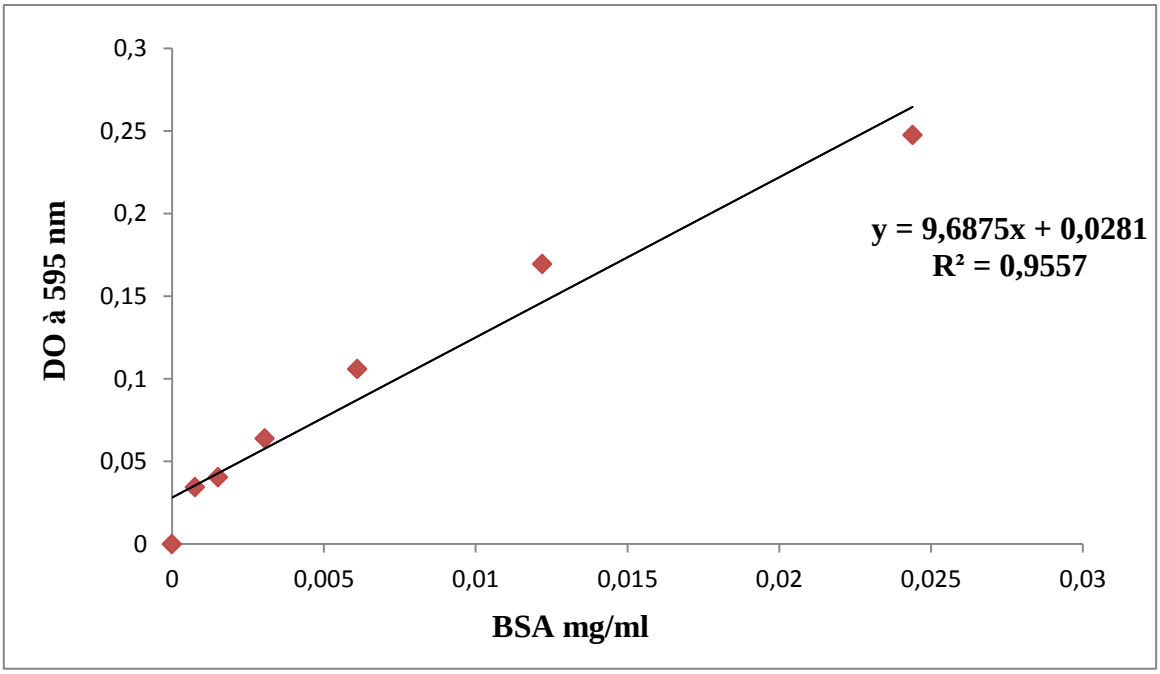
- ✓ La peroxydation lipidique par la mesure des taux du MDA cytosolique.



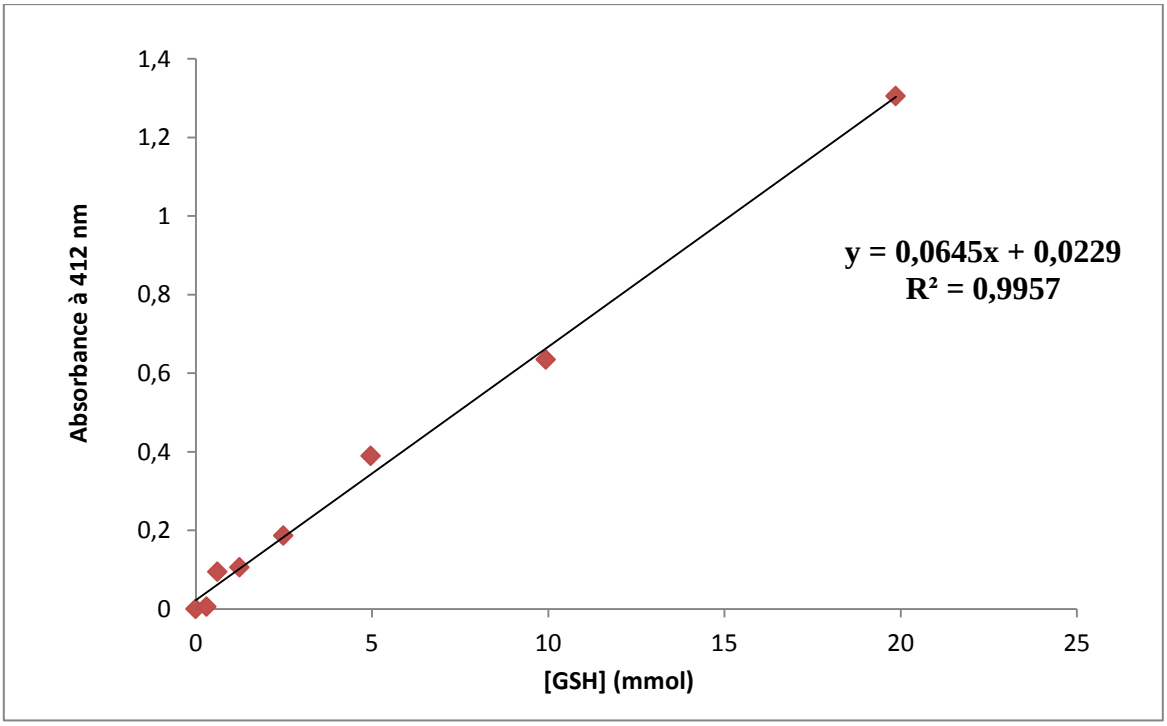
Annexe 1. Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols en µg/ml (Acide gallique utilisé comme standard).



Annexe 2. Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes en µg/ml (quercétine utilisée comme standard).



Annexe 3. Courbe d'étalonnage des protéines (BSA utilisée comme standard).



Annexe 4. Courbe d'étalonnage de glutathion (GSH).

1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont une classe de contaminants organiques polycycliques omniprésents dont la structure comprend d'au moins deux cycles aromatiques (noyaux benzéniques) condensés (Lu *et al*., 2019). Les HAPs ont trois principales sources : pyrogéniques (dérivés de la combustion), pétrogéniques (pétrole et ses dérivés) et biogéniques (Geier *et al*., 2018), ils se forment principalement au cours de la combustion incomplète de matières organiques dont les émissions anthropiques de HAPs dépassent largement leurs sources naturelles. Certains HAPs proviennent de sources naturelles de combustion telles que l'infiltration de gisements de pétrole ou de charbon, les volcans, les feux de forêts, la synthèse bactérienne et d'algues, et l'érosion des roches sédimentaires. Les principales sources anthropiques de HAPs sont les émissions industrielles, le chauffage résidentiel, la production d'asphalte, de coke et d'aluminium, la cigarette, et les émissions automobiles (Abdel-Shafy et Mansour, 2016).

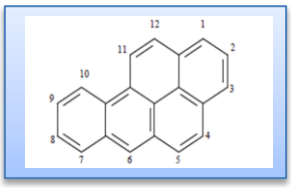
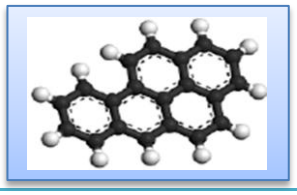
Les HAPs sont des composés très lipophiles persistants dans l'environnement ayant diverses structures et toxicités variées. L'exposition à ces polluants par différentes voies (ingestion, inhalation, et contact cutané) en milieu professionnel et non professionnel peut induire des effets indésirables aigus (irritations, vomissements) ou chronique (dommages hépatiques et rénaux et anomalies respiratoires) sur l'organisme humain, des effets tératogènes, immunosuppresseurs, génotoxiques et même cancérigènes, provoquant ainsi des cancers comme celui de la vessie, gastro-intestinaux et même pulmonaires. Ces effets dépendent principalement, de la voie, la concentration et la durée d'exposition à ces HAPs (Rengarajan *et al*., 2015).

Le benzo[a]pyrène (B[a]P) est le principal HAP cancérogène; sa capacité à induire la formation de tumeurs pulmonaires a été bien documentée, et il est classé par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) comme étant cancérogène pour l'homme (Vázquez-Gómez *et al*., 2018).

2. Le benzo[a]pyrène et ses sources d'exposition

Contrairement aux HAPs de faible poids moléculaire (à deux ou trois cycles benzéniques), le B[a]P est un hydrocarbure aromatique polycyclique de haut poids moléculaire, composé de cinq cycles benzéniques (Nzila, 2018), formé lors de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de la matière organique, son nom officiel selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) est benzo[*a*]pyrène et benzo(a)pyrène, son numéro de registre est le 50-32-8. Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le Tableau 1 (IARC, 1983; IARC, 2012; Beloglazova *et al*., 2018).

Tableau 1 : Les principales caractéristiques physico-chimiques du B[a]P (IARC, 1983; IARC, 2012; Beloglazova *et al*., 2018).

Propriété	
Formule moléculaire	$C_{20}H_{12}$
Structure chimique Semi-développée	 
Noms et autres abréviations communes	BaP**;** B(a)P**;** benzo [def] chrysene 3,4-benzopyrène**;** 6,7-benzopyrène 3,4-benz [a] pyrène**;** 3,4-benzpyrène**;** 4,5-benzpyrène
Poids moléculaire	252.31 (g/mol)
État physique	Solide cristallin, jaune pâle
Point d'ébullition	310 à 312 °C à 10 mm Hg
Point de fusion	179 à 179,3 °C; 178,1 °C
Hydrosolubilité	Insoluble 0,00162 mg / L à 25 °C; 0,0038 mg/ L à 25 °C
Solubilité dans d'autres milieux	Très soluble dans le chloroforme, soluble dans le benzène, le toluène et le xylène

Les HAPs sont largement présent dans le sol. L'exposition humaine au B[a]P se produit essentiellement par la consommation d'aliments et d'eau contaminés, il se trouve aussi dans les huiles végétales et se forme également à la suite de certaines méthodes de préparations des aliments gras grillés, au barbecue, ou fumés. Il a été rapporté que le contenu de B[a]P dans les aliments brûlés est 20 fois plus élevé que dans les aliments en général (Saunders *et al*., 2006; Li *et al*., 2019).

La pollution atmosphérique est une source principale de certains HAPs, et la possibilité d'exposition à eux dans les zones urbaines par la population générale est plus forte que dans les zones rurales. Les niveaux maximum de certains HAPs représentatifs présents dans l'air sont rapportés comme étant de 0,02 à 1,2 ng/m^3 dans les zones rurales et 0.15-19,3 ng/m^3 dans les zones urbaines. La fumée du tabac est une source importante d'HAPs, fumer une seule cigarette peut générer de 20 à 40 ng de benzo[a] pyrène, on estime qu'une personne fumant 20 cigarettes par jour

absorbe en moyenne 105 ng/jour de B[a]P et un fumeur passif 40 ng/jour (EFSA, 2008; Rengarajan *et al*., 2015).

3. Toxicocinétique du benzo[a]pyrène

Les effets toxiques des xénobiotiques tels que les HAPs dépendent principalement de leurs quantités absorbées, distribués, métabolisés, de leurs demi-vies et donc leurs élimination, ainsi que de leurs propriétés physicochimiques et ces interactions avec d'autres molécules (IARC, 1983; IARC, 2010).

3.1. Absorption et distribution

L'exposition humaine au benzo[a]pyrène se faite par trois voies: l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané, le caractère lipophile des HAPs facilite et augmente leurs absorption par les voies respiratoires, le tube digestif et la peau, et permet leurs distribution large dans l'organisme avec une grande affinité pour les tissus adipeux, où elles sont stockés. Cette absorption et distribution dépendent aussi expérimentalement chez les animaux de la voie et du véhicule (solvant) d'administration (IARC, 1983; IARC, 2010).

3.1.1. La voie respiratoire

L'absorption et la rétention de benzo[a]pyrène tritié (^{3}H-BaP) chez les rats après inhalation sous forme aérosol sont rapides et immédiates grâce à son taille inférieure à 2.5 µM et son prévalence. Une forte localisation de la radioactivité est remarquée dans les voies respiratoires supérieures, les ganglions lymphatiques thoraciques, les poumons, le foie, les reins, et les intestins, alors que les concentrations dans le cerveau et la rate sont plus faibles. la clairance pulmonaire est biphasique : une phase rapide avec une demi vie de deux heures (2h) qui précède une phase plus lente avec une demi vie de 25 à 56 heures (Mitchell, 1982; Li *et al*., 2019).

3.1.2. Par voie orale

L'absorption du benzo[a]pyrène par voie orale est facile, rapide et exponentiel (Rees *et al*., 1971). Elle est de 35% à 99% dans le tractus gastro-intestinal après deux à quatre heures d'une exposition directe par gavage, ou indirectement dans un régime alimentaire (EFSA, 2008), il est ensuite distribué d'une manière rapide dans plusieurs organes, principalement dans le foie, les poumons puis les reins et le cerveau (Saunders *et al*., 2006).

Des grandes concentrations de B[a]P ont été mesurées dans les ganglions lymphatiques thoraciques trois à quatre heures après une exposition intra-gastrique avec une relation

exponentielle entre la dose administrée et la concentration dans les tissus adipeux et mammaires (Rees *et al*., 1971), l'absorption du benzo[a]pyrène par voie orale était fractionnée est pas complète, et dont l'absorption intestinale dépend de son lipophilie, et de la présence d'autres substances telles que les sels biliaires ou les composants de l'alimentation (IARC, 2010).

3.1.3. Par voie cutanée

L'absorption cutanée du B[a]P appliquée localement, est facile et rapide dépendant de son caractère lipophile, et elle est facilitée par son biotransformation *in situ* (Storm *et al*., 1990; Jacques *et al*., 2010). Des différences inter-espèces de l'absorption du B[a]P ont été remarquées *in vitro* après vingt-quatre heures. La pénétration cutanée dans un tissu viable chez la souris était de 10% de la dose appliquée, de 1 à 3% chez l'homme, le lapin et le rat (Kao et Patterson, 1985). Dans une autre étude l'absorption de B[a]P marqué au ^{14}C en solution dans l'acétone par la peau humaine était de 56%, tandis que seulement 15% ont été absorbés lorsque la peau était exposée au sol de jardinage commercial enrichi au B[a]P marqué au ^{14}C (Moody *et al*., 2007), alors que l'absorption après 48 heures de l'exposition *in vitro* de benzo[a]pyrène marqué au ^{14}C dissous dans l'acétone était de 95% chez le rat, et 43% chez l'homme, et le pourcentage total d'absorption cutanée *in vivo* après 14 jours était de 70% chez le rat (Moody *et al*., 1995).

Il est à noter que l'exposition humaine au benzo[a]pyrène se faite principalement par exposition à la pollution atmosphérique par inhalation, contact cutané et par voie orale, et que l'injection du B[a]P par la voie intrapéritonéale est réalisée principalement *in vivo* chez des animaux de laboratoire, comme les traveaux réalisés par Deng *et al*. (2018).

3.2. Métabolisme et élimination

3.2.1. Métabolisme

Le benzo[a]pyrène est métabolisé par les microsomes hépatiques, cet organe contient les plus hauts niveaux d'enzymes nécessaires pour son bioactivation (Makiuchi *et al*., 2018; Smit *et al*., 2018), il est également biotransformé par d'autres organes tels que les poumons, le cerveau (Rouet *et al*., 1981; Mehta *et al*., 1979), la peau (Bourgart *et al*., 2018; Brinkmann *et al*., 2012), et le tractus gastro-intestinal (Autrup *et al*., 1982).

3.2.1.1. Induction des enzymes de métabolisation via le recepteur AhR

Le benzo[a]pyrène à la capacité de réguler son propre métabolisme *via* son interaction avec le récepteur d'hydrocarbure aryle (AhR), un facteur de transcription contrôlant l'expression des systèmes enzymatiques spécialisés, des enzymes impliqués dans les réactions de biotransformation cellulaire de phase I tels que les cytochromes P450 (CYPs) de la famille 1, principalement les cytochromes P450 (CYP) 1A1, 1A2, 1B1 et l'époxyde hydrolase 1 (EH1), ainsi de phase II de conjugaison et de détoxification tels que les uridines diphosphates glucuronosyltransférases (UGT) et les glutathions S-transférases (GST), et autres (Zapletal *et al*., 2019; Han *et al*., 2019; Darwish *et al*., 2018; Uno *et al*., 2018).

Le récepteur hydrocarbure aryle (AhR) est un xénosensor associé au métabolisme des xénobiotiques, activé par un ligand de la famille Per-Arnt-Sim de facteurs de transcription basiques hélice – boucle – hélice. Lorsqu'il est inactif, il réside dans le cytoplasme, et forme un complexe aux protéines chaperonnes, la protéine du choc thermique 90 (Hsp90) et d'autres protéines telles que la protéine p23 et la protéine d'interaction à l'AhR de type immunophiline (AIP). La liaison de l'AhR au ligand induit un changement de conformation au sein de la protéine, son dissociation de ses protéines chaperonnes et son translocation vers le noyau, où il forme un hétéro dimère avec le translocateur nucléaire du récepteur des hydrocarbures aryliques (ARNT). Ce hétérodimère AHR-ARNT se lie ensuite aux motifs de reconnaissance spécifiques sur l'ADN, à une séquence apparentée (TNGCGTG) connue sous le nom d'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) agissant en amont dans les domaines régulateurs (promoteurs) des gènes cibles, considérée comme la batterie de gènes «AHR-core» (Mao *et al*., 2018; Prokopec *et al*., 2019; Vázquez-Gómez *et al*., 2018).

L'AhR représente une voie majeure qui coordonne le métabolisme des xénobiotiques tels que le B[a]P, mais il est également impliqué aussi dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, l'inflammation, la formation des adduits d'ADN, du stress oxidative et même dans la cancérogenèse **(Figure 1)** (Procházková *et al*., 2018; Shinde et McGaha, 2018).

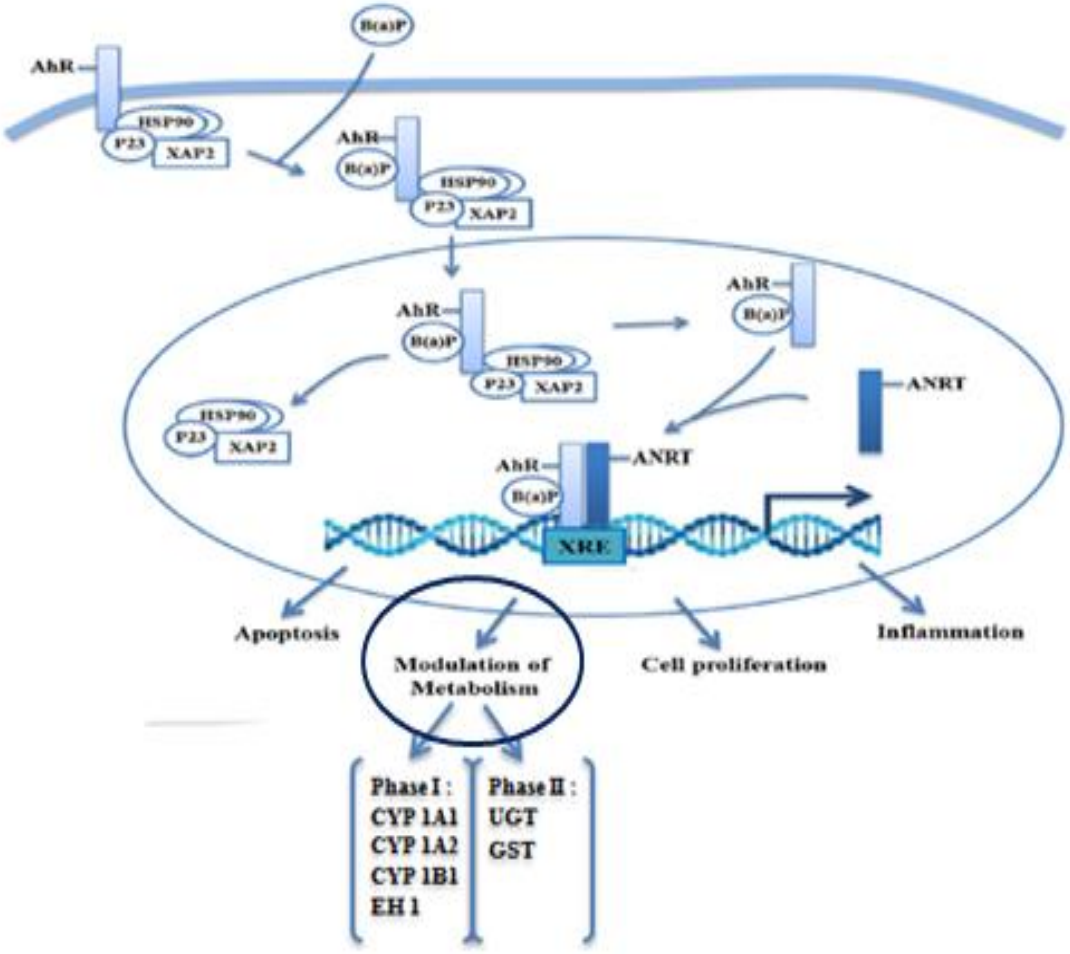


Figure 1 : *Schéma du mécanisme d'induction des gènes par le B[a]P via l'intermédiaire de l'AhR (Kasala et al., 2015) avec modification.*

3.2.1.2. La phase I du métabolisme du B[a]P

3.2.1.2.1. Les principales voies du métabolisme du B[a]P

Le benzo[a]pyrène implique trois voies principales dans son activation métabolique, la première est la voie du radical cation, la deuxième des diol-époxydes, et la troisième est d'*o*-quinones ou d'Aldo-céto réductases (AKR), **(Figure 2)** (Penning, 2014; Sar *et al*., 2018).

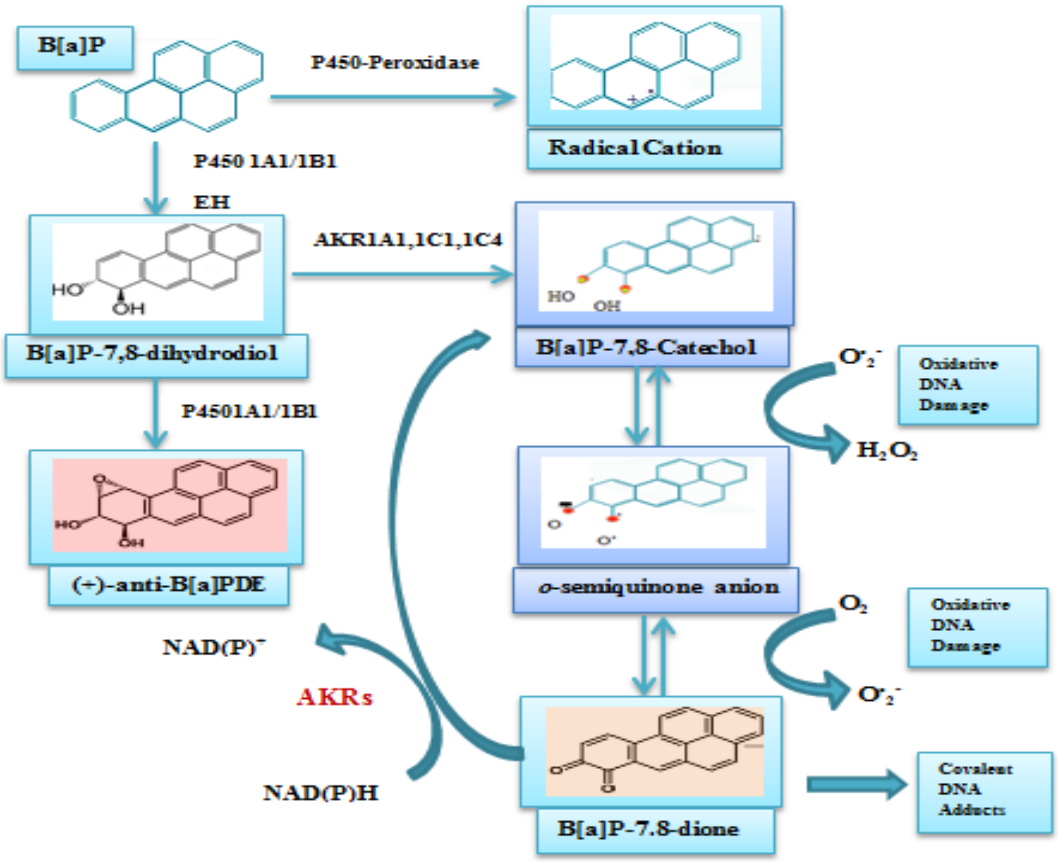


Figure 2 : *Les trois principales voies d'activation métabolique du benzo[a]pyrène (Penning, 2014).*

3.2.1.2.1.1. La voie du radical cation

Cette voie implique une oxydation mono-électronique du squelette carboné du benzo[a]pyrène, sur le carbone 6 (C6) en présence d'un peroxyde par la cytochrome P450 (P450) peroxydase, ou d'autres peroxydases tels que la prostaglandine H synthase (PGH-synthase) pour la formation d'un radical cation hautement électrophile qui réagit avec l'ADN. Le carbon activé subit une oxydation et aboutit à la formation du 6-hydroxy-B[a]P (6-OHBaP) qui par auto-oxydation va former des quinones: B[a]P-1,6, 3,6 ou 6,12-diones. Sous l'effet des réactions d'oxydoréduction, ces quinones donnent des radicaux anions semi-quinones, qui peuvent être retransformées en quinones diols, avec une génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Jiang *et al*., 2007; Moreau *et al*., 2015).

3.2.1.2.1.2. La voie de benzo[a]pyrène diol époxyde (BaPDE)

Au-cours de cette voie le B[a]P subit une mono-oxygénation catalysée par les isoformes de P450 (1A1 et 1B1) dépendantes du NADPH, pour donner une série d'oxydes d'arène instables, qui donnent des 3,7, ou 9-hydroxy-B[a]P ou subir une hydratation par l'époxyde hydrolase microsomale (EH) pour générer les B[a]P-7,8- ou 9,10-trans-dihydrodiols, La région non K du B[a]P-7,8-

dihydrodiol est monooxygénée par P450 1A1 / 1B1 pour donner le réactif anti-B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (anti-B[a]PDE) hautement réactif, électrophile en particulier dans la région baie de la molécule **(Figure 3)**, mutagène et peut initier une carcinogenèse. La formation du diol-époxyde nécessite une combinaison entre les isoformes P450 et de l'EH (Shi *et al*., 2017; Jiang *et al*., 2007; Moreau *et al*., 2015).

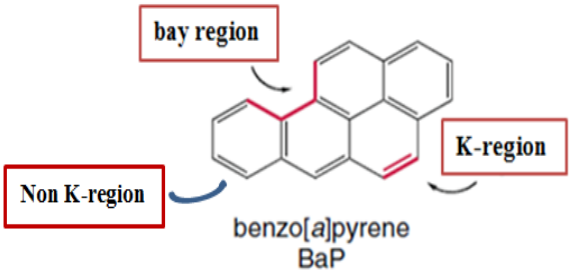


Figure 3 : *La région Baie et K du benzo[a]pyrène (Penning, 2011) avec modification.*

3.2.1.2.1.3 La voie d'*o*-quinones

Cette voie implique l'intervention des membres de la famille des aldo-céto réductases 1 (AKR1) tels que les AKR1A1 et AKR1C1-AKR1C4, D'abord le B[a]P-7,8-dihydrodiol est également oxydé aussi par la dihydrodiol déshydrogénase en présence de NAD(P)+ comme cofacteur pour former un cétol, puis ce cétol formé se réorganise spontanément pour générer un catéchol (Penning, 2017) instable qui subit une double oxydation dans l'air, la première pour former un anion *o*-semi-quinone, et la deuxième pour former un *o*-quinone (B[a]P-7,8-dione) (Penning, 2014). Ce dernier peut être aussi réduit de manière enzymatique et/ou non enzymatique au catéchol en établissant des cycles redox réversibles inutiles, qui aboutissent à la génération et l'amplification des ERO. Cette voie entraîne la formation des adduits ainsi des dommages oxydatives d'ADN, mais également une source majeure des ERO, de l'anion superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et de même du radical hydroxyle hautement réactif (Penning, 2017; Penning, 2014; Siddens *et al*., 2015).

3.2.1.3. La phase II de métabolisme du B[a]P

La majorité des métabolites du B[a]P issues de la phase I du métabolisme seront détoxifiés lors des réactions de phase II, qui catalyse leurs conjugaison en présence de cofacteurs tels que l'acide glucuronique, le sulfate, le glutathion ou l'acétate, par les enzymes de détoxification, les glutathion-S-transférases (GST), les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) et les sulfotransférases (SULT), et ensuite leurs conversion en produits plus hydrosolubles et facilement excrétables (Shi *et al*., 2017; Cederbaum, 2015).

3.2.2. Elimination

Le benzo[a]pyrène et ses métabolites sont éliminés principalement par le système hépatobiliaire et le tractus gastrointestinal (Yang *et al*., 1994). Des études ont montré que l'élimination du benzo[a]pyrène chez des animaux de laboratoire tels que les souris et les rats a été préférentiellement fécale quelle que soit la voie d'exposition. Des études animales ont montré que 24 % de la dose de B[a]P radiomarqué est présent dans la bile 8 heures après une administration intrapéritonéale (IP) (Kim *et al*., 2012) alors que la radioactivité cumulée éliminée en 7 jours dans les fèces atteint 80 % (Yang *et al*., 1994) contre 9 % dans les urines, après l'administration IP de ^{14}C-B[a]P à des rats (Yang *et al*., 1999).

Chapitre 2 : Mécanisme de toxicité pulmonaire et cérébrale par le B[a]P

1. Anatomie et physiopathologie pulmonaire et cérébrale

1.1. Les poumons

Les poumons sont des organes qui occupent la majorité de la cage thoracique, chacun d'entre eux est formé par la juxtaposition de plusieurs structures élémentaires identiques, les lobules pulmonaires. Dans chaque lobule, la bronchiole forme plusieurs branches et les ramifications forment à la fin les branchioles terminales. Chacun de ces dernières donne un sac pulmonaire avec une paroi très fine et qui est formée par des alvéoles pulmonaires **(Figure 4)** qui sont le siège des échanges gazeux par diffusion au niveau des poumons avec le sang (Lacombe, 2015).

Les poumons regroupent une variété de cellules, parmi elles les cellules de Clara qui représentent 80 % des cellules épithéliales des bronchioles terminales, elles sécrètent le surfactant qui tapisse les alvéoles et elles sont responsables de la libération du Cl^-. Alors que les alvéoles sont formées par des capillaires bordées par deux types des cellules épithéliales pavimenteuses simples, les cellules alvéolaires de type I représentant 40 % des cellules épithéliales recouvrant 90 % de la surface alvéolaire, et des cellules alvéolaires de type II à environ 60 % mais ne recouvrent que 10 % de la surface alvéolaire (Kierszenbaum, 2006).

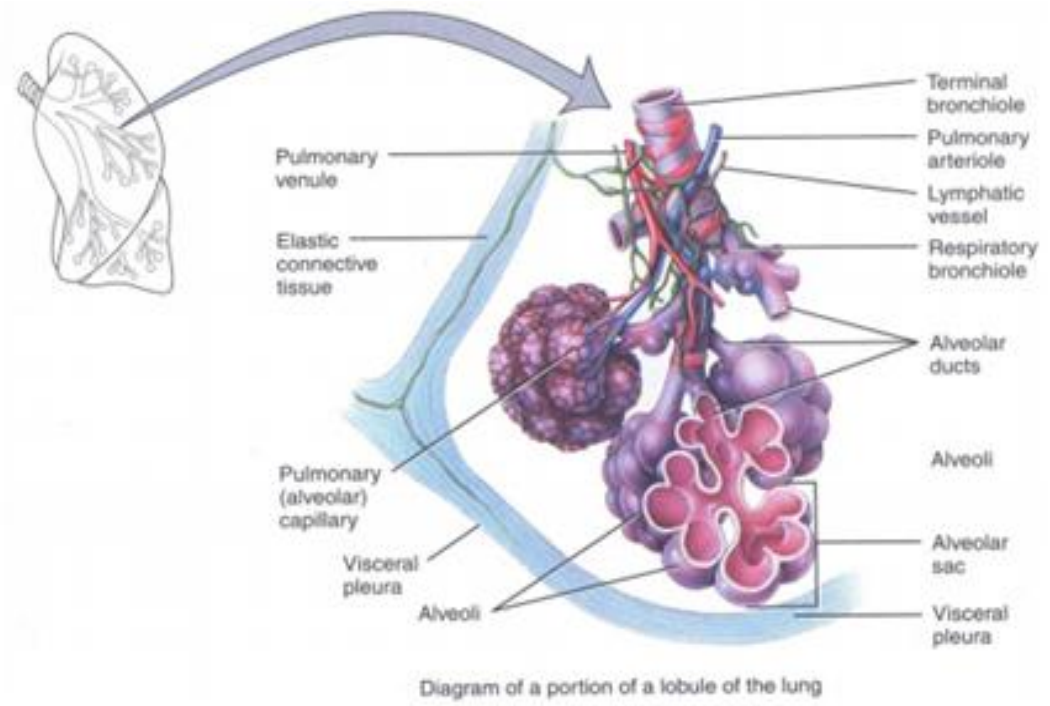


Figure 4 : *Description d'un lobule pulmonaire (Pena, 2006).*

1.1.1. Les pathologies des poumons

Les principales pathologies des poumons sont la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la mucoviscidose (fibrose kystique) et le syndrome de détresse respiratoire aiguë. La BPCO résulte au niveau des voies aériennes périphériques (bronchioles), elle inclut l'emphysème et l'asthme. Ce dernier est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une hypersensibilité respiratoire (Kierszenbaum, 2006).

1.1.2. Les effets toxiques du B[a]P sur les poumons

Des études ont montré que le B[a]P est responsable de plusieurs changements structurels et physiologiques dans les poumons, il induit également des mutations géniques, des aberrations chromosomiques, l'activation des oncogènes, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, des altérations épigénétiques et même des voies de signalisation, l'inflammation pulmonaire, l'œdème et différents troubles pulmonaires chroniques (Yang *et al*., 2018; Shahid *et al*., 2016).

Le B[a]P a été classé comme cancérigène du groupe 1 chez l'homme par CIRC, il induit des cancers du poumon principalement lors de son inhalation (Khan *et al*., 2018). la carcinogenèse chimique est un processus multi-étapes, subit généralement trois étapes, La première l'initiation, la deuxième la promotion et la troisième la progression, qui sont caractérisées par un grand changement d'évènements moléculaires et cellulaires pour transformer une cellule normale à une cellule néoplasique maligne. Parmi les carcinogènes chimiques le B[a]P, qui a des effets sur les trois stades de la cancérogenèse, ces effets sont de deux types principales, génotoxique et non génotoxique. La cancérogenèse pulmonaire par le B[a]P est bien documentée par plusieurs études sur des modèles animales généralement chez les souris, qui développent différents tumeurs comme les tumeurs épidermoïdes, dans un temps court et indépendamment de la voie d'administration, il a également induit des tumeurs du poumon en 20–22 semaines après une dose unique de 100 mg / kg par voie intrapéritoniale (IP), ou des tumeurs en 16 à 18 semaines par voie orale d'une dose de 50 mg / kg, deux fois par semaine pendant 4 semaines (Kasala *et al*., 2015).

1.2. Le système nerveux

Le système nerveux constitu l'ensemble des organes de commande de tous les éléments constitutifs de notre organisme, il est subdivisé en système nerveux cérébro-spinal et le système nerveux végétatif. Le système nerveux cérébro-spinal comprend le système nerveux central et le système nerveux périphérique. Le système nerveux central comprend la moelle épinière et l'encéphale. Cette dernière est logé dans le crâne, et est divisée en trois principales parties, le

cerveau le cervelet et le tronc cérébrale **(Figure 5).** Le cerveau est le plus volumineux parmi eux, il est constitué par deux lobes latéraux, qui sont les hémisphères cérébraux délimités l'un de l'autre par la scissure interhémisphérique. Deux couches constituent le cerveau l'une superficielle de substance grise qui représente l'écorce ou le cortex cérébrale, et l'autre profonde de substance blanche. Le cortex cérébrale a plusieurs fonctions, motrice, sensitive, sensorielle et du langage (Lacombe, 2015).

L'hippocampe fait partie du système limbique, il joue un rôle primordiale dans la consolidation de la mémoire. Il comprend deux principales composants, les Cornus ammonus et le gyrus denté (DG) (Keller *et al*., 2018).

Le système nerveux central est largement constitué de neurones, de cellules gliales, et de cellules endothéliales (Keller *et al*., 2018). Les neurones sont connectées entre eux en formant des synapses auxquels est créé un influ nerveux qui passe d'un neurone à autre grâce à des substances chimiques appellés médiateurs chimiques comme l'adrénaline, l'acétylcholine, l'histamine et la sérotonine (Lacombe, 2015).

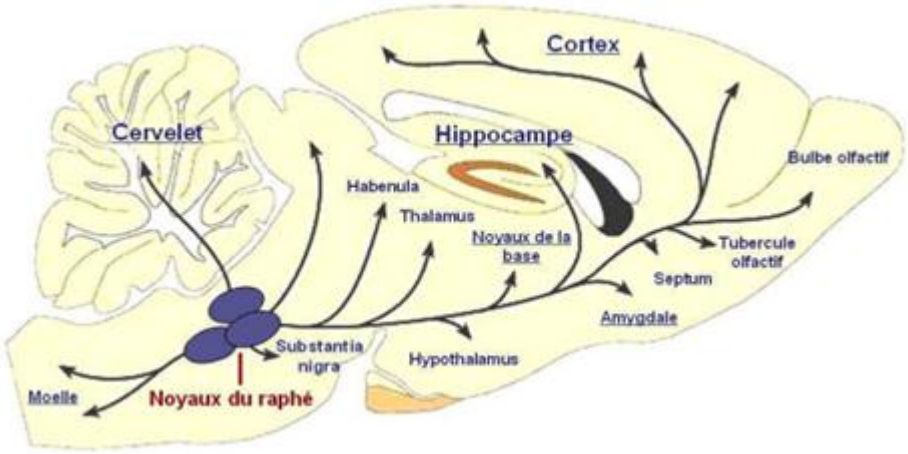


Figure 5 : *Les différents éléments structurelles du cerveau (Bussy, 2005).*

1.2.1. Les pathologies du système nerveux central

Les maladies du système nerveux central causées par la pollution de l'air à travers diverses substances et agents chimiques sont principalement des neuroinflammations, des troubles de la cognition et des changements neurodégénératives principalement dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Calderón-Garcidueñas *et al*., 2016). Ces troubles altèrent et détruisent la structure et la fonction du système nerveux central (Ransohoff, 2016). Parmi ces substances, les nanoparticules et les hydrocarbures aromatiques polycycliques tels que le benzo[a]pyrène (Calderón-Garcidueñas *et al*., 2016).

1.2.2. Le B[a]P provoque des troubles du cerveau

En tant que composé lipophile, le B[a]P franchit facilement la barrière hémato encéphalique, atteint le tissu cérébral et provoque des lésions cérébrales (He *et al*., 2016). Le B[a]P et ses métabolites ont la capacité de s'accumuler dans le cerveau, provoquant une neurotoxicité, qui entraîne des changements neurocomportementales chez l'adulte et le fœtus, de la mémoire par son impact sur l'hippocampe et le cortex préfrontal (PFC), et de la motricité. Il affecte la migration, la différenciation, la synaptogenèse, la myélinisation au cours du développement neuronal et entraîne après exposition prénatale un faible poids du fœtus à la naissance et une réduction du tour de tête. Récemment, des études sur les mécanismes sous-jacent de l'effet du B[a]P sur le SNC après une exposition chronique montrent une modulation des taux de plusieurs neurotransmetteurs, y compris la noradrénaline, l'acétylcholine, la dopamine et la sérotonine (Zhang *et al*., 2016; He *et al*., 2016).

Des études chez les animaux expérimentaux ont démontré que les dommages neuro-développementale sont dus à des déficits neuromusculaires autonomes et physiologiques avec une diminution de la réponse aux stimuli sensoriels (Patri *et al*., 2010).

2. Les mécanismes possibles de toxicité par le benzo[a]pyrène

2.1. Dommages d'ADN par le B[a]P : une bataille entre la formation d'adduits d'ADN et suppression

Le rôle principal des cytochromes P(CYP) 450, enzymes du métabolisme est d'ajouter des atomes d'oxygène aux anneaux du B[a]P afin de le rendre plus hydrosoluble, et de faciliter ultérieurement l'attachement des groupements de sucres et de glutathion pour son élimination. Plusieurs enzymes induisent l'activation du B[a]P en métabolites plus réactifs à l'ADN qui peuvent induire des modifications mais aussi la formation des adduits à l'ADN (Kasala *et al*., 2015). Les poumons ont été considérés comme le deuxième organe exposé à la formation d'adduits d'ADN après la rate et le foie après une administration orale du B[a]P chez un modèle de souris Muta (Madeen *et al*., 2019). Alors que des études chez la souris ont montré que les adduits d'ADN au niveau du cerveau sont de 50%, un pourcentage plus bas que dans le foie, les poumons, et de l'estomac antérieur, mais égale à ceux des reins, du côlon et des muscles (Chepelev *et al*., 2015).

Le B[a]P peut être métabolisé en quatre stéréo-isomères différents du B [a] P 7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE), le (+)-anti-isomère est le plus prédominant et puissant, Il se lie de manière covalente à l'ADN, préférentiellement à la position N^2 du nucléotide guanine, ce qui entraîne la formation de (+)-trans-anti-BPDE-N^2-dG **(Figure 6)**, un adduit d'ADN hautement mutagène (Kasala et *al*., 2015). Des études sur des modèles animaux expérimentaux ont montré des adduits

mineurs à la position N^6 de l'adénine, formant ainsi un adduits de N^6-désoxyadénosine (Alexandrov *et al*., 2010).

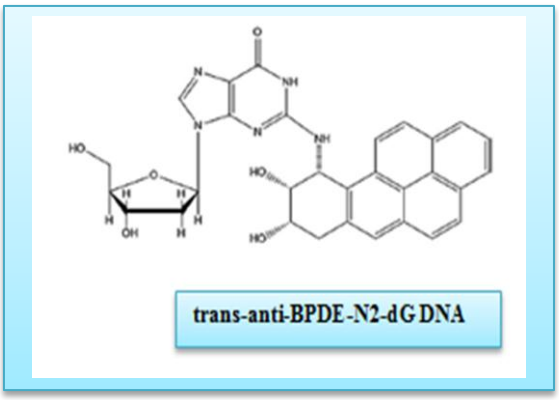


Figure 6: *La formation d'adduit entre le trans-anti-BPDE et la nucléotide de la Guanosine* ***(****Kasala et al., 2015).*

Avant la réplication s'il n'y a aucune efficacité d'élimination par les processus de détoxification et / ou de réparation par les enzymes de réparation de l'ADN de ces adduits d'ADN, ils peuvent engendrer des altérations génétiques, tels que des mutations, des ruptures de brin d'ADN, et contribuent aussi au processus de cancérogenèse (Kasala *et al*., 2016; Salam *et al*., 2018). Il est à noter que le BPDE conduit à une amplification des mutations dues aux erreurs des systèmes de réparation d'ADN qui sont stimuler par lui-même *in vivo* et *in vitro*, des aberrations chromosomiques, ainsi à une instabilité des gènes (Das et Bhutia, 2018; Tylichová *et al*., 2019).

Cette inefficacité de réparation est due à la résistance du (+)-trans-anti-BPDE-N^2-dG aux mécanismes de réparation des adduits et les adduits déformant de l'hélice d'ADN causées par le B[a]P, principalement celle par excision de nucléotide (NER). Si l'expression des gènes de ce dernier est réduite elle conduit au cancer du poumon. Au cours de la réplication, ces adduits "volumineux" conduisent à des transversions de paires de bases de G vers T, ces transversions induit par le BPDE sont également observées dans la protéine p53 ou KRAS et provoque le cancer du poumon (Kasala *et al*., 2015).

2.2. La génération de ERO par le B[a]P

Les métabolites B[a]P-quinones (BPQs) sont hautement réactifs, responsables de la génération de différentes espèces réactifs d'oxygène (ERO), l'anion superoxyde ($O^{\cdot-}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$), qui causent des dégâts oxydatifs aux macromolécules (ADN, ARN, protéines et lipides) entraînant une peroxydation lipidique, une

oxydation de protéines et des bases d'ADN, ce qui altère la structure et perturbe la fonction des cellules. Ces ERO provoquent une perte d'intégrité de l'ADN en ce réagissant avec la guanine, en formant la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG) **(Figure 7)**, cette dernière provoque lors de la réplication *in vivo* et *in vitro* une mutation ponctuelle par la transversion du nucléotide guanosine en thymidine. Il a été montré que les poumons des souris lors d'exposition au B[a]P présente des taux élevés de 8-OHdG (Das et Bhutia., 2018; Murawska-CiaŁowicz *et al*., 2011; Jiang *et al*., 2007).

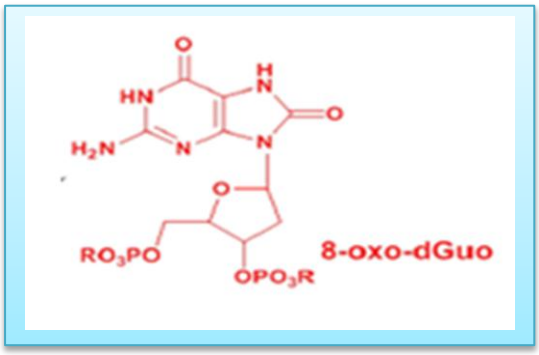


Figure 7 : *Modification de nucléotide Guaosine par les ERO (Penning, 2017).*

L'augmentation des ERO aboutit à un déséquilibre de l'état redox, et entraîne un stress oxydatif, et les endommagements d'ADN peuvent provoquer une inflammation résulte de fibrose pulmonaire, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) ainsi le cancer du poumon. Donc le maintien de l'homéostasie des ERO est indispensable au développement et à la survie normaux (Shahid *et al*., 2016).

Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre entre les antioxydants et les oxydants en faveur de ces derniers, Il est classé en fonction de son intensité, et selon le concept de Paracelsus, *"La dose fait le poison"*, du stress oxydant physiologique (Eustress) à la charge oxydante toxique qui entraîne des dommages aux biomolécules (Détresse). Selon la **figure 8**, l'exposition faible aux oxydants aboutit à une signalisation redox à des cibles moléculaires spécifiques, alors qu'une exposition élevée entraîne une perturbation de la signalisation redox et / ou des dommages aux biomolécules (cibles aspécifiques). Ces oxydants ont deux principales sources endogènes et exogènes et sont contrôlés par des processus d'élimination (puits). Une réponse adaptative est impliquée dans leurs modulations et neutralisation (Sies, 2018).

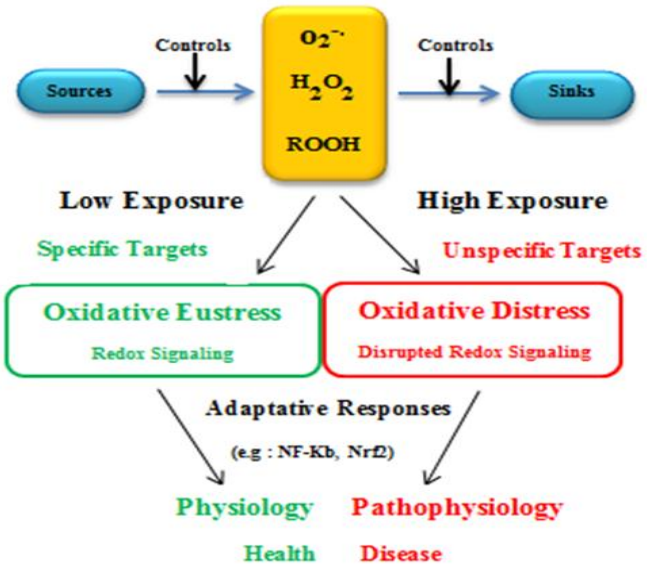


Figure 8 *: Le stress oxydant et sa relation avec la signalisation redox (Sies, 2018).*

Les ERO sont hautement réactives, et comprennent deux groupes principales, les radicaux libres représentées par l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet ainsi les espèces non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène (Zhang *et al*., 2016), Le terme "Radicaux libres" est défini comme des espèces chimiques possédant des électrons non appariés (Katakwar *et al*., 2016).

2.3. La mitochondrie et le B[a]P

2.3.1. Généralités sur la mitochondrie

La mitochondrie est un organite d'une taille variable comprise entre 0,75 à 8 µm, elle est entourée par deux membranes (Chistiakov *et al*., 2018), l'un est externe et l'autre est interne qui sépare l'espace intermembranaire (IMS) de la matrice. Elle comprenne plus de 1200 protéines, seule 13 d'entre elles sont codées par un ADN circulaire, l'ADN mitochondrial de mammifère (ADNmt), ces 13 protéines sont des protéines de phosphorylation oxydative (OXPHOS) entrent dans la composition de tous les complexes de la chaîne de transport d'électrons (ETC) sauf pour le complexe II, dont les composants sont exclusivement codé dans le génome nucléaire (Shpilka *et* Haynes, 2018; Quiros *et al*., 2016).

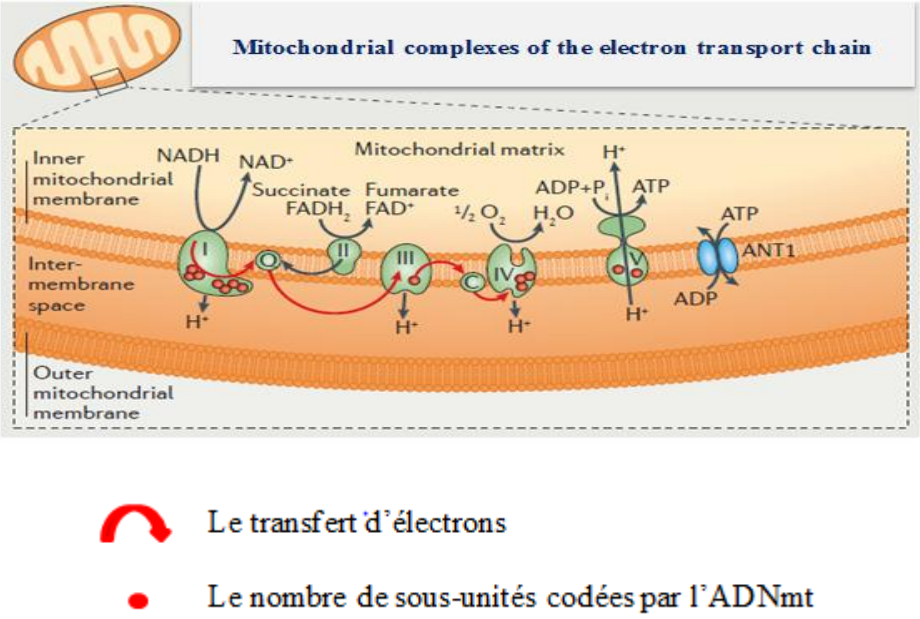


Figure 9 : *La phosphorylation oxydative et la chaîne respiratoire mitochondriale (Suomalainen et Battersby, 2018).*

2.3.2. Les dommages de la mitochondrie causés par le benzo[a]pyrène

Une étude récente montre que les dommages de l'ADN mitochondriale (ADNmt) associés au BPDE n'aboutissent pas à des mutations de l'ADNmt d'une manière directe, ils dépendent fortement de la génération des ERO, qui causent des mutations dues à des erreurs lors de la réplication ou des erreurs des dommages causés à l'ADN ou l'absence de la réparation par excision de nucléotide de l'ADNmt . Le B[a]P provoque une surproduction des ERO, et une diminution du nombre (Quantité) et du contenu (Qualité) de copies de l'ADN mitochondrial dans les cellules pulmonaires (Das et Bhutia., 2018). Le B[a]P provoque le dysfonctionnement mitochondrial, Il a été démontré que le B[a]P empêche la phosphorylation oxydative (OXPHOS) des mitochondries pulmonaires dans des modèles *in vivo* avec un déclin des activités des complexes mitochondriaux I–IV et la diminution de la synthèse d'adénosine triphosphate (ATP), aboutissant à des troubles respiratoires (Das et Bhutia., 2018).

3. Les systèmes antioxydants endogènes

L'hormèse et la mitohormèse sont deux phénomènes impliqués dans les réponses adaptatives au stress. pour le maintien de l'homéostasie redox, le principale «régulateur maître» est le système Nrf2/Keap1, Après la translocation du facteur nucléaire érythroïde 2 lié à facteur 2 (Nrf2) vers le noyau, un facteur de transcription qui active un motif d'enzymes de défense, des gènes protecteurs antioxydants. Parmi les protéines antioxydantes régulées par le Nrf2, la

superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase 1 (GPx-1) et le NAD(P)H: quinone oxydoréductase 1 (Sies, 2018; da Costa *et al*., 2019) (NQO1) et le glutathion (GSH) en se liant à l'élément de réponse antioxydante (ARE) ou à l'élément de réponse électrophile (EpRE) dans la région promotrice de ces gènes cibles (Dornas *et al*., 2019).

Les antioxydants sont des substances ou des agents qui éliminent les métabolites réactifs de l'oxygène, bloquent leur génération ou améliorent les capacités des antioxydants endogènes (Katakwar *et al*., 2017). Les antioxydants enzymatiques tels que la SOD, la CAT et le Gpx, éliminent de manière synergique les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et empêchent la peroxidation lipidique (LPO) (Salam *et al*., 2018).

- **La Superoxyde Dismutase SOD:** Protège les cellules contre la peroxydation lipidique (LPO) médiée par les radicaux superoxydes ont les converti en peroxydes d'hydrogènes, et protège ainsi les cellules contre les effets toxiques de l'anion superoxyde (Salam *et al*., 2018).
- **La Catalase CAT:** C'est une protéine hémique qui catalyse la dégradation de l'hydrogène à l'eau, et entre dans la protection des constituants de la cellule contre les dommages oxydatives (Salam *et al*., 2018).
- **La glutathion peroxydase GPx:** Considérée comme première ligne de défense contre le stress oxydatif, elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en sous-produits inoffensifs. La GPx et la glutathion S transférase (GST) sont des enzymes dépendant du glutathion (GSH) qui génère du disulfure de glutathion (GSSG) dans les processus de détoxication (Salam *et al*., 2018; Ji *et al*., 2016).
- **Le Glutathion (GSH):** Le GSH joue un rôle vital dans la détoxification, en jouant un rôle important comme antioxydant des ERO. Les niveaux réduits de GSH signifient une augmentation du stress oxydatif (Salam *et al*., 2018).
- **La Glutathion réductase:** Joue un rôle principal dans la régénération du GSH à partir du GSSG, par la maintenance de l'équilibre entre le couple redox. C'est une enzyme importante pour maintenir la concentration intracellulaire en glutathion réduit, la régénération du GSH et garantit sa disponibilité aux enzymes GST et GPx pour leurs bon fonctionnement (Salam *et al*., 2018; Ji *et al*., 2016).

4. L'effet du B[a]P sur les anti-oxydants endogènes

La modification de l'homéostasie redox est une étape principale de la toxicité induite par le B[a]P, selon Dhatwalia *et al*. (2019), les niveaux plus élevés d'ERO et la diminution des

antioxydants endogènes (SOD, CAT, GR, GST, GPx et GSH) indiquaient clairement l'imposition d'un stress oxydant chez les animaux exposés au B[a]P. Les faibles niveaux de GSH/GSSG et l'activité réduite d'enzymes antioxydantes endogènes, à savoir, SOD, CAT, GST et GR, observés dans les tissus pulmonaires d'animaux exposés au B[a]P ont également été rapportés dans des études précédentes (Bodduluru *et al*., 2015; Kumar *et al*., 2016; Sehgal *et al*., 2012).

Selon Shahid *et al*. (2017), le traitement au B[a]P a égélement entraîné une production importante d'ERO qui aboutit finalement à l'épuisement du GSH. En outre, il a été constaté que les activités enzymatiques des antioxydants telles que GR, GPx,SOD, CAT, GST ont été diminuées chez les souris traitées avec le B[a]P.

1. Généralités sur *Pistacia lentiscus* L.

Le pistachier lentisque « *Pistacia Lentiscus Linn.* », couramment appelé « Dro » en arabe local, est un arbrisseau ramifié de trois mètres de hauteur, à odeur de résine fortement âcre. Ses feuilles composées paripennées et persistantes le distinguent des autres espèces (Bammou *et al*., 2015), appartenant à la famille des Anacardiacea, et caractérise les régions méditerranéennes (Boukeloua *et al*., 2012).

2. Description botanique

Pistacia lentiscus L. se caractérise par :

- **Les fruits:** sont des baies globuleuses d'environ 5 mm de diamètre, monospermes, d'abord rouges, puis noirs à la maturité (novembre à janvier).
- **Les feuilles:** sont persistantes, composées à nombre pair de folioles coriaces étroites et pointues **(Figure 10)**.
- **Les fleurs:** sont unisexuées d'environ 3 mm de large qui se présentent sous forme de grappe (floraison : mars –mai) **(Figure 10)**.
- **Le mastic:**est un suc résineux issu de l'incision du tronc de cet arbuste (Botineau, 2015).

Figure 10 *: Feuilles et fruits de P. lentiscus* L. *(Ben Douissa, 2004).*

3. Taxonomie et classification botanique de *Pistacia lentiscus* L.

La taxonomie rapportée dans le tableau ci-dessous (Tableau 2) a été décrite par Ansari *et al*. (2012).

Tableau 2 : Classification taxonomique de *Pistacia lentiscus* L. (Ansari *et al*., 2012).

Taxonomie	
Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Apétale
Ordre	Sapindales
Famille	Anacardiacées
Genre	***Pistacia***
Espèce	***Pistacia lentiscus* L.**

4. Répartition géographique

Pistacia lentiscus L. est retrouvée couramment en sites arides sur le pourtour méditerranéen de l'Europe, d'Afrique et d'Asie **(Figure 11)**, jusqu'aux Canaries et au Portugal (Bellakhder, 1997). En Algérie, la présence du pistachier est très répandue dans les sites subhumides, semi-aride et dans le bassin de la Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (Belhadj, 2001).

Figure 11*: Répartition géographique de Pistacia lentiscus* L. *(Al-Saghir, 2006).*

5. Phytochimie de l'espèce *Pistacia lentiscus* L.

En raison de sa large utilisation en médecine traditionnelle, les différentes parties de *Pistacia lentiscus* L**.** En fait l'objet de plusieurs études phytochimiques à fin d'identifier leurs principes actifs.

- **Les fruits**

Les études phytochimiques montrent que les fruits de *Pistacia lentiscus* L. présentent une très forte teneur en anthocyanes, leuco anthocyanes, tannins totaux, tannins galliques, flavonoïdes, glucosides et amidon. Avec une présence modérée des mucilages et une absence totale des saponosides, des sénosides, des quinones libres, des coumarines, des irridoïdes et des alcaloïdes (Arab *et al.*, 2014).

- **Les feuilles**

Les analyses révèlent une très forte teneur des feuilles en leucoanthocyanes, en saponosides,en sénosides, en alcaloïdes et en tannins totaux avec une forte teneur en tannins galliques et flavonoïdes et une teneur moyenne en glucosides (Arab *et al.*, 2014).

- **L'huile essentielle**

Les huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. sont obtenues par hydrodistillation des différentes parties aériennes de la plante ainsi que de sa résine (Amhamdi *et al.*, 2009). L'huile obtenue présente un aspect liquide et limpide, elle est de couleur jaune dégageant une odeur aromatique, très puissante et pénétrante. Pour 100 g de matière végétale, le rendement moyen en huile essentielle peut varier de 0.14 à 0.4% en fonction de l'origine de la plante, la nature de ses parties utilisées, la période de récolte et la méthode d'extraction (Arab *et al.*, 2014). Selon Amhamdi *et al.*, (2009**),** les principaux composants de l'huile essentielle des feuilles de *Pistacia lentiscus* étaient: myrcène (39.2%), limonène (10.3%), gurjunène (7.8%), germacrène (4.3%), pinène (2.9%), murolène (2.9%), humulène (2.6%), epi bicyclosesquiphellandrène (2.5%), α - pinène (2.2%).

- **L'huile végétale**

L'huile fixe (végétale) de *Pistacia lentiscus* L. est une huile alimentaire utilisée a usage culinaire, cosmétique et médicinale. Le rendement en huile varie de 11,95% (fruits non mûres) à 45,97% (fruits trop mûrs); une différence liée à une augmentation progressive de la teneur en huile des fruits de *Pistacia lentiscus* L. au cours du processus de maturation du fruit (Mezni *et al*., 2014).

L'analyse de la composition chimique de cette huile réalisée par Mekni, (2011) a montré une prédominance de l'acide linoléique (47.02%), les autres principaux constituants sont par ordre decroissant d'importance : 3-Undecylphénol (18.86%); acide palmitique (15.64%) et le 3-pentadecylphénol (14.11%).

6. Méthode d'extraction de l'huile de *Pistacia lentiscus* L.

Selon Abidi *et al*. (2017), les baies de *Pistacia lentiscus* L. ont été soumis à une étape de séchage pendant 10 jours, puis l'huile a été extraite par une méthode traditionnelle à différentes étapes. D'abord, les fruits étaient moulou en utilisant des meules en une pâte, qui était ensuite mélangé pendant 30 minutes. Après broyage, la pâte a été étendue sur des disques de fibre et a été pressé. L'eau chaude était alors couler sur les côtés des disques pour augmenter la filtration de l'huile. L'homogénat a ensuite été séparé par décantation. À la fin de cette phase, l'huile grasse de *P. lentiscus* était produit.

7. Activités pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Pistacia lentiscus* L.

Selon Bammou *et al*. (2015) *Pistacia lentiscus* L. est utilisée traditionnellement dans le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, des calculs rénaux. Le mastic de Pistacia a été utilisé par les guérisseurs traditionnels pour le soulagement des douleurs abdominales, des maux d'estomac, la dyspepsie et l'ulcère gastroduodénal. Plusieurs études ont également signalé que l'huile essentielle des parties aériennes de *Pistacia lentiscus* L. possède des propriétés antifongiques et antibactériennes appréciables. L'huile végétale de *pistacia lentiscus* L. est particulièrement utilisée pour soigner les blessures , les maladies gastriques, elle est également utilisée pour le soin des maladies du foie, les troubles dermatologiques et pour le traitement de la toux et de l'asthme (Mezni *et al*., 2014; Haouli *et al*., 2015).

- **Activité antioxydante**

Les acides phénoliques des plantes agissant comme des antioxydants ont été largement enquêtés, pour cette raison, de nombreuses études ont été rapportées sur les propriétés antioxydantes de *Pistacia lentiscus* L. L'huile essentielle qui a été recueillie à stade de floraison contient une proportion élevée d'hydrocarbures monoterpéniques (35%), ont montré une capacité plus élevée de piégeage des radicaux libres. Les triterpènes bioactifs de l'huile essentielle ont également montré des propriétés antioxydantes, donc ce sont utilisés dans les aliments fonctionnels en raison de cette propriété. Dans une autre étude, l'acide galloylquinique isolé à partir des feuilles de cette plante s'est avéré avoir la propriété antioxydante car il était fortement réduit l'oxydation de

LDL (par le test LDL) , alors que dans autre l'effet antioxydant de *Pistacia lentiscus* L. a été déterminé en mesurant leur capacité à supprimer la peroxydation lipidique induite par le fer dans l'homogénat de foie de rat (Ansari *et al.*, 2012). D'autres études ont montrées que *Pistacia lentiscus* L. possède d'autres activités, antibactérienne et antifongique (Benhammou, 2008), anti-inflammatoire (Bouriche *et al*., 2013).

III. Matériel et méthodes

L'étude expérimentale a été effectuée au laboratoire de recherche de Toxicologie Moléculaire, à l'université de Jijel. Elle a pour but d'élucider sur un modèle murin l'effet préventif de l'huile fixe de fruits de *Pistacia lentiscus* L. de la région de Texenna contre le stress oxydatif et la toxicité pulmonaire et cérébrale induite par le benzo[a]pyrène (B[a]P) provient de *Sigma-Aldrich* (USA), avec une étude phytochimique de l'huile.

III.1. Etude phytochimique de l'huile de *Pistacia lentiscus* L.

Le choix de l'huile de lentisque comme sujet dans ce travail a été guidé non seulement par les nombreuses utilisations traditionnelles qui sont répertoriées mais aussi par le fait que la plante *Pistacia lentiscus* L. est très abondante dans la région Méditerranéenne, et aussi très étudiée localement en Algérie.

Sur cette base, nous avons utilisé l'huile fixe de lentisque de la région de Texenna de la wilaya de Jijel (Nord-est de l'Algérie) datant de Novembre 2019.

- **Préparation d'un extrait hydro-méthanolique de l'huile fixe des fruits de *Pistacia lentiscus* L. (L'huile de lentisque)**

Les polyphénols et les flavonoïdes ont été extraits de l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* L. selon la méthode décrite par Cert *et al*. (2007). 2 g d'huile ont été mélangés avec 5 ml de méthanol/eau (80/20; v/v) pendant 1 min à l'aide d'un appareil vortex. Le mélange a ensuite été isolé dans un bain à ultrasons pendant 15 min à température ambiante, puis centrifugé à 5000 rpm pendant 25 min. La phase méthanolique a été retirée et stockée dans un endroit sombre (Mezni *et al*., 2016). L'extrait a ensuite été amené à sec dans un évaporateur rotatif sous vide à 40°C. Le résidu a été dissous dans 1 ml du méthanol (Gutfinger, 1981).

Le rendement d'extraction selon Stanojevic *et al*. (2009) est le rapport entre le poids de l'extrait après évaporation du solvant et le poids de l'huile utilisée. Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$\textbf{Rendement d'extraction (\%)} = (P_f / P_h) \times 100$$

Où :

P_f : Poids de l'extrait après évaporation du solvant (g);

P_h : Poids de l'huile utilisée au départ (g).

III.1.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en composés phénoliques de l'huile de PL a été dosée selon la méthode décrite par Singleton *et al*. (1999) selon Folin-Ciocalteu (FC). La méthode de FC a été très utilisée pour le dosage des phénols, c'est une méthode colorimétrique qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique et acide phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation d'un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène dont l'absorption a été mesurée à 760 nm. La température et le temps de la réaction influent le développement de la coloration (Ollivier et *al*. 2004; Singleton et *al*. 1999).

Brièvement, 10 ml de réactif de FC dilué au 1/10ème dans l'eau distillé ont été ajoutés à 2 ml de l'extrait méthanolique avec une dilution de 1/1000ème dans le méthanol, Après une minute et avant 8 minutes d'incubation, 8 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5%, ont été ajoutés au mélange pour un volume final de 20 ml. Après 2 heures d'incubation à environ 23°C, l'absorbance de la colocation générée est lue à 760 nm grâce à un spectrophotomètre UV-Visible SPECORD 50 PLUS, est cela contre un blanc (Ollivier *et al*., 2004).

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique avec des concentrations de (0-2.5 µg/ml) préparées dans l'eau distillée et dans les mêmes conditions que l'extrait (Annexe 1). Les résultats sont exprimées en microgramme équivalent d'acide gallique par gramme de l'huile (µg EAG/g de l'huile).

III.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes a été mesurée selon la méthode décrite par Dewanto et *al*., (2002). La technique est basée sur la formation d'un complexe jaune entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). Pour cela, 250 µl de l'extrait méthanolique dilué à 1/1000ème ont été mélangés avec 75 µl de Nitrite de sodium ($NaNo_2$ à 5%). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, 150 µl de $AlCl_3$ à (10%) et 500 µl d'Hydroxyde de sodium (NaOH) (1M) ont été ajoutés. En utilisant l'eau distillée, le mélange a été ajusté à 2,5 ml et l'absorbance a été lu directement contre un blanc à 510 nm par un spectrophotomètre UV-Visible SPECORD 50 PLUS. La teneur en flavonoïdes est exprimée en microgramme équivalent de quercétine par gramme de l'huile (µg EQ/g de l'huile), en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine avec des concentrations de (0-10 µg/ml) préparées dans l'eau distillé et dans les mêmes conditions que l'extrait (Annexe 2).

III.2. Etude de l'effet préventif de l'huile fixe de *Pistacia lentiscus* L. contre la toxicité aiguë induite par le B[a]P

III.2.1. Entretien des animaux

L'étude a été réalisée sur des souris Swiss albinos provenant de l'institut Pasteur Alger (Algérie). Les animaux pesant environ 30g ont été élevés dans des cages de 06 souris chacun, Ils ont libre accès à l'eau de robinet et à la nourriture. L'animalerie a été maintenue à une température ambiante (20-26°C), une hygrométrie de 60% et un cycle jour-nuit 12 h-12 h. Le renouvellement de la litière a été fait trois fois par semaine. Après une mise en quarantaine de 7 jours les souris ont été utilisées pour effectuer cette étude.

III.2.2. Traitement des animaux

16 souris ont été utilisées dans cette étude et ont été réparties en 4 groupes :

- Le groupe 1 (témoin n = 3) a servi de témoin en recevant 0.3 ml d'huile d'olive (véhicule de dissolution du benzo[a]pyrène et de HFPL) par voie orale pendant 5 jours, le 6ème jour le véhicule est injéctée par la voie IP.

- Le groupe 2 (B[a]P n = 3) regroupant les animaux recevant une dose unique de benzo[a]pyrène de 100mg/kg (Deng et *al*., 2018) dissout dans l'huile d'olive et administrée par voie intra-péritonéale le 6ème jour.

- Le groupe 3 (HFPL + B[a]P) regroupant 5 souris recevant de l'huile fixe de fruits de *Pistacia lentiscus* L. à la dose de 1.66 ml/Kg (Attoub *et al*., 2014) quotidiennement pendant 5 jours par voie orale suivie d'une dose unique de 100 mg/kg de B[a]P par voie intra-péritonéale le 6ème jour.

- Le groupe 4 (HFPL n = 5) recevant l'HFPL (1.66 ml/Kg) (quotidiennement pendant 5 ^{ème} jour par voie orale.

III.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement des organes

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation cervicale après 48 h du traitement au B[a]P, durée suffisante à l'induction de la toxicité aigüe. Au moment du sacrifice, chaque organe (poumon et cerveau) a été collecté, lavé à plusieurs reprises avec une solution de Chlorure de sodium (NaCl 0.9%) puis pesé et divisé en deux fractions :

- La première a été pesée puis stocké à -20°C jusqu'à l'analyse du stress oxydatif cellulaire.
- La seconde a été plongée dans le liquide fixateur (formol tamponé) pour l'étude histologique.

III.2.4. Examen microscopique

❖ **Fixation et inclusion**

La fixation des organes a été réalisée immédiatement après le prélèvement des organes à température ambiante dans le formol tamponé (0.1 M à pH 7) (Harrison, 1984). La durée minimale de la fixation est de 48 h. Les organes ont ensuite été déshydratés dans des bains successifs de 20 minutes chacun dans l'éthanol 70°, de l'éthanol 90°, de l'éthanol absolu puis deux bains de xylène. Enfin l'organe a été prêt pour son inclusion dans la paraffine.

❖ **Coupes histologiques et étalement**

Chaque bloc de paraffine a été débité à l'aide d'un microtome en coupes de 5 µm d'épaisseur, les coupes ont été étalées et collées sur des lames

❖ **Déparaffinage et réhydratation**

Le déparaffinage des coupes a été réalisé avec deux bains successifs de 15 minutes chacun dans du xylène suivis de deux autres bains de même durée d'éthanol absolu. Les coupes ont été réhydratées en les plongeant dans des bains successifs d'éthanol 95°, deux bains d'éthanol 70° et un bain d'eau distillée.

❖ **Coloration et montage des coupes**

Les coupes ont été colorées par l'hématoxyline 1% suivie de l'éosine (H&E), l'hématoxyline colore notamment les noyaux en bleu/violet, alors que l'éosine colore le cytoplasme en rose.

III.2.5. Evaluation des paramètres cytosoliques du stress oxydatif pulmonaire et cérébral

❖ **Préparation de la fraction cytosolique**

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par (Iqbal *et al*., 2003). Pour cela 0,4 g de tissu (pulmonaire et cérébral) ont été coupés et homogénéisés avec un volumes de tampon phosphate (0,1 M; pH 7,4) contenant du KCl à 1,17% à l'aide d'un broyeur de Dounce. L'homogénat a été d'abord centrifugé à 2000 tours/min pendant 15

minutes à 4°C pour séparer les débris nucléaires ensuite à 9600 tours/min, pendant 30 minutes. Le surnageant ainsi obtenu a été utilisé comme source pour le dosage des paramètres cytosoliques.

III.2.5.1. Dosage du glutathion cellulaire (GSH)

La méthode que nous avons employé (Akerboom et Sies, 1981) a été basée sur l'évaluation du contenu en groupement –SH par spectrophotométrie. Lors de l'oxydation des protéines, les groupements SH sont oxydés et forment des ponts disulfures S-S **(Figure 12)**.

Le principe du dosage des groupements -SH est basé sur leur réaction avec le réactif d'Ellman, le 5-5'-Dithiobis-(2-acide NitroBenzoïque) (DTNB) pour former des quantités stoechiométriques de TNB (thionitrobenzoate), un composé jaunâtre ayant une densité optique maximale à 412 nm.

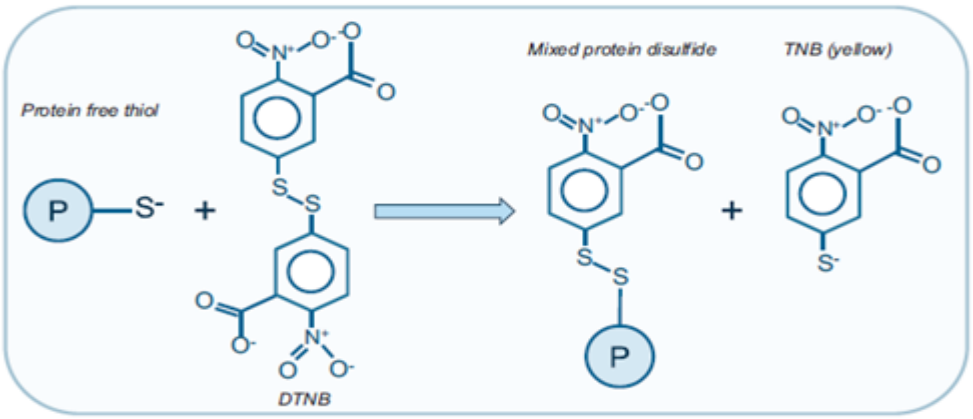


Figure 12. *Schéma de la réaction entre le DTNB et les groupements –SH (Rudyk et Eaton, 2014).*

D'abord 50 µl de la fraction cytosolique ont été mélangés avec 50 µl de TCA à 5%, après agitation et incubation 5 min à 4°C, le mélange a ensuite été centrifugé à 2000 tours/min pendant 10 min. 25 µl du surnageant ont été récupérés et additionnés à 5 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH=8). Après agitation, on a prélevé 3 ml de ce mélange auquel on a ajouté 20 µl de la solution de DTNB (0.01M). Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante l'absorbance a été lue à 412 nm.

Le taux de GSH a été déduit à partir d'une courbe d'étalonnage préparée dans les mêmes conditions avec des concentrations de 0 à 20 µg/ml (voir annexe 4), et dans laquelle l'absorbance est une fonction linéaire de la concentration en GSH (µmole/ml).

III.2.5.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

L'activité enzymatique de la catalase a été déterminée par la méthode de Clairbone. (1985). Le principe de cette méthode est basé sur la disparition du H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25°C. 1 ml de tampon phosphate 0.1 M, pH 7.2 a été additionné de 0.95 ml de peroxyde d'hydrogène 0.019 M et 25 µl de la fraction cytosolique. Puis l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 240 nm pendant 2 minutes. L'activité enzymatique a été calculée en termes d'unité internationale par minute et par milligramme de protéine (UI/min/mg de protéines) (Garcia et Martinez, 2012), selon la formule suivante :

UI/mg de protéines = (2.3033/T) × (log A1/A2) /mg de protéines.

Sachant que :

A1 : Absorbance au temps 0 mn.

A2 : Absorbance après 2min.

T : Intervalle de temps en minutes.

III.2.5.3. Mesure de l'activité enzymatyque de superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme antioxydante très importante dans le maintien d'une basse concentration de l'anion superoxyde. Elle catalyse la dismutation de l'$O_2^{\cdot -}$ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante :

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique a été déterminée selon la méthode décrit par Marklund et Marklund, (1974). La mesure de l'activité de cette enzyme est basée sur la capacité de la SOD à inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol.

Pour la mesure de l'activité de la SOD, dans la cuve de mesure on a met : 850 µl du tampon tris HCL (50 mM, PH=8,2), 15 µl de la fraction cytosolique, 100 µl de l'EDTA (10 mM) et ensuite 50 µl de pyrogallol (2,5 mM dans HCL 10 mM). La lecture de la densité optique (DO) a été effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes. L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase est exprimée en UI/mg de protéines selon la relation suivante :

Inhibition total (%) = [(DO Blanc/Δt - DO Echantillon/Δt) / DO Blanc/Δt] × 100

SOD (UI /mg protéines) = [Inhibition total (%) / (n x 50)].

Avec : n : la quantité de protéines (en mg) présente dans le volume de l'échantillon utilisé.

III.2.5.4. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

La réaction de dosage du malondialdéhyde repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le malondialdéhyde et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un pigment rose absorbant à 532 nm, extractible par les solvants organiques.

Le résultat du dosage du malondialdéhyde par l'acide thiobarbiturique est donc la somme du malondialdéhyde préexistant lié ou non aux molécules biologiques, des peroxydes lipidiques, des produits d'auto-oxydation des acides gras et autres substances qui donnent naissance soit à du malondialdéhyde, soit à des molécules réagissant avec l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud. C'est pourquoi à la notion initiale de dosage du malondialdéhyde s'est substituée la notion de substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique (thiobarbituric acid reactive substances ou TBARS). L'extraction du dérivé MDA-$(TBA)_2$ est réalisée par le n-butanol à pH acide, cette opération permet d'éliminer en partie les interférents dans la réaction des TBARS.

On a procédé selon la méthode décrite par Okhawa *et al.* (1979). En résumé, 0.25 ml de la fraction cytosolique a été additionné à 0.25 ml de TCA 20% et 0.5 ml de TBA 0.67% (0.67% dans le NaOH 2N). Ce mélange a ensuite été incubé pendant 15 min au bain-marie à 100°C, puis refroidit. Lorsque le mélange a été refroidi, il a été additionné de 2 ml de n-butanol puis centrifugé à 3000 rpm pendant 15 min. Le surnageant a ensuite été récupéré et son absorbance a été mesurée à 532 nm contre un blanc.

La concentration du MDA a été déterminée par la loi de Beer Lambert en µM/mg de protéines (Garcia et Martinez, 2012) en utilisant le facteur d'extinction $1,53 \times 10^5$ $mol.l^{-1}.cm^{-1}$ (Placer *et al*., 1966).

III.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Cette méthode détermine la concentration protéique cytosolique, elle est basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu brillant de coomassie (BBC) qui se lie avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant la concentration en protéines dans l'échantillon. Pour le dosage des protéines, 25 µl de la fraction cytosolique (25 µl du BSA pour la gamme étalon) ont été ajoutés à 1 ml du réactif bleu brillant de coomassie (BBC). Après agitation au vortex et incubation à température ambiante pendant 5 min, la lecture de l'absorbance a été effectuée à 595 nm (Bradford, 1976). La concentration des protéines

a été déduite à l'aide de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions par le BSA (Albumine de sérum bovin) avec des concentrations de 0 à 0.024 mg/ml (Voir Annexe 3).

III.4. Analyse statistique

Les résultats graphiques ont été présentés sous forme de moyenne ± d'écart-type. L'évaluation statistique a été effectuée en utilisant le test (T) de Student à l'aide de l' Excel 2010. La valeur trouvée par le calcul de T peut affirmer que les lots sont différentes par rapport au contrôle avec un risque d'erreur « p » avec :

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

(* comparaison avec le lot contrôle) ou (# comparaison avec le lot traité par le benzo[a]pyrène).

IV.1. Résultats et interprétation

IV.1.1. Rendement d'extraction des composés phénoliques

Le rendement d'extraction des polyphénols de *P.lentiscus* L. représente 20% (20 g d'extrait sec par 100 g de l'huile).

IV.1.2. Les teneurs en composés phénoliques de l'extrait hydro-méthanolique

IV.1.2.1. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait est exprimée en mg équivalent d'acide gallique/g de l'huile. D'après les résultats obtenus, la teneur en polyphénols dans l'exrait présente une teneur de 12 µg EAG/g de l'huile.

IV.1.2.2. Teneur en flavonoïdes totaux

La teneur des flavonoïdes de l'extrait est exprimée en mg équivalent de Quercétine/g de l'huile. Nos résultats montrent une teneur en flavonoïdes est de 467 µg EQ/g de l'huile.

IV.1.3. Aspect microscopique

Dans les organes examinés (poumons et cerveau), le traitement aigu au B[a]P a provoqué certains changements pathologiques (Deng *et al*., 2018). En effet, pour les poumons, les séctions colorées par H&E **(Figure 13)** ont présenté une architecture normale dans le lot contrôle, alors que le lot traité par le B[a]P a montré une destruction grave de l'architecture alvéolaire avec un épaississement de la paroi septale.

Cependant, le lot traité par l'huile fixe de fruit de *Pistacia lentiscus* L. a présenté des caractéristiques morphologiques similaires a celles apparues dans les poumons du lot contrôle mais des légères destructions de la paroi septale ont été également observées dans le lot prétraité par l'HFPL.

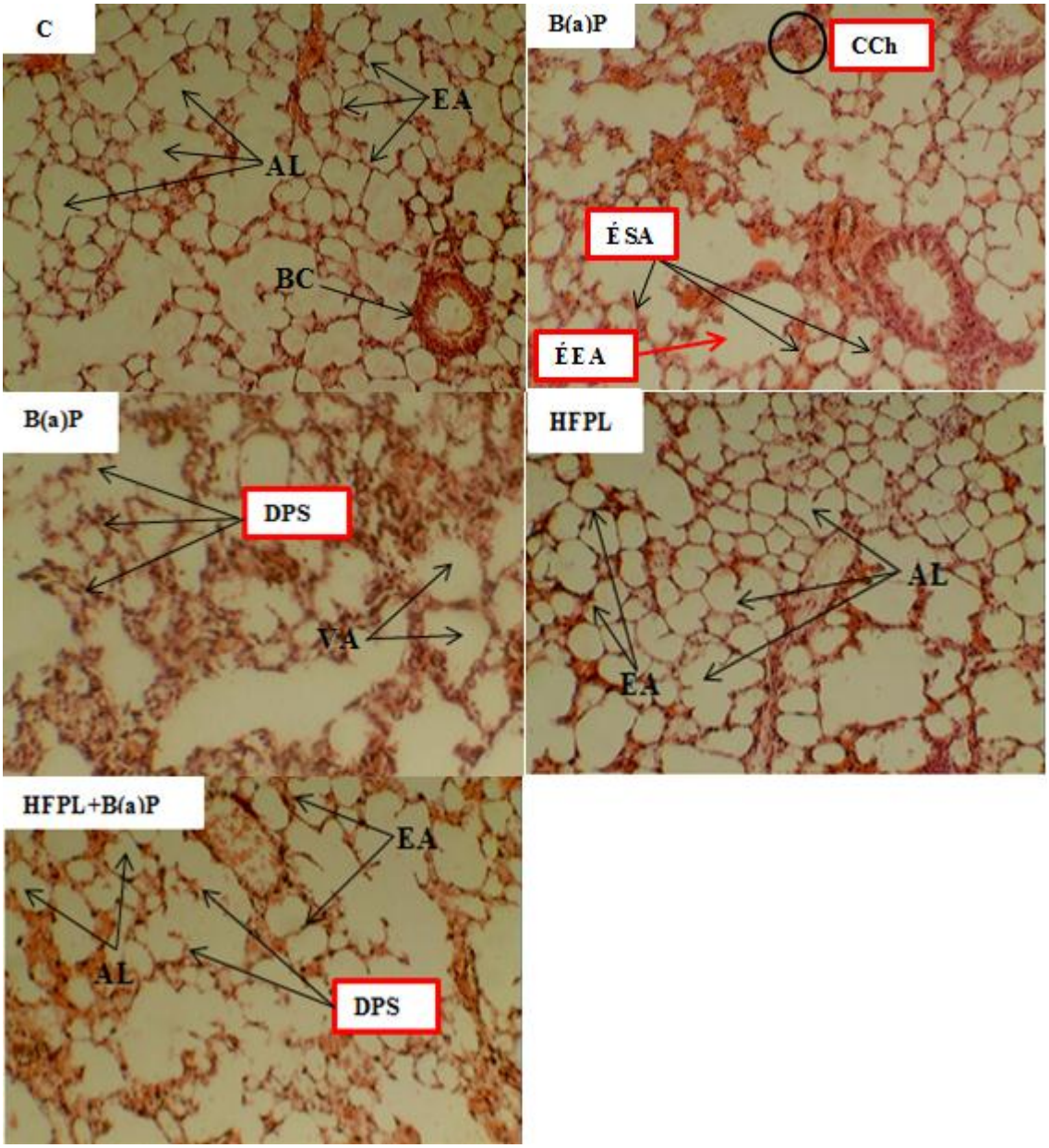


Figure 13 : *Examen histologique des tissus pulmonaires observés en microscope optique (×100) du lot contrôle (C), du lot traité par le B(a)P à la dose de (100mg/Kg/IP), du lot traité par l'huile fixe de Pistacia lentiscus* L. *à la dose de (1.66 ml/kg) par voie orale seule (HFPL) ou en association avec le benzo[a]pyrène (HFPL+B(a)P).*

AL : Alvéoles; **EA :** Espaces Alvéolaires; **BC :** Bronchioles; **CCh :** Condensation de la Chromatine; **ÉSA :** Epaississement Septale Alvéolaire; **ÉEA :** Élargissement des Espaces Alvéolaires; **DPS :** Destruction de la Paroi Septale; **VA** : Voies Aériennes.

Pour le cerveau, les sections colorées par H&E **(Figure 14)** ont présenté une architecture normale dans le lot contrôle, alors que le lot traité par le B[a]P a montré une légère coloration des noyaux des cellules de gyrus denté (DG) de l'hippocampe par rapport au souris contrôles. Cependant, le lot traité par l'huile fixe de fruit de *Pistacia lentiscus* (HFPL) a présenté des caractéristiques morphologiques similaires a celles apparues dans le lot contrôle ainsi que pour le lot prétraité par l'HFPL en association avec le B[a]P.

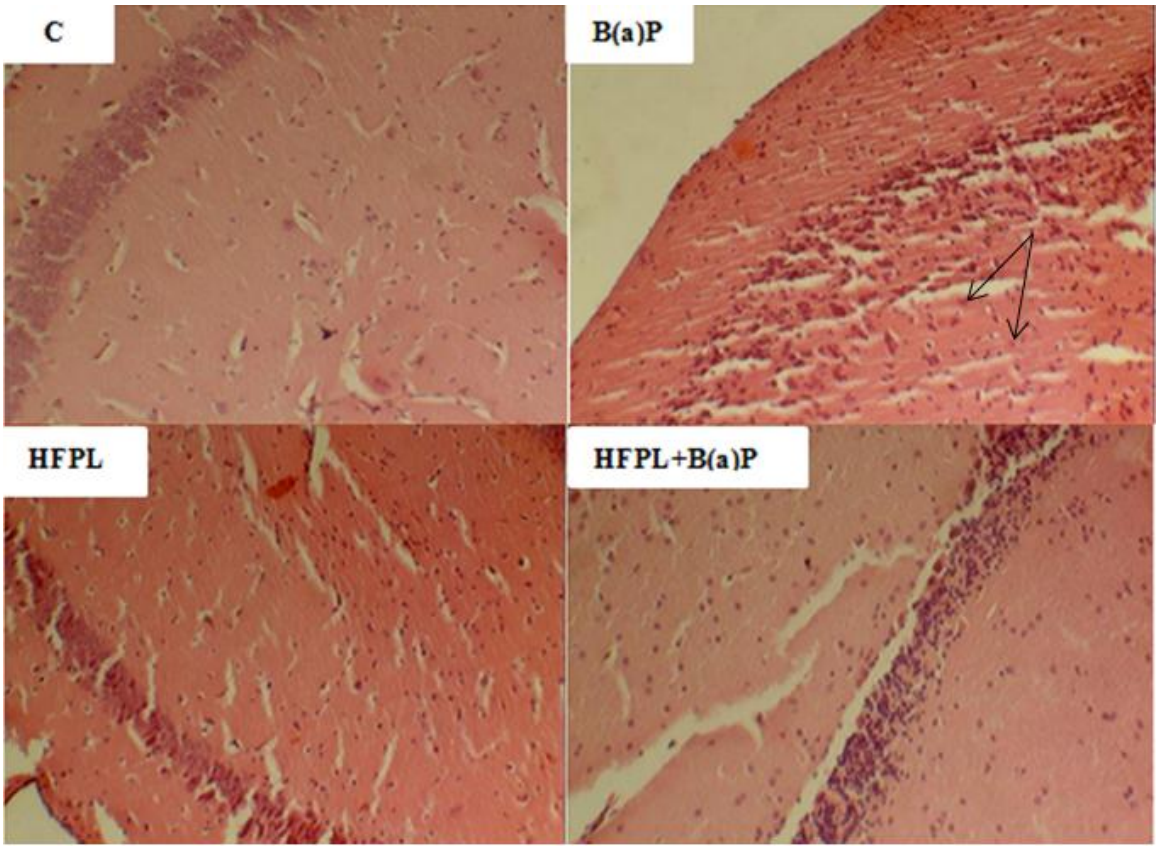
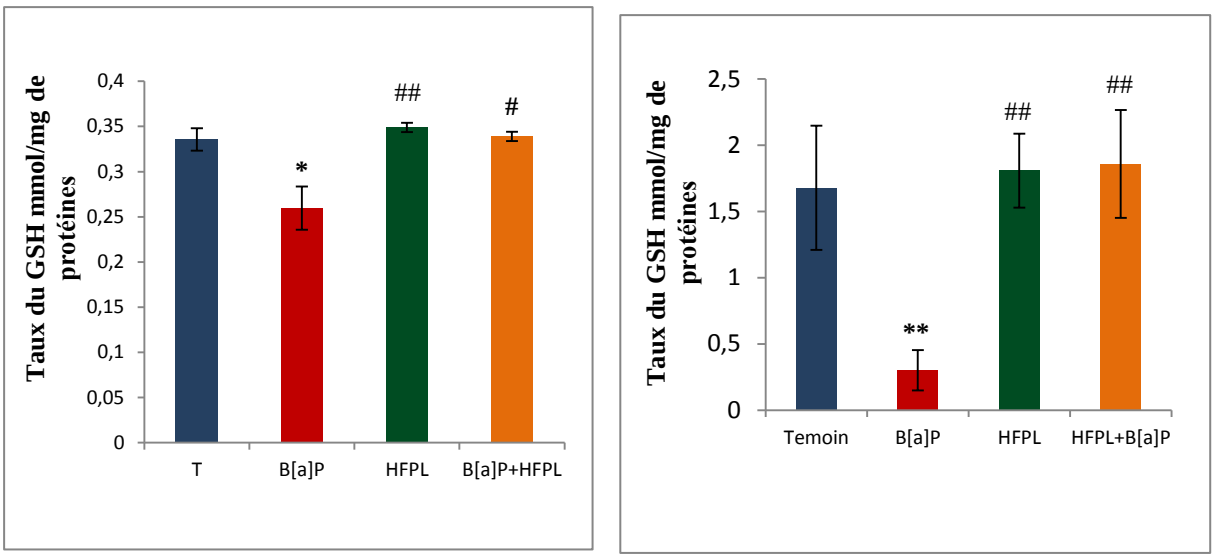


Figure 14 : *Examen histologique des tissus cérébrales observés en microscope optique (×100) du lot contrôle (C), du lot traité par le B(a)P à la dose de (100mg/Kg/IP), du lot prétraité par l'huile fixe de Pistacia lentiscus à la dose de (1.66 ml/kg) par voie orale seule (HFPL) ou en association avec le benzo(a)pyrène (HFPL+B(a)P).*

IV.1.4. Evaluation de l'effet préventif de l'huile fixe de fruit de *Pistacia lentiscus* L. (*in vivo*)

L'activité antioxydante de HFPL a été mise en évidence chez des souris Swiss albinos traitées par l'huile fixe de *Pistacia lentiscus* L. seul ou en association avec le benzo[a]pyrène (100 mg/kg), elle est estimée par la mesure des marqueurs du stress oxydatif enzymatiques tels que la SOD et la CAT, et non enzymatiques par la mesure du GSH et MDA dans le tissu pulmonaire et cérébral.

IV.1.4.1. La variation des taux du glutathion (GSH) pulmonaire et cérébral



(A) **(B)**

Figure 15 : *Variations des taux du GSH cytosolique pulmonaire (A) et cérébral (B).*

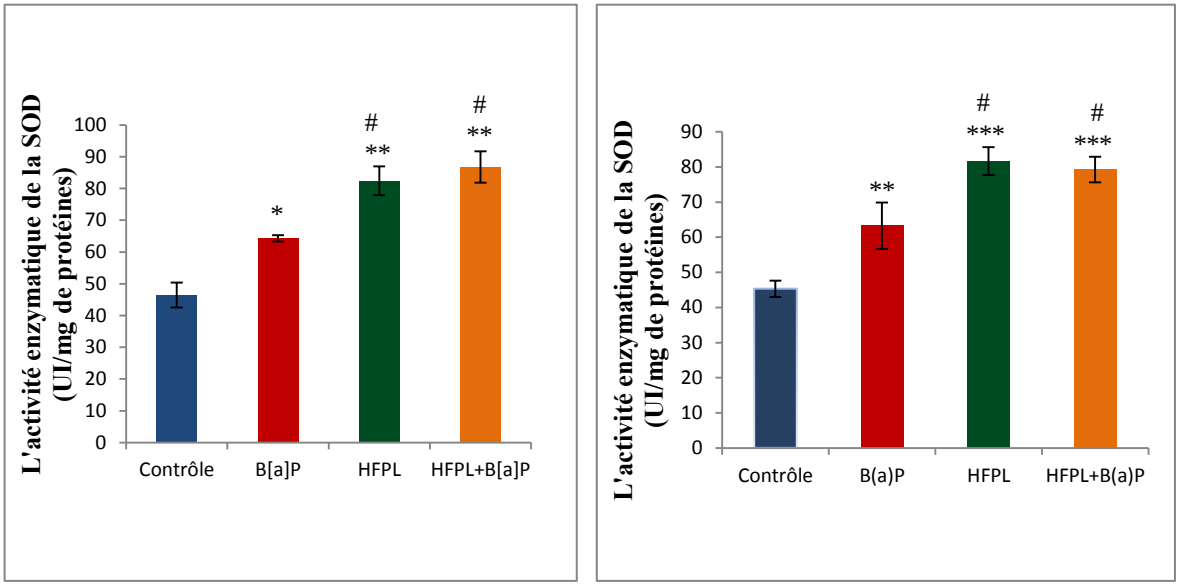
(* : Significative relatif au témoin, ** : hautement significative, *** : très hautement significative, # : significative relatif au B(a)p, ## : hautement significative, ### : très hautement significative).

Nos résultats **(Figure 15 A et B),** montrent une diminution significative ($p<0,05$) du taux de GSH pulmonaire chez le groupe traité au B[a]P par rapport au groupe témoin avec des concentrations (0.26 ± 0.023 mmol/mg de protéines) contre (0.335 ± 0.012 mmol/mg de protéines). Alors que le taux du GSH augmente de façon significative ($p<0.01$) chez les souris prétraités par HFPL en association au B[a]P (0.338 ± 0.005 mmol/mg de protéines) ce qui est aussi observé chez le groupe recevant de l'huile seule de manière hautement significative ($p<0.01$) (0.348 ± 0.005 mmol/g de protéines) en comparaison avec le lot traité par le B[a]P.

D'autre part on a constaté une diminution hautement significative ($p\leq0.01$) du taux de GSH cérébral chez les animaux traités au B[a]P par rapport au groupe témoin, avec des concentrations (0.30 ± 0.15) contre (1.67 ± 0.46 mmol/mg de protéines). Alors que le taux de GSH augmente de façon hautement significative ($p<0.01$) chez les souris prétraitées par HFPL en association au B[a]P (1.85 ± 0.4 mmol/mg de protéines) ce qui est aussi observé chez les souris ayant recevant l'huile seule (1.8 ± 0.27 mmol/g de protéines) en comparaison avec les souris traitées par le B[a]P.

IV.1.4.2. Activité enzymatique de la Superoxyde Dismutase (SOD)

La **figure 16 (A et B)** illustre l'activité enzymatique de la SOD cytosolique pulmonaire et cérébrale respectivement chez les souris traitées par le benzo[a]pyrène (B(a)P) (100 mg/kg) par voie IP, avec un prétraitement à l'huile fixe de *Pistacia lentiscus* (HFPL) (50µl//jr) par voie orale seule ou en association avec le benzo[a]pyrène.



(A) ***(B)***

Figure 16: *Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique pulmonaire (A) et cérébrale (B).*

(* : Significative relatif au témoin, ** : hautement significative, *** : très hautement significative, # : significative relatif au B[a]p, ## : hautement significative, ### : très hautement significative).

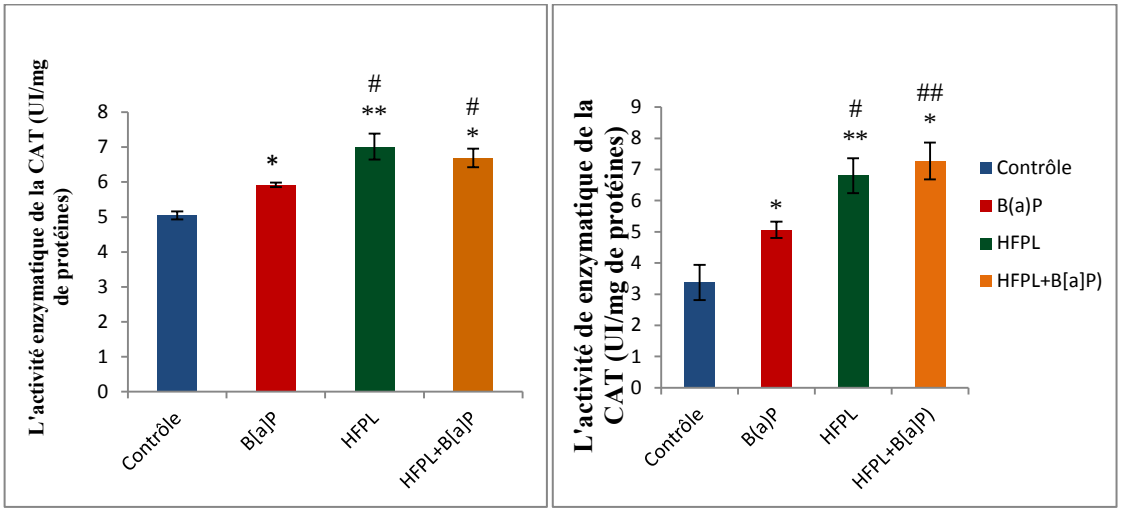
D'après ces résultats, nous avons remarqué que l'administration du benzo[a]pyrène a induite une augmentation significatif (P<0,05) de l'activité de la SOD pulmonaire par rapport aux souris contrôles (64.29 ± 0.99 contre 46.45 ± 3.96 UI/mg de protéines). Alors que, l'activité de la SOD augmente de façon significative (P<0,05) chez les souris traitées par HFPL seule (82.45 ± 4.51 UI/mg de protéines) et chez les souris prétraitées par HFPL en association avec le benzo[a]pyrène (86.75 ± 4.95 UI/mg de protéines) par rapport aux souris traitées par le benz[a]pyrène.

D'autre part, nous avons remarqué que l'administration du benzo[a]pyrène seul a induit une augmentation hautement significatif (P<0,01) de l'activité de la SOD cérébrale par rapport aux souris contrôles (63.28 ± 6.63 UI/mg de protéines contre (45.33 ± 2.32 UI/mg de protéines). Alors que, l'activité de la SOD augmente de façon significative chez les lots des animaux ayant reçu un

traitement au HFPL seul (81.69 ± 3.63 UI/mg de protéines), et en association au B[a]P (79.27 ± 3.64 UI/mg de protéines) par rapport au lot traité par le bezo[a]pyrène.

IV.1.4.3. Activité enzymatique de la Catalase (CAT)

La **figure 17 (A et B)** illustre l'activité enzymatique de la Catalase cytosolique pulmonaire et cérébrale respectivement chez les souris traitées par le benzo[a]pyrène (B[a]P) (100 mg/kg) par voie IP, avec un prétraitement à l'huile fixe de *Pistacia lentiscus* (HFPL) (50µl//jr) par voie orale seule ou en association avec le benzo[a]pyrène.



(A) ***(B)***

Figure 17: *Variations de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique pulmonaire (A) et cérébrale (B).*

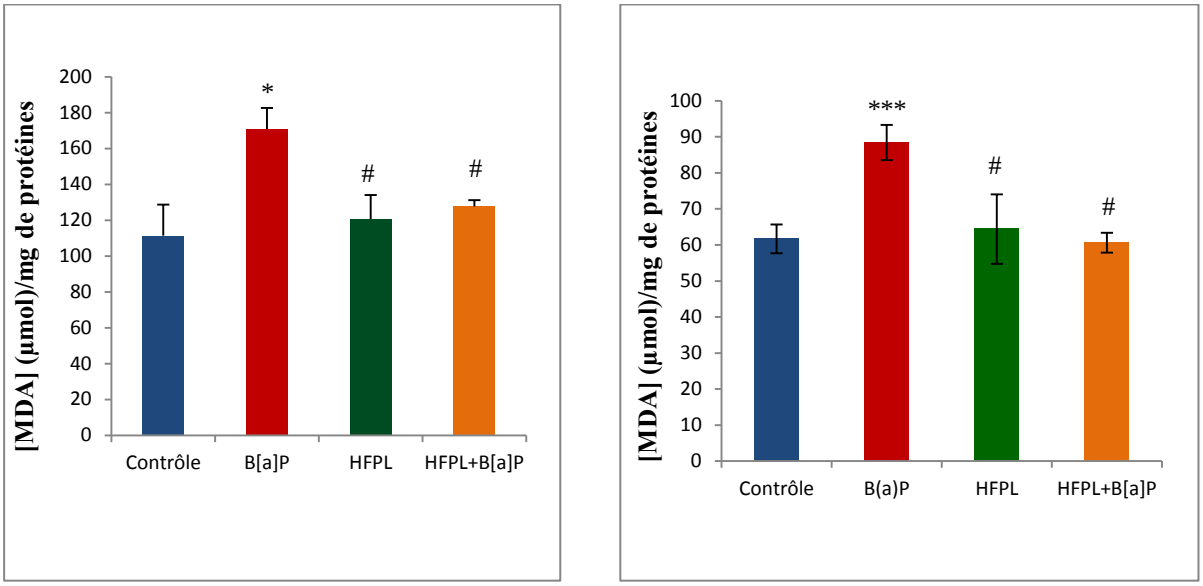
(* : Significative relatif au témoin, ** : hautement significative, *** : très hautement significative, # : significative relatif au B[a]p, ## : hautement significative, ### : très hautement significative).

D'après les résultats, nous avons remarqué que l'administration du benzo[a]pyrène a induit une augmentation significative de l'activité de la CAT pulmonaire par rapport aux souris contrôles (5.92 ± 0.06 UI/mg de protéines) contre (5.04 ± 0.1 UI/mg de protéines). La mesure de l'activité de la CAT chez les souris traitées par HFPL a montré une augmentation significative (7.01 ± 0.3 UI/mg de protéines). De même, pour les souris prétraitées par HFPL en association aux benzo[a]pyrène (6.68 ± 0.26 UI/mg de protéines) en comparaison au lot traité par le B[a]P.

Pour le tissu cérébral, nous avons remarqué que l'administration du benzo[a]pyrène induit une augmentation significative (P<0,05) de la CAT par rapport aux souris contrôles (5.92 ± 0.06 contre 3.37 ± 0.56 UI/mg de protéines). La mesure de l'activité de la CAT chez les souris traitées par HFPL seule a montré une augmentation significative (P<0,05) de (6.8 ± 0.55 UI/mg de protéines) et hautement significative pour le lot prétraité au HFPL en association aux benzo[a]pyrène (7.27 ± 0.5 UI/mg de protéines) par rapport aux souris traitées par le B[a]P.

IV.1.4.4. Variations des taux du MDA cytosolique

La **figure 18** illustre les variations des taux du MDA cytosoliques pulmonaire (A) et cérébral (B) respectivement chez les souris traitées au benzo[a]pyrène (100 mg/kg) par voie IP, avec un prétraitement à l'huile fixe de *Pistacia lentiscus* (HFPL) (50 µl/jour) par voie orale seule ou en association avec le benzo[a]pyrène.



(A) ***(B)***

Figure 18 : *Variations du taux du MDA cytosolique pulmonaire et cérébral.*

(* : Significative relatif au témoin, ** : hautement significative, *** : très hautement significative, # : significative relatif au B[a]p, ## : hautement significative, ### : très hautement significative).

D'après nos résultats, nous avons constaté une augmentation significative (P<0,05) du MDA pulmonaire chez les souris traitées par le benzo[a]pyrène (170.76 ± 11.89) µmol/mg de protéines) par rapport aux souris contrôles (111.3 ± 17.41 µmol/mg de protéines). Par ailleurs, une diminution significative du taux de MDA est constatée chez les souris traitées par HFPL (120.66 ±

13.42 µmol/mg de protéines) et chez les animaux prétraitées par HFPL en association avec le benzo[a]pyrène (127.59 ± 3.67 µmol/mg de protéines) par rapport aux souris traitées par le B[a]P.

Par rapport au tissu cérébral, il ya une augmentation très hautement significative (P<0,01) du MDA chez les souris traitées par le benzo(a)pyrène (88.45 ± 4.87 µmol/mg de protéines) par rapport aux souris contrôles (61.67 ± 3.97 µmol/mg de protéines). Par ailleurs, une diminution significative (P< 0,05) du taux de MDA est constatée chez les souris traitées par HFPL seule (64.4 ± 9.67µmol/mg de protéines), et en association avec le B[a]P (60.63 ± 2.75 µmol/mg de protéines) par rapport aux souris traitées par le benzo[a]pyrène.

IV.2. Discussion

IV.2.1. Rendement des composants phénoliques et flavonoïdes de l'huile fixe de fruit de *Pistacia lentiscus* L.

La présente étude a pour objectifs, de mettre en évidence la composition phytochimique d'un extrait hydro-méthanolique de l'huile fixe de fruit de *Pistacia lentiscus* L. puis d'évaluer son effet préventif contre la toxicité aiguë, principalement les dommages liés au stress oxydatif pulmonaire et cérébral induits par le benzo[a]pyrène.

Les résultats préliminaires de cette étude phytochimique ont montré que l'huile des fruits de *Pistacia lentiscus* L. contient des métabolites secondaires bioactifs, comme les flavonoïdes et les phénols. Les teneurs en composés bioactifs qu'on a obtenu dans l'huile de fruit de *Pistacia lentiscus* L. est de 12 µg EAG/g de l'huile pour les polyphénols et de 467 µg EQ/g de l'huile pour les flavonoïdes.

Les teneurs en polyphénols totaux trouvées dans l'huile de fruit du pistachier de la région du sud de l'algérie par Charef, (2011) sont supérieurs à nos résultats (huile de *P. lentiscus* noir : 3000 mg/kg; huile de *P. lentiscus* rouge : 7400 mg/kg). Cette différence peut résulter d'une faible spécificité du dosage par le réactif Folin-Ciocalteu aux polyphénols, car plusieurs composés peuvent réagir avec ce réactif, donnant un taux phénolique apparent élevé (Athamena *et al.*, 2010; Halmi, 2015; Tawaha *et al.*, 2007). Des variations des facteurs intrinsèques, génotypiques, les conditions biotiques (organe, espèce) et des facteurs éxtrinsèques et abiotiques (climat, fertilité) au sein de l'espèce ou d'une partie de la plante, le temps de récolte et la procédure d'extraction joue également un rôle majeur dans cette variation (Belhachat *et al.*, 2017; Belyagoubi-Benhammou, 2012; Athamena *et al.*, 2010). Plusieurs études ont rapporté l'association des teneurs en polyphénols avec la qualité diététique et sensorielle des huiles. À des concentrations élevées ils pourraient contribuer à la couleur foncée, au goût astringent et au mauvais goût des certaines huiles . Cela pourrait expliquer la forte odeur et goût piquant qui caractérise les huiles de *P. lentiscus* (Mezni *et al.*, 2018).

Les teneurs en flavonoïdes dans notre étude sont plus élevées que celles en polyphénols totaux, et les concentrations en flavonoïdes trouvées dans les huiles des fruits noir et rouge de lentisque par Charef, (2011) sont supérieures à nos résultats avec une teneur de 2800 mg/kg pour l'huile du fruit noir et 3000 mg/kg pour l'huile du fruit rouge. Cette différence a été expliquée dans la différence du standard utilisé pour le dosage des flavonoïdes (Athamena *et al.*, 2010).

Les résultats obtenus dans cette et étude montre que le rendement d'extraction des l'huiles de *Pistacia lentiscus* L. était de 20 g d'extrait sec par 100 g d'huile ce qui est un rendement moyen par rapport à d'autre traveaux sur les feuilles , l'extraction effectuée par Cherbal *et al*. (2012) donne un rendement de 44,58g d'extrait sec par 100 g de matériel végétal sec.

IV.2.2. Effet protecteur *in vivo* de l'huile fixe de *Pistacia lentiscus* contre les toxicités pulmonaire et cérébrale induites par le benzo[a]pyrène

- **Etude histologique**

Le benzo[a]pyrène provoque plusieurs changements structuraux dans les tissus pulmonaire et cérébral, les changements observées dans nos résultats sont en accord avec ceux obtenues par Deng *et al*. (2018) dont les observations histologiques de préparations des tissus pulmonaires au microscope optique des souris du lot contrôle indiquent une structure alvéolaire normale avec de grandes alvéoles et de minces parois alvéolaires, alors que des changements sévères sont observées dans les tissus des souris des lots traitées par le B(a)P, il y a un épaississement de la paroi alvéolaire (septum alvéolaire) avec des alvéoles compressés, des métaplasies et un décollement des cellules épithéliales des bronches et des bronchioles (Deng *et al*., 2018; Emre *et al*., 2007). Aussi selon Deng *et al*. (2018) certains domaines des poumons ont montré une dilatation de nombreux espaces alvéolaires et une destruction des parois septales. Les alvéoles touchées étaient irrégulières et ont perdu la structure alvéolaire normale. Le tissu histologique anormal peut évoluer en lésion précancéreuse, voir en cancer dans les organes.

Les résultats de l'étude histologique du tissu cérébral sont en accord avec celles rapportées par Deng et collaborateurs (2018). Les lésions histopathologiques sont causées par le benzo[a]pyrène qui franchit facilement la barrière hématoencéphalique en induisant une neurotoxicité (He *et al*., 2016).

- **Effet de l'huile fixe sur les marqueurs du stress oxydatif**

Le GSH est un tripeptides qui constitue la première défense contre le stress, cet thiol non enzymatique et donc considéré comme un composé essentiel au maintien de l'intégrité cellulaire, en raison de ses propriétés réductrices et de sa participation active au métabolisme cellulaire, y compris la protection des cellules contre les ERO, la désintoxication des composés exogènes et transport d'acides aminés. Beaucoup de pathologies sont associées à la diminution de la concentration intracellulaire en GSH (Emer *et al*., 2007; Gasmi *et al*.,2016).

Nos résultats montrent une diminution significative du taux de GSH pulmonaire et cérébral chez le groupe traité au B[a]P. Ces résultats sont en accord avec ceux de Emer *et al*. (2007) qui présentent une diminution remarquable en taux de GSH pulmonaire et cerebral. Ils ont rapporté que l'administration de B[a]P provoquait un stress oxydatif en raison d'une production importante de ERO, qui altère à son tour les activités anti-oxydantes . La source d'élimination de ces composés, donc, ce statut consomme et par conséquent modifie les niveaux des antioxydantes mais le degré de dimunution diffère entre le poumon et le tissu cérébral. Ce résultat pourrait être lié aux activités de la γ-glutamylcystéine synthétase, et la glutathion synthétase, qui servent toutes deux à la synthèse du GSH. L'activité de ces enzymes dépend du type de tissu dans lequel elles sont présentes.

L'effet protecteur de d'huile fixe de fruits de *Pistacia lentiscus* est dû à son contenu en antioxydants notamment les polyphénols et les flavonoïdes, Ces composés sont riches en groupes hydroxyle. Ce dernier étant capable de stabiliser les ERO en réagissant avec les radicaux réactifs. Les études de Ali *et al.* (2016) montrent que l'administration de naringénine (un flavonoïde) a amélioré les activités des antioxydants comme le taux de GSH pulmonaire par piéjage des ERO *in vivo*, selon Gasmi *et al*. (2016). Le traitement préventif des rats à la quercétine a restauré de manière significative le taux de GSH cérébral par rapport aux rats traités aux pesticides .

La dégradation des lipides polyinsaturés par les espèces réactives de l'oxygène conduit à la formation d'une espèce électrophile très réactive, le malondialdéhyde (MDA), cet aldéhyde est utilisé comme biomarqueur pour la mesure des niveaux du stress oxydatif dans l'organisme (Atamer *et al*., 2014). Dans la présente étude, les résultats ont montré une augmentation significative du taux de MDA cytosolique pulmonaire et cérébral lorsque les souris sont traités par le benzo[a]pyrène par rapport aux souris contrôles, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans des études similaires du de Deng *et al*. (2018) à 48 heures, et de Emre *et al*. (2007). le taux du MDA est proportionnel aux niveaux de la peroxydation lipidique, c'est pour cela il est considéré comme un bon indice qui reflète les niveaux de la peroxydation lipidique dans les organes (Emre *et al*., 2007). L'induction du MDA a une prédominance majeure dans les poumons par rapport aux autres organes, foie, rein, estomac, et le cerveau (Deng *et al*., 2018).

Le MDA provoque plusieurs altérations aux membranes lipidiques des cellules, il entraîne des modifications de la perméabilité aux ions, une diminution de la fluidité, et d'autres fonctions associées aux membranes, il réagit avec l'ADN pour former des adduits MDA-ADN hautement mutagènes (Oliveira *et al*., 2012; Reitznerová *et al*., 2017). Il est a noter que l'excès des ERO n'aboutit pas seulement à l'oxydation des lipides, mais aussi à la dérégulation de leurs métabolisme et que l'exposition au B[a]P a affecter les glycérophospholipides contenant une double liaison

carbone-carbone, conduisant à des changements dans les fonctions et les activités des lipides (Li *et al*., 2019).

Par contre l'administration préventive de l'HFPL conduit à une diminution significative du taux de MDA par rapport au lot traité par le B[a]P. Une étude rapportée par Ammari *et al*. (2018) a montré une diminution des taux de MDA chez les groupes traitées par l'huile de *Pistacia lentiscus* L. en association avec des lipopolysaccharides (LPS), dans le cortex frontal, l'hippocampe et le cervelet par rapport au groupe traité par les lipopolysaccharides. L'huile de *Pistacia lentiscus* provoque la diminution du stress oxydatif induit par les LPS, grâce à sa richesse en acides gras tels que l'acide oléique et l'acide linoléique, en polyphénols et en flavonoïdes, qui jouent un rôle protecteur en diminuant la peroxydation lipidique. Il a été constaté que l'huile de *P. lentiscus* contient un antioxydant principal, la vitamine E qui diminue le stress oxydatif et la peroxydation des membranes, en brisant la chaîne lipophile présente dans les membranes des cellules (Ammari *et al*., 2018).

Les flavonoïdes ont également été isolés des parties supérieures aériennes de *Pistacia lentiscus*, dont le quercétine-3-glucoside étant le plus abondant (Belhachat *et al*., 2017). Parmi les flavonoïdes, la rutine, un glycoside de quercétine (flavonol) et de rutinose (disaccharide) , qui est couramment consommé dans des produits utilisés quotidiennement tels que les fruits, et qui possède un potentiel antioxydant important (Shahid *et al*., 2016). Nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude réalisée sur des souris swiss albinos par Shahid *et al*. (2016) qui a montré que la dose de 80 mg/kg en poids, par voie orale de la rutine a provoqué une diminution très hautement significative des taux de MDA dans les groupes traités par la rutine par rapport au groupe traité par le benzo(a)pyrène (125 mg/kg), inhibant ainsi les dommages des membranes des cellules pulmonaires.

Une étude réalisée *in vitro* sur des cellules Bhas avec 4 µM de B[a]P par Omidian *et al*. (2017), a montré que le B[a]P a augmenté les ROS intracellulaires de 25 % après 12 heures et de plus que 200 % après 72 heures, et qu'il a considérablement augmenté la production de l'anion superoxyde des mitochondries de 52 % par rapport au cellules non traitées. L'augmentation des concentrations cellulaires de l'anion superoxyde provoque une toxicité, lorsque les cellules sont stressées, plus les anions superoxydes sont générés (Mapuskar *et al*., 2019).

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui cataysent la dismutation du l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène, le H_2O_2 formé est ensuite converti en eau (H_2O) et en oxygène (O_2) par la catalase ou d'autres peroxydases (Robinett *et al*.,

2019; Mapuskar *et al*., 2019). La catalase est pricipalement située dans le peroxysome, elle empêche ainsi les dommages oxydatifs au sein du peroxysome et sa propagation dans le reste de la cellule (Gasmi *et al*., 2016).

Nos résultats montrent une augmentation significative des activités de la SOD et de la catalase chez les souris traitées par le benzo[a]pyrène par rapport aux souris contrôles, ces résultats sont en accord avec l'étude de Deng *et al*. (2018). Des résultats similaires ont été rapportés dans d'autres études publiées. Pan *et al*. (2006) ont constaté une augmentation des activités des enzymes antioxydantes dans une exposition aiguë aux HAP chez Chlamys Ferrari. Il a aussi été démontré que la toxicité aiguë au benzo(a)pyrène ou de l'anthracène augmente l'activité enzymatique de la catalase. Cette augmentation des enzymes est due à leur induction par le stress oxydatif et la production des ERO, en particulier l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène, induit par le benzo(a)pyrène, ces ERO nécessitent d'être converti par la SOD et la catalase (Deng *et al*., 2018).

Par contre, Shahid et collaborateurs (2016) ont trouvé que les niveaux d'activité enzymatique de la SOD et de la CAT ont été diminué significativement dans les poumons et le cerveau dans le groupe traité par le benzo(a)pyrène par rapport au groupe contrôle. Cette diminution de l'activité de la SOD dans le cerveau peut être expliquée par l'accumulation de superoxydes et de peroxyde d'hydrogène consommant ainsi l'activité de la SOD (Emre *et al*., 2007).

Le prétraitement par l'HFPL a montré une augmentation significative de l'activité de la SOD et de la CAT, ceci est en accord avec les résultats de Ammari et collaborateurs. (2018) par rapport au groupe traité par le LPS. Les mêmes résultats ont été trouvés dans l'étude réalisée par Shahid *et al*. (2016) en utilisant la rutine par rapport au groupe traité par le benzo(a)pyrène (125 mg/kg).

Conclusion

Le B[a]P a provoqué des altérations dans le bilan de stress oxydatif qui se traduisent par une perturbation des taux de GSH et MDA, de l'activité enzymatique de la e CAT et de la SOD cytosoliques du tissu cérébral et pulmonaire. Le test histologique montre que ce HAP cause également des altérations tissulaires, alors que le traitement par l'HFPL donne une prévention vis-à-vis du stress. L'activité antioxydante de cette huile résulte de sa richesse en composés phénoliques spécifiquement les flavonoïdes et les polyphénols. A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que L'huile de fruits de *pistacia lentiscus* L. a protégé le tissu cérébral et pulmonaire contre le stress oxydant induit par le B[a]P *in vivo* dans un modèle murin de toxicité aiguë.

- **Abdeldjelil, M. C., Bensegueni, A., Messaï, A., Agabou, A., & Benazzouz, H.** (2014). Medicinal use of Pistacia lentiscus fixed oil in Constantine province, north-east Algeria. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, *4*(1), 48-51.
- **Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S.** (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, *25*(1), 107-123.
- **Abidi, A., Aissani, N., Sebai, H., Serairi, R., Kourda, N., & Ben Khamsa, S.** (2017). Protective effect of Pistacia lentiscus oil against bleomycin-induced lung fibrosis and oxidative stress in rat. *Nutrition and cancer*, *69*(3), 490-497.
- **Akerboom, T. P., & Sies, H.** (1981). [48] Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. In *Methods in enzymology* (Vol. 77, pp. 373-382). Academic Press.
- **Alexandrov, K., Rojas, M., & Satarug, S.** (2010). The critical DNA damage by benzo (a) pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. *Toxicology letters*, *198*(1), 63-68.
- **AL-Saghir, M. G.** (2006). *Phylogenetic Analysis of the Genus Pistacia (Anacardiaceae)* (Doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University).
- **Amhamdi, H., Aounti, F., Wathelet, J. P., & Elbachiri, A.** (2009). Chemical Composition of the Essential Oil of Pistacia lentiscus L. from Eastern Morocco. *Record of Natural Products*, *3*(2), 90-95.
- **Andra, S. S., Austin, C., Patel, D., Dolios, G., Awawda, M., & Arora, M.** (2017). Trends in the application of high-resolution mass spectrometry for human biomonitoring: an analytical primer to studying the environmental chemical space of the human exposome. *Environment international*, *100*, 32-61.
- **Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K. (2014).**Etude phytochimique et évaluation del'activité antimicrobienne et antioxydante de l'huile essentielle et des composés phénoliques du pistachier lentisque (*Pistacia lentiscus* L.). J. Fundment. Appl. Sci.6, (1):79-93.
- **Atamer, A., Kurdas-Ovunc, A. O., Yesil, A., & Atamer, Y.** (2014). Evaluation of paraoxonase, malondialdehyde, and lipoprotein levels in patients with asymptomatic cholelithiasis. *Saudi journal of gastroenterology: official journal of the Saudi Gastroenterology Association*, *20*(1), 66.
- **Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., & Khebri, S.** (2010). Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum cyminum L. *Lebanese Science Journal*, *11*(1), 69-81.
- **Attoub, S., Karam, S. M., Nemmar, A., Arafat, K., John, A., Al-Dhaheri, W., ... & Raza, H.** (2014). Short-term effects of oral administration of Pistacia lentiscus oil on tissue-specific toxicity and drug metabolizing enzymes in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *33*(5), 1400-1410.
- **Autrup, H., Grafstrom, R. C., Brugh, M., Lechner, J. F., Haugen, A., Trump, B. F., & Harris, C. C.** (1982). Comparison of benzo (a) pyrene metabolism in bronchus, esophagus, colon, and duodenum from the same individual. *Cancer research*, *42*(3), 934-938.
- **Bammou, M., Daoudi, A., Slimani, I., Najem, M., Bouiamrine, E. H., Ibijbijen, J., & Nassiri, L.** (2015). Valorisation du lentisque «Pistacia lentiscus L.»: Étude ethnobotanique,

Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. Journal of Applied Biosciences, 86(1), 7966-7975.

- **Belhachat, D., Aid, F., Mekimene, L., & Belhachat, M.** (2017). Phytochemical screening and in vitro antioxidant activity of Pistacia lentiscus berries ethanolic extract growing in Algeria. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, *10*(3), 273-285.
- **Belhadj, S.** (2001). Les pistacheraies algériennes: Etat actuel et dégradation. *Cahiers Options Méditerranéennes*, (56), 107-109.
- **Bellakhder J. (1997).** *La pharmacopée marocaine traditionnelle medecine, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires.* Casablanca: Le fenec. 764 p.
- **Beloglazova, N. V., Lenain, P., De Rycke, E., Goryacheva, I. Y., Knopp, D., & De Saeger, S.** (2018). Capacitive sensor for detection of benzo (a) pyrene in water. *Talanta*, *190*, 219-225.
- **Ben Douissa, F.** (2004). *Étude chimique et biologique de Pistacia lentiscus L* (Doctoral dissertation, Grenoble 1).
- **Benhammou, N., Bekkara, F. A., & Panovska, T. K.** (2008). Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2(2), 022-028.
- **Boukeloua, A. H. M. E. D., Belkhiri, A. B. D. E. L. M. A. L. I. K., Djerrou, Z., Bahri, L., Boulebda, N., & Pacha, Y. H.** (2012). Acute toxicity of Opuntia ficus indica and Pistacia lentiscus seed oils in mice. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 9(4), 607-611.
- **Bourgart, E., Barbeau, D., Marques, M., Von Koschembahr, A., Béal, D., Persoons, R., ... & Maitre, A.** (2019). A realistic human skin model to study benzo [a] pyrene cutaneous absorption in order to determine the most relevant biomarker for carcinogenic exposure. *Archives of Toxicology*, *93*(1), 81-93.
- **Bouriche, H., Khalfaoui, S., Meziti, H., & Senotor, A.** (2013). Anti-inflammatory activity of acetonic extract of Pistacia lentiscus fruits. TOJSAT, 3(3), 40-48.
- **Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.
- **Brinkmann, J., Stolpmann, K., Trappe, S., Otter, T., Genkinger, D., Bock, U., ... & Luch, A.** (2012). Metabolically competent human skin models: activation and genotoxicity of benzo [a] pyrene. *toxicological sciences*, *131*(2), 351-359.
- **Bussy, C.** (2005). Chemical and radiological effects of chronic ingestion of uranium in the rat brain: biochemical impairment of dopaminergic, serotonergic and cholinergic neuro-transmissions.
- **Calderón-Garcidueñas, L., Leray, E., Heydarpour, P., Torres-Jardón, R., & Reis, J.** (2016). Air pollution, a rising environmental risk factor for cognition, neuroinflammation and neurodegeneration: the clinical impact on children and beyond. *Revue neurologique*, *172*(1), 69-80.
- **Çavaş, T., Çinkılıç, N., Vatan, Ö., & Yılmaz, D.** (2014). Effects of fullerenol nanoparticles on acetamiprid induced cytoxicity and genotoxicity in cultured human lung fibroblasts. Pesticide biochemistry and physiology, 114, 1-7.
- **Cederbaum, A. I.** (2015). Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox biology*, *4*, 60-73.

- **CHAREF, M.** (2011). *Contribution à l'Etude de la Composition Chimique et Etude des Propriétés Phytochimiques et Nutritionnelles des Lipides des Fruits de Pistacia lentiscus et du Quercus* (Doctoral dissertation).
- **Chepelev, N. L., Moffat, I. D., Bowers, W. J., & Yauk, C. L.** (2015). Neurotoxicity may be an overlooked consequence of benzo [a] pyrene exposure that is relevant to human health risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *764*, 64-89.
- **Chistiakov, D. A., Shkurat, T. P., Melnichenko, A. A., Grechko, A. V., & Orekhov, A. N.** (2018). The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review. *Annals of medicine*, *50*(2), 121-127.
- **da Costa, R. M., Rodrigues, D., Pereira, C. A., Silva, J. F., Alves, J. V., Lobato, N. S., & Tostes, R. C.** (2019). Nrf2 as a potential mediator of cardiovascular risk in metabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 382.
- **Darwish, W. S., Ikenaka, Y., Nakayama, S., Mizukawa, H., Thompson, L. A., & Ishizuka, M.** (2018). β-carotene and retinol reduce benzo [a] pyrene-induced mutagenicity and oxidative stress via transcriptional modulation of xenobiotic metabolizing enzymes in human HepG2 cell line. *Environmental science and pollution research*, *25*(7), 6320-6328.
- **Das, D. N., & Bhutia, S. K.** (2018). Inevitable dietary exposure of Benzo [a] pyrene: Carcinogenic risk assessment an emerging issues and concerns. *Current Opinion in Food Science*.
- **Deng, C., Dang, F., Gao, J., Zhao, H., Qi, S., & Gao, M.** (2018). Acute benzo [a] pyrene treatment causes different antioxidant response and DNA damage in liver, lung, brain, stomach and kidney. *Heliyon*, *4*(11), e00898.
- **Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H.** (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(10), 3010-3014.
- **Dhatwalia, S. K., Kumar, M., Bhardwaj, P., & Dhawan, D. K.** (2019). White tea-A cost effective alternative to EGCG in fight against benzo (a) pyrene (BaP) induced lung toxicity in SD rats. *Food and Chemical Toxicology*.
- **Dimas, K., Hatziantoniou, S., Wyche, J. H., & Pantazis, P.** (2009). A mastic gum extract induces suppression of growth of human colorectal tumor xenografts in immunodeficient mice. In vivo, 23(1), 63-68.
- **Dornas, W., Sharanek, A., & Lagente, V.** (2019). Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2/Antioxidant Response Element Pathway in Liver Fibrosis. *Reactive Oxygen Species*, *7*(20), 64-77.
- **Emre, M. H., Polat, G. A. A., & Vardt, 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*(3), 143.
- **EPA,** (2012). Toxicological Review of Benzo[a]pyrene.
- **European Food Safety Authority (EFSA).** (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food-Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*, *6*(8), 724.
- **Garcia, C. Z., & Martinez, C. B.** (2012). Biochemical and genetic alterations in the freshwater neotropical fish Prochilodus lineatus after acute exposure to Microcystis aeruginosa. *Neotropical ichthyology*, *10*(3), 613-622.

- **Gasmi, S., Rouabhi, R., Kebieche, M., Salmi, A., Boussekine, S., Toualbia, N., ... & Djabri, B.** (2016). Neurotoxicity of acetamiprid in male albino rats and the opposite effect of quercetin. Biotechnol Ind J, 12(7), 113.
- **Geier, M. C., Chlebowski, A. C., Truong, L., Simonich, S. L. M., Anderson, K. A., & Tanguay, R. L.** (2018). Comparative developmental toxicity of a comprehensive suite of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Archives of toxicology*, *92*(2), 571-586.
- **Gutfinger, T.** (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *58*(11), 966-968.
- **Halmi, S**. Etude botanique et phytochimique.
- **Han, J., Park, J. C., Kang, H. M., Byeon, E., Yoon, D. S., Lee, M. C., ... & Lee, J. S.** (2019). Adverse effects, expression of defense-related genes, and oxidative stress-induced MAPK pathway in the benzo [α] pyrene-exposed rotifer Brachionus rotundiformis. *Aquatic Toxicology*.
- **Haouli, A., Seridi, R., Djemli, S., Bourdjiba, O., & Frih, H.** (2015). Contribution to the analysis of Pistacia lentiscus extracted oil. American-Eurasian Journal of Agricultural and eEnvironmental Sciences, 15(6), 1075-81.
- **Hatcher, J. M., Pennell, K. D., & Miller, G. W.** (2008). Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective. Trends in pharmacological sciences, 29(6), 322-329.
- **He, J., Ji, X., Li, Y., Xue, X., Feng, G., Zhang, H., ... & Gao, M.** (2016). Subchronic exposure of benzo (a) pyrene interferes with the expression of Bcl-2, Ki-67, C-myc and p53, Bax, Caspase-3 in sub-regions of cerebral cortex and hippocampus. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *68*(2-3), 149-156.
- **He, M. L., Yuan, H. Q., Jiang, A. L., Gong, A. Y., Chen, W. W., Zhang, P. J., ... & Zhang, J. Y.** (2006). Gum mastic inhibits the expression and function of the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, *106*(12), 2547-2555.
- **IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** (2012). Chemical agents and related occupations. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, *100*(PT F), 9.
- **IARC.** (1983) Polynuclear aromatic compound: Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. In: humans IAfRoCmoteocrt (ed). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1-457.
- **International Agency for Research on Cancer.** (2010). *Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures* (Vol. 92). IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- **Iqbal, M., Sharma, S. D., Okazaki, Y., Fujisawa, M., & 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(1), 33-38.
- **Jacques, C., Perdu, E., Duplan, H., Jamin, E. L., Canlet, C., Debrauwer, L., ... & Zalko, D.** (2010). Disposition and biotransformation of 14C-benzo (a) pyrene in a pig ear skin model: ex vivo and in vitro approaches. *Toxicology letters*, *199*(1), 22-33.
- **Ji, X., Li, Y., He, J., Shah, W., Xue, X., Feng, G., ... & Gao, M.** (2016). Depletion of mitochondrial enzyme system in liver, lung, brain, stomach and kidney induced by benzo (a) pyrene. *Environmental toxicology and pharmacology*, *43*, 83-93.

- **Jiang, H., Gelhaus, S. L., Mangal, D., Harvey, R. G., Blair, I. A., & Penning, T. M.** (2007). Metabolism of benzo [a] pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography–mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*, *20*(9), 1331-1341.
- **Kao, J., Patterson, F. K., & 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*(3), 502-516.
- **Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Madhana, R. M., Dahiya, V., Budhani, M. K., ... & Gogoi, R.** (2016). Chemopreventive effect of chrysin, a dietary flavone against benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Pharmacological Reports*, *68*(2), 310-318.
- **Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Sriram, C. S., & Gogoi, R.** (2015). Benzo (a) pyrene induced lung cancer: role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports*, *67*(5), 996-1009.
- **Katakwar, P., Metgud, R., Naik, S., & Mittal, R.** (2016). Oxidative stress marker in oral cancer: a review. *Journal of cancer research and therapeutics*, *12*(2), 438.
- **Keller, D., Erö, C., & Markram, H.** (2018). Cell densities in the mouse brain: a systematic review. *Frontiers in neuroanatomy*, *12*, 83.
- **Khan, M., Maryam, A., Shakir, H. A., Qazi, J. I., & Li, Y.** (2018). Baohuoside I Inhibits Benzo (a) Pyrene-Induced Metastasis in A549 Lung Cancer Cells by Modulating STAT3 and EMT. *Pakistan Journal of Zoology*, *50*(6).
- **Kierszenbaum, A. L.** (2006). *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur.
- **Kim, J., Koo, S. I., & Noh, S. K.** (2012). Green tea extract markedly lowers the lymphatic absorption and increases the biliary secretion of 14C-benzo [a] pyrene in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, *23*(8), 1007-1011.
- **Kumar, M., Singh, G., Bhardwaj, P., Dhatwalia, S. K., & Dhawan, D. K.** (2017). Understanding the role of 3-O-Acetyl-11-keto-β-boswellic acid in conditions of oxidative-stress mediated hepatic dysfunction during benzo (a) pyrene induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*, *109*, 871-878.
- **Lacombe, M.** (2015). L'abrégé d'anatomie et de physiologie humaines. LAMARRE Editions, 7ème edition, 87-92, 105-110.
- **Li, F., Xiang, B., Jin, Y., Li, C., Li, J., Ren, S., ... & Luo, Q.** (2019). Dysregulation of lipid metabolism induced by airway exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in C57BL/6 mice. *Environmental pollution*, *245*, 986-993.
- **Li, Q., Gao, C., Deng, H., Song, Q., & Yuan, L.** (2019). Benzo [a] pyrene induces pyroptotic and autophagic death through inhibiting PI3K/Akt signaling pathway in HL-7702 human normal liver cells. *The Journal of toxicological sciences*, *44*(2), 121-131.
- **Lu, Q., Chen, K., Long, Y., Liang, X., He, B., Yu, L., & Ye, J.** (2019). Benzo (a) pyrene degradation by cytochrome P450 hydroxylase and the functional metabolism network of Bacillus thuringiensis. *Journal of hazardous materials*, *366*, 329-337.
- **Madeen, E., Siddens, L. K., Uesugi, S., McQuistan, T., Corley, R. A., Smith, J., ... & Turteltaub, K.** (2019). Toxicokinetics of benzo [a] pyrene in humans: Extensive metabolism as determined by UPLC-accelerator mass spectrometry following oral micro-dosing. *Toxicology and applied pharmacology*, *364*, 97-105.

- **Makiuchi, T., Sobue, T., Kitamura, T., Sawada, N., Iwasaki, M., Yamaji, T., ... & Tsugane, S.** (2018). Smoking, alcohol consumption, and risks for biliary tract cancer and intrahepatic bile duct cancer. *Journal of epidemiology*, JE20180011.
- **Mao, C., Wang, M., Qian, B., Ouyang, L., Shi, Y., Liu, N., ... & Liu, S.** (2018). Aryl hydrocarbon receptor activated by benzo (a) pyrene promotes SMARCA6 expression in NSCLC. *American journal of cancer research*, *8*(7), 1214.
- **Mapuskar, K. A., Anderson, C. M., Spitz, D. R., Batinic-Haberle, I., Allen, B. G., & Oberley-Deegan, R. E.** (2019, January). Utilizing Superoxide Dismutase Mimetics to Enhance Radiation Therapy Response While Protecting Normal Tissues. In *Seminars in radiation oncology* (Vol. 29, No. 1, pp. 72-80). WB Saunders.
- **Marklund, S., & Marklund, G.** (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, *47*(3), 469-474.
- **Mehta, R., Meredith-Brown, M., & Cohen, G. M.** (1979). Metabolism and covalent binding of benzo [a] pyrene in human peripheral lung. *Chemico-biological interactions*, *28*(2-3), 345-358.
- **Mezni, F., Khouja, M. L., Gregoire, S., Martine, L., Khaldi, A., & Berdeaux, O.** (2014). Effect of growing area on tocopherols, carotenoids and fatty acid composition of Pistacia lentiscus edible oil. Natural product research, 28(16), 1225-1230.
- **Mezni, F., Shili, S., Ben Ali, N., Larbi Khouja, M., Khaldi, A., & Maaroufi, A.** (2016). Evaluation of Pistacia lentiscus seed oil and phenolic compounds for in vitro antiproliferative effects against BHK21 cells. *Pharmaceutical biology*, *54*(5), 747-751.
- **Mezni, F., Slama, A., Ksouri, R., Hamdaoui, G., Khouja, M. L., & Khaldi, A.** (2018). Phenolic profile and effect of growing area on Pistacia lentiscus seed oil. *Food chemistry*, *257*, 206-210.
- **Michel, B. O. T. I. N. E. A. U.** (2015). *Guide des plantes à fruits charnus comestibles et toxiques*. Lavoisier.
- **Mitchell, C. E.** (1982). Distribution and retention of benzo (a) pyrene in rats after inhalation. *Toxicology letters*, *11*(1-2), 35-42.
- **Mokbel, H., ElMoll, A., Liaud, C., & Millet, M.** (2015). Développement de Méthodes d'Analyses pour Évaluer les Niveaux de Contamination Atmosphérique de OCP, PCB et HAP. *Lebanese Science Journal*, *16*(2), 47-64.
- **Moody, R. P., Joncas, J., Richardson, M., & Chu, I**. (2007). Contaminated soils (I): In vitro dermal absorption of benzo [a] pyrene in human skin. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *70*(21), 1858-1865.
- **Moody, R. P., Nadeau, B., & Chu, I.** (1995). In vivo and in vitro dermal absorption of benzo [a] pyrene in rat, guinea pig, human and tissue-cultured skin. *Journal of dermatological science*, *9*(1), 48-58.
- **Moreau, M., Ayotte, P., & Bouchard, M.** (2015). Kinetics of diol and hydroxybenzo [a] pyrene metabolites in relation to DNA adduct formation and gene expression in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *78*(12), 725-746.
- **Murawska-CiaŁowicz, E., Jethon, Z., Magdalan, J., Januszewska, L., Podhorska-OkoŁów, M., Zawadzki, M., ... & Dzięgiel, P.** (2011). Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the liver, kidneys and brain of rats

administered with benzo (a) pyrene. *Experimental and toxicologic pathology*, *63*(1-2), 97-103.

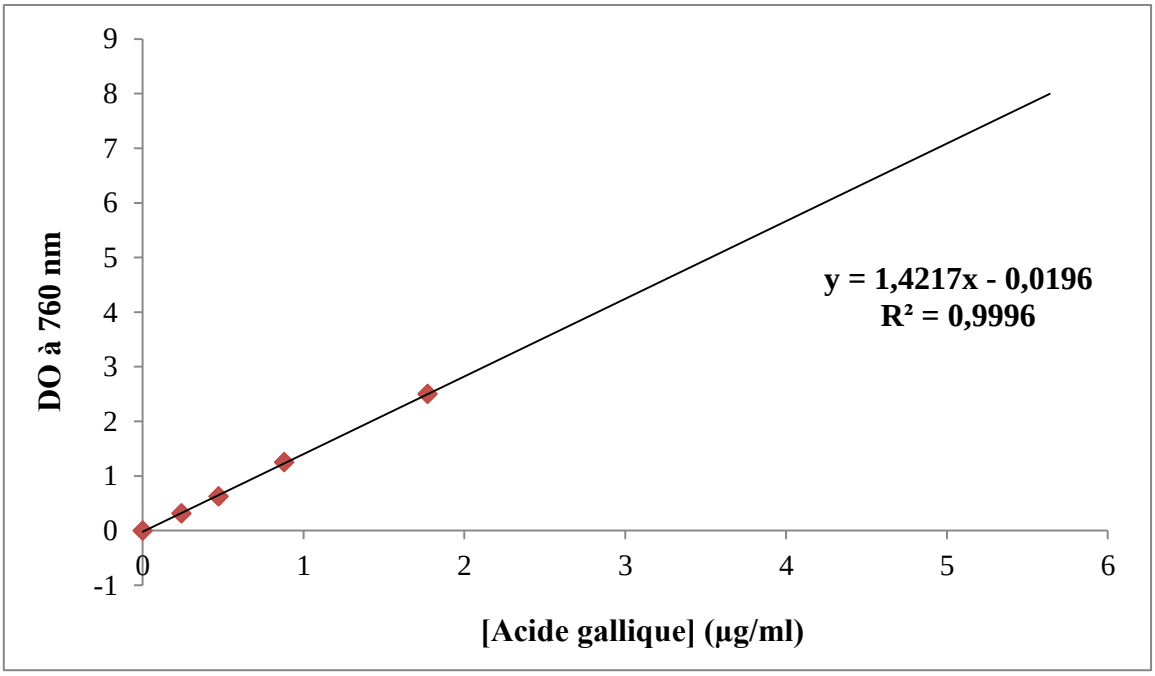
- **Nahida, A. S., & Siddiqui, A. N**. (2012). Pistacia lentiscus: a review on phytochemistry and pharmacological properties. Int J Pharm Pharm Sci, 4(4), 16-20.
- **Nejib, M. E. K. N. I. (**2011). GC/MS Chemical Analysis of Pistashia lentiscus fatty oil from the north of Tunisia.
- **Nzila, A.** (2018). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives. *Environmental Pollution*, *239*, 788-802.
- **Oliveira, J. P. B. D., Alexandre, R. S., Negreiros, J. R. D. S., Lopes, J. C., & Bruckner, C. H.** (2012). Lipid peroxidation and seed emergency in progenies of the yellow passion fruit plant. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *34*(3), 711-718.
- **Ollivier, D., Boubault, E., Pinatel, C., Souillol, S., Guérère, M., & Artaud, J.** (2004). Analyse de la fraction phénoliques des huiles d'olive vierges. In *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique* (Vol. 965, pp. 169-196).
- **Omidian, K., Rafiei, H., & Bandy, B.** (2017). Polyphenol inhibition of benzo [a] pyrene-induced oxidative stress and neoplastic transformation in an in vitro model of carcinogenesis. *Food and chemical toxicology*, *106*, 165-174.
- **Patri, M., Padmini, A., & Babu, P. P.** (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their neurotoxic potency in association with oxidative stress: a brief perspective. *Annals of Neurosciences*, *16*(1), 22-30.
- **Pehnec, G., & Jakovljević, I.** (2018). Carcinogenic Potency of Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Relation to the Particle Fraction Size. *International journal of environmental research and public health*, *15*(11), 2485.
- **Pena, A. M.** (2006). *Génération de seconde harmonique par le collagène et application à l'étude de fibroses par microscopie multiphoton* (Doctoral dissertation).
- **Penning, T. M.** (2014). Human aldo-keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemical research in toxicology*, *27*(11), 1901-1917.
- **Penning, T. M.** (2017). Genotoxicity of ortho-quinones: reactive oxygen species versus covalent modification. *Toxicology research*, *6*(6), 740-754
- **Penning, T. M. (Ed.).** (2011). *Chemical carcinogenesis*. Springer Science & Business Media.
- **Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C.** (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry*, *16*(2), 359-364.
- **Procházková, J., Strapáčová, S., Svržková, L., Andrysík, Z., Hýžďalová, M., Hrubá, E., ... & Espinosa, J. M.** (2018). Adaptive changes in global gene expression profile of lung carcinoma A549 cells acutely exposed to distinct types of AhR ligands. *Toxicology letters*, *292*, 162-174.
- **Prokopec, S. D., Pohjanvirta, R., Mahiout, S., Pettersson, L., & Boutros, P. C.** (2019). Transcriptomic Impact of IMA-08401, a Novel AHR Agonist Resembling Laquinimod, on Rat Liver. *International journal of molecular sciences*, *20*(6), 1370.
- **Quiros, P. M., Mottis, A., & Auwerx, J.** (2016). Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nature reviews Molecular cell biology*, *17*(4), 213.

- **Ransohoff, R. M.** (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, *353*(6301), 777-783.
- **Rees, E. D., Mandelstam, P., Lowry, J. Q., & Lipscomb, H.** (1971). A study of the mechanism of intestinal absorption of benzo (a) pyrene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *225*(1), 96-107.
- **Reitznerová, A., Šuleková, M., Nagy, J., Marcinčák, S., Semjon, B., Čertík, M., & Klempová, T.** (2017). Lipid peroxidation process in meat and meat products: a comparison study of malondialdehyde determination between modified 2-Thiobarbituric acid spectrophotometric method and reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Molecules*, *22*(11), 1988.
- **Rengarajan, T., Rajendran, P., Nandakumar, N., Lokeshkumar, B., Rajendran, P., & Nishigaki, I.** (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *5*(3), 182-189.
- **Robinett, N. G., Culbertson, E. M., Peterson, R. L., Sanchez, H., Andes, D. R., Nett, J. E., & Culotta, V. C.** (2019). Exploiting the vulnerable active site of a copper-only superoxide dismutase to disrupt fungal pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(8), 2700-2713.
- **Rouet, P., Alexandrov, K., Markovits, P., Frayssinet, C., & Dansette, P. M.** (1981). Metabolism of benzo [a] pyrene by brain microsomes of fetal and adult rats and mice. Induction by 5, 6 benzoflavone, comparison with liver and lung microsomal activities. *Carcinogenesis*, *2*(9), 919-926.
- **Rudyk, O., & Eaton, P.** (2014). Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox biology*, *2*, 803-813.
- **Salam, S., Velli, S. K., Krishnan, P., Selvanathan, I., Murugan, M., Subramaniam, N., & Thiruvengadam, D.** (2018). Anti-Cancer efficacy of Umbelliferone against Benzo (a) pyrene-induced Lung Carcinogenesis in Swiss Albino Mice. *Malaya Journal of Biosciences (MJB)*, *5*(2), 79-89.
- **Sar, D., Kim, B., Ostadhossein, F., Misra, S. K., & Pan, D.** (2018). Revisiting Polyarenes and Related Molecules: An Update of Synthetic Approaches and Structure-Activity-Mechanistic Correlation for Carcinogenesis. *The Chemical Record*, *18*(6), 619-658.
- **Saunders, C. R., Das, S. K., Ramesh, A., Shockley, D. C., & Mukherjee, S.** (2006). Benzo (a) pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, *26*(5), 427-438.
- **Shahid, A., Ali, R., Ali, N., Hasan, S. K., Bernwal, P., Afzal, S. M., ... & Sultana, S.** (2016). Modulatory effects of catechin hydrate against genotoxicity, oxidative stress, inflammation and apoptosis induced by benzo (a) pyrene in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *92*, 64-74.
- **Shahid, A., Ali, R., Ali, N., Hasan, S. K., Rashid, S., Majed, F., & Sultana, S.** (2016). Attenuation of genotoxicity, oxidative stress, apoptosis and inflammation by rutin in benzo (a) pyrene exposed lungs of mice: plausible role of NF-κB, TNF-α and Bcl-2. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, *13*(1), 17-29.
- **Shahid, A., Ali, R., Ali, N., Kazim Hasan, S., Barnwal, P., Mohammad Afzal, S., ... & Sultana, S.** (2017). Methanolic bark extract of Acacia catechu ameliorates benzo (a) pyrene

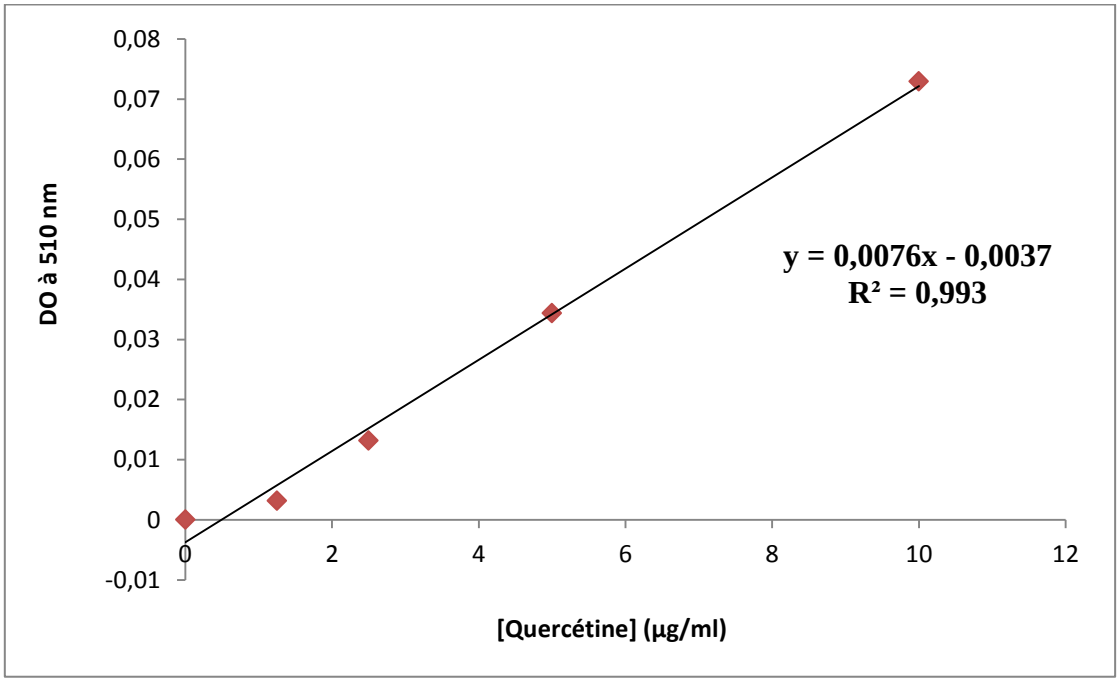
induced lung toxicity by abrogation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in mice. *Environmental toxicology*, *32*(5), 1566-1577.

- **Shi, Q., Boots, A. W., Maas, L., Veith, C., van Kuijk, K., Haenen, G. R., ... & Van Schooten, F. J.** (2017). Effect of interleukin (IL)-8 on benzo [a] pyrene metabolism and DNA damage in human lung epithelial cells. *Toxicology*, *381*, 64-74.
- **Shi, Q., Godschalk, R. W. L., & Van Schooten, F. J.** (2017). Inflammation and the chemical carcinogen benzo [a] pyrene: Partners in crime. *Mutation Research/reviews in Mutation Research*, *774*, 12-24.
- **Shinde, R., & McGaha, T. L.** (2018). The aryl hydrocarbon receptor: connecting immunity to the microenvironment. *Trends in immunology*.
- **Shpilka, T., & Haynes, C. M.** (2018). The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, *19*(2), 109.
- **Siddens, L. K., Bunde, K. L., Harper Jr, T. A., McQuistan, T. J., Löhr, C. V., Bramer, L. M., ... & Baird, W. M**. (2015). Cytochrome P450 1b1 in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-induced skin carcinogenesis: Tumorigenicity of individual PAHs and coal-tar extract, DNA adduction and expression of select genes in the Cyp1b1 knockout mouse. *Toxicology and applied pharmacology*, *287*(2), 149-160.
- **Sies, H.** (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, *7*, 122-126.
- **Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999).** [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- **Smit, E., Caiment, F., Piepers, J., Kleinjans, J. C., & van den Beucken, T.** (2018). Translational regulation is a key determinant of the cellular response to benzo [a] pyrene. *Toxicology letters*, *295*, 144-152.
- **Spyridopoulou, K., Tiptiri-Kourpeti, A., Lampri, E., Fitsiou, E., Vasileiadis, S., Vamvakias, M., ... & Galanis, A.** (2017). Dietary mastic oil extracted from Pistacia lentiscus var. chia suppresses tumor growth in experimental colon cancer models. *Scientific reports*, *7*(1), 3782.
- **STORM, E. J., COLLIER, W. S., STEWART, F. R., & BRONAUGH, L. R. (1990).** Metabolism of xenobiotics during percutaneous penetration: role of absorption rate and cutaneous enzyme activity. *Toxicological Sciences*, *15*(1), 132-141.
- **Suomalainen, A., & Battersby, B. J.** (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*, *19*(2), 77.
- **Tawaha, K., Alali, F. Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T.** (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, *104*(4), 1372-1378.
- **Tylichová, Z., Neča, J., Topinka, J., Milcová, A., Hofmanová, J., Kozubík, A., ... & Vondráček, J.** (2019). n-3 Polyunsaturated fatty acids alter benzo [a] pyrene metabolism and genotoxicity in human colon epithelial cell models. *Food and Chemical Toxicology*, *124*, 374-384.
- **Uno, S., Nebert, D. W., & Makishima, M.** (2018). Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) protects against nonalcoholic fatty liver disease caused by Western diet containing benzo [a] pyrene in mice. *Food and chemical toxicology*, *113*, 73-82.

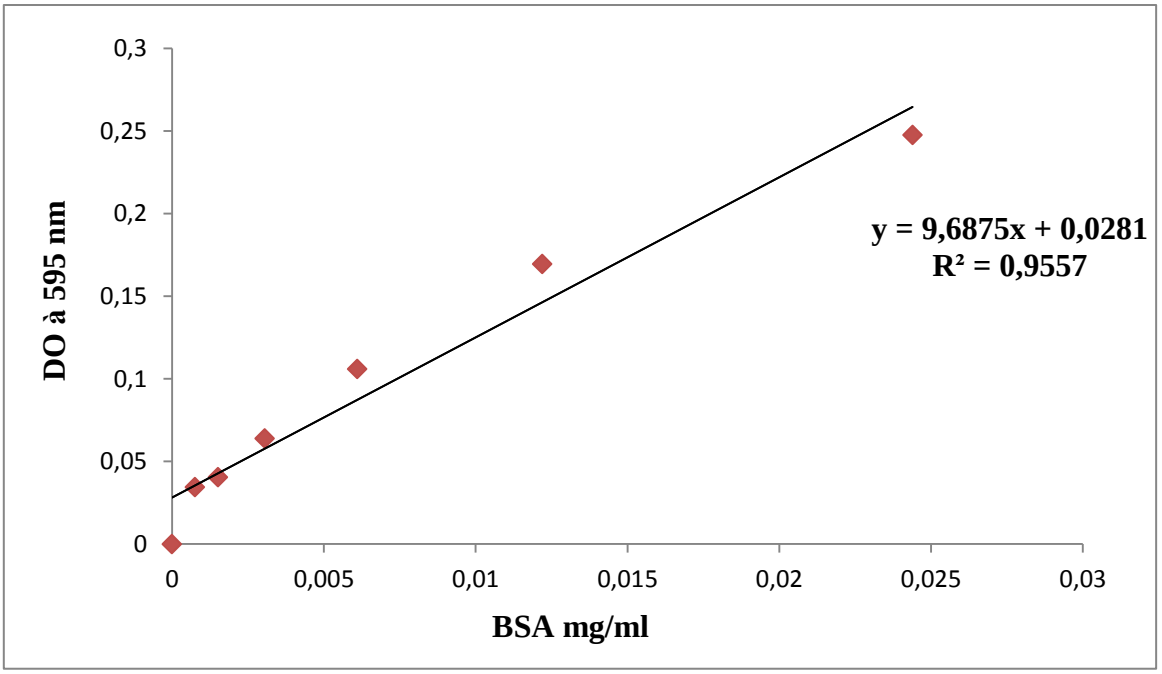
- **Vázquez-Gómez, G., Rocha-Zavaleta, L., Rodríguez-Sosa, M., Petrosyan, P., & Rubio-Lightbourn, J.** (2018). Benzo [a] pyrene activates an AhR/Src/ERK axis that contributes to CYP1A1 induction and stable DNA adducts formation in lung cells. *Toxicology letters*, *289*, 54-62.
- **Yang, H., Zhang, H., Pan, T., Wang, H., & Wang, Y.** (2018). Benzo (a) pyrene promotes migration, invasion and metastasis of lung adenocarcinoma cells by upregulating TGIF. *Toxicology letters*, *294*, 11-19.
- **Yang, Y., Griffiths, W. J., Midtvedt, T., Sjövall, J., Rafter, J., & Gustafsson, J. Å.** (1999). Characterization of conjugated metabolites of benzo [a] pyrene in germ-free rat urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, *12*(12), 1182-1189.
- **Yang, Y., Sjövall, J., Rafter, J., & Gustafsson, J. Å.** (1994). Characterization of neutral metabolites of benzo [a] pyrene in urine from germfree rats. *Carcinogenesis*, *15*(4), 681-687.
- **Zapletal, O., Procházková, J., Dubec, V., Hofmanová, J., Kozubik, A., & Vondráček, J.** (2019). Butyrate interacts with benzo [a] pyrene to alter expression and activities of xenobiotic metabolizing enzymes involved in metabolism of carcinogens within colon epithelial cell models. *Toxicology*, *412*, 1-11.
- **Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W.** (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2016*.
- **Zhang, W., Tian, F., Zheng, J., Li, S., & Qiang, M.** (2016). Chronic administration of benzo (a) pyrene induces memory impairment and anxiety-like behavior and increases of NR2B DNA methylation. *PloS one*, *11*(2), e0149574.



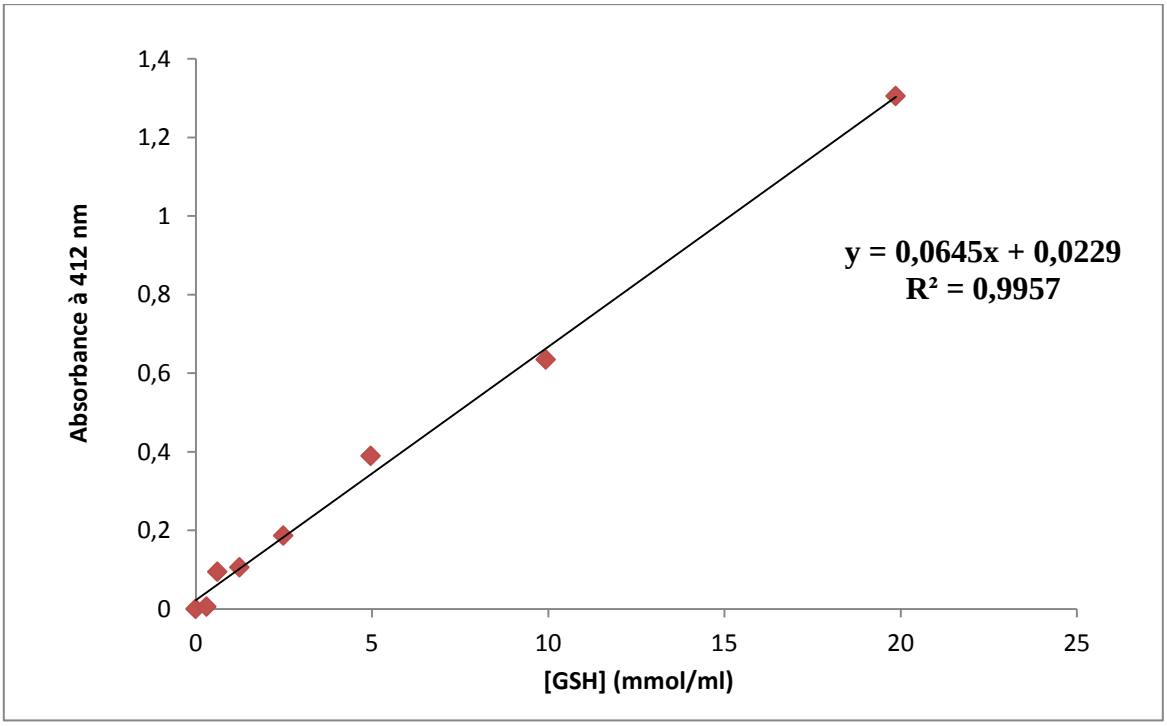
Annexe 1. Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols en µg/ml (Acide gallique utilisé comme standard).



Annexe 2. Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes en µg/ml (quercétine utilisée comme standard).



Annexe 3. Courbe d'étalonnage des protéines (BSA utilisée comme standard).



Annexe 4. Courbe d'étalonnage de glutathion (GSH).

Evaluation de l'effet préventif de l'huile de fruits du pistachier lentisque de la région de Jijel contre la toxicité aiguë cérébrale et pulmonaire induite par le benzo[a]pyrène in vivo chez la souris.

Résumé

Le benzo[a]pyrène (B[a]P) est l'un des hydrocarbures aromatiques polycycliques hautement toxique, qui peut induire une toxicité aiguë ou chronique en provoquant des effets mutagènes et cancerigènes. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer d'une part, la toxicité aiguë pulmonaire et cérébrale induite par le B[a]P (100mg/kg) *in vivo* sur des souris *Swiss albinos*, et d'autre part l'effet préventif de l'huile fixe de fruits de *pistacia lentiscus* L. (HFPL) (1.66 ml/kg/jours pendant 5 jours) contre cette toxicité. Notre expérimentation portant sur l'étude phytochimique de l'extrait hydro-méthanolique de l'huile fixe de fruits de *Pistacia lentiscus* L. a révélé de fortes teneurs en composés phénoliques. L'analyse des paramètres cytosoliques marqueurs du stress oxydatif dans les tissus pulmonaire et cérébral au cours des différents traitements a montré un désequilibre des défenses antioxydantes par le B[a]P se traduisant par une induction des activités enzymatiques de la CAT et de la SOD, avec une augmentation du taux de MDA et une diminution de taux du GSH. Ces résultats sont confirmés par l'exploration histologique qui a dévoilé des lésions tissulaires au niveau des organes étudiés. Cependant, le traitement préventif par l'HFPL a régulé les paramètres du stress oxydatif et a protégé les tissus cérébral et pulmonaire contre la toxicité du HAP.

Mots clés : benzo[a]pyrène, toxicité cérébral et pulmonaire, stress oxydatif, *Pistacia lentiscus L.*

Abstract

Benzo[a]pyrene (B[a]P) is one of the highly toxic polycyclic aromatic hydrocarbons that can induce acute or chronic toxicity by causing mutagenic and carcinogenic effects.

The main objective of this study is to evaluate, on the one hand, the acute pulmonary and cerebral toxicity induced by B[a]P (100 mg / kg) *in vivo* in Swiss albino mice, and on the other hand the preventive effect of the fixed oil of *Pistacia lentiscus* L. fruit (HFPL) (1.66 ml / kg / day for 5 days) against this toxicity. Our experiment based on the phytochemical study of the hydro-methanolic extract of the fixed fruit oil of *Pistacia lentiscus* L. revealed high levels of phenolic compounds. The analysis of the cytosolic parameters marking the oxidative stress in the pulmonary and cerebral tissues during the different treatments showed an imbalance of the antioxidant defenses by the B[a]P resulting in an induction of the enzymatic activities of CAT and SOD, with an increase in the MDA rate and a decrease in GSH rates. These results are confirmed by histological exploration which revealed tissue lesions in the organs studied. However, preventive treatment with HFPL regulated the parameters of oxidative stress and protected the brain and lung tissue against PAH toxicity.

Key words: benzo[a]pyrene, cerebral and pulmonary toxicity, oxidative stress, *Pistacia lentiscus* L.

ملخص

يعتبر البنزو(ا)بيرين ,ب(ا)ب واحد من الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات شديدة السمية التي يمكن ان تحدث سمية حادة أو مزمنة عن طريق التسبب في آثار مطفرة و مسرطنة. الهدف الرئيسي من هده الدراسة هو تقييم التسمم الرئوي و الدماغي الحاد المحفز بالبنزو(ا)بيرين (100 ملغ/كغم) في الجسم الحي عند الفئران البيضاء Swiss albinos من ناحية, و من ناحية أخرى التأثير الوقائي لزيت الضرو (1.66 مل/كغ/يوم لمدة 5 أيام) ضد هده السمية .أظهرت الدراسة الكيميائية النباتية للمستخلص الميثانولي المائي لزيت فاكهة الضرو وجود مستويات عالية من المركبات الفينولية .كما اظهر تحليل المعلمات الخلوية للإجهاد التاكسدي في الأنسجة الرئوية و الدماغية خلال العلاجات المختلفة خللا في دفاعات مضادات الأكسدة عند المعالجة ب البنزو(ا)بيرين : الأنشطة الإنزيمية ل CAT و SOD, مع زيادة في معدل MDA و انخفاض في معدلات GSH. تم تأكيد هده النتائج من خلال الدراسة النسيجية التي كشفت عن تلف الأنسجة في الأعضاء المدروسة. العلاج الوقائي ب HFPL أدى إلى تنظيم معالم الإجهاد التاكسدي و حماية أنسجة المخ و الرئة ضد سمية ال ب(ا)ب.

الكلمات المفتاحية : البنزو(ا)بيرين, سمية دماغية و رئوية, الإجهاد التاكسدي, زيت فاكهة الضرو.