

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

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



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم: البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Sciences Pharmacologiques

Thème

*Evaluation de l'effet protecteur de la propolis de jigel
contre la toxicité aigüe cardiaque et pancréatique
induit par le benzo[a]pyrène chez la souris*

Membres de Jury :

Présidente : M^{me} KEBSA WIDAD

Examineur : Pr. LAHOUEL MESBAH

Encadreur : Dr. LARICHE NESRINE

Présenté par :

Bouchoura Fatima Zohra

Boudjerda Yasmina

Année Universitaire 2018-2019

Remerciement

Avant tout nous remercions « Allah » le tout puissant pour la force, le courage, la volonté et la patience qui nous a donné pour accomplir ce travail et qui nous a toujours guider vers le bon chemin.

Ce travail de mémoire a atteint son terme grâce à l'assistance et à la collaboration de nombreuses personnes. Nous profite de cette occasion de gratitude et de reconnaissance pour remercier tous ceux qui de loin ou de près ont contribué.

*Nous voudrions exprimer nos reconnaissances et nos sincères remerciements à notre encadreur «**Dr.Lariche Nesrine**» qui a tout d'abord accepté la conduite et la direction de notre travail, par sa rigueur scientifique, par ses conseils et ses encouragements et pour tout ce qu'elle a fait pour nous.*

*Notre respect et reconnaissance sont adressés à monsieur le directeur de Laboratoire de Toxicologie Moléculaire à l'université **Mehammed Seddik Benyahia de JIJEL** «**Pr.Lahouel Mesbah**» pour sa grande compétence, son aide, son accueil au sein de son laboratoire.*

*Nous remercions vivement les membres de jury **Mme Kébsa Widad** et **Pr.Lahouel Mesbah** qui nous ont fait l'honneur de juger notre travail de mémoire.*

Nous tenons à remercier tous les ingénieurs du laboratoire de pharmacologie expérimentale pour leurs aides précieux,

*Nos plus vifs remerciements à **Dr. Belghiat Leila**, Docteur au laboratoire d'anatomie et cytopathologie d'EPH – jijel. Nous remercions également l'équipe de laboratoire de l'anatomopathologique pour l'aide qu'il nous apporter dans la confection des coupes histologiques.*

Dédicaces

A cœur vaillant rien d'impossible

A conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre

Tout vient à point à qui sait attendre

A l'aide d'Allah le tout puissant, qui nous a tracé le chemin de la vie, nous avons pu réaliser ce travail qui nous dédions :

A nos très chers pères

A nos très chères mères

A nos grands-mères et grands-pères

A nos frères et sœurs

A tous les membres de nos familles, petites et grandes

A nos chères amies

A nos professeurs

A tous les membres de notre promotion



Yasmina & Fatima Zohra

Remerciements	
Liste des abréviations.....	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction.....	1
Analyse bibliographiques	
Chapitre I. Anatomie et physiologie pancréatique et cardiaque.....	2
I.1. Tissu cardiaque.....	2
I.2. Tissu pancréatique.....	3
Chapitre II : Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).....	4
II.1. Benzo[a]pyrène.....	5
II.1.1. Caractéristiques physico-chimiques du B[a]P.....	6
II.1.2. Toxicocinétique du B[a]P.....	8
II.1.2.1. Absorption.....	8
II.1.2.2. Distribution.....	9
II.1.2.3. Excrétion.....	10
II.1.3. Voies d'activation du benzo[a]pyrène.....	10
II.1.3.1. Voie de la voie du B[a]P diol-époxyde	10
II.1.3.2. Voie du radical cation.....	11
II.1.3.3. Voie des quinones.....	11
II.1.4. Toxicité aigüe du B[a]P.....	12
II.1.4.1. Toxicité rénale et hépatique.....	12
II.1.4.2. Toxicité cardiovasculaire.....	13
II.1.4.3. Toxicité pulmonaire.....	13
II.2. Production des ROS par le B[a]P.....	13
Chapitre III : Importance thérapeutique de la propolis comme produit d'origine naturelle.....	15
III.1. Composition chimique de la propolis.....	15
III.2. Propriétés thérapeutiques de la propolis.....	16

III.2.1. Activité antioxydante	16
III.2.2. Effet cardioprotecteur.....	16
III.2.3. Autres effets.....	16

Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	18
I.1. Benzo[a]pyrène.....	18
I.2. Récolte et préparation de l'extrait brut éthanolique de la propolis.....	18
II. Méthodes.....	18
II.1. Dosage des composés phénolique de l'extrait de la propolis (Chekfa).....	18
II.1.1. Dosage des polyphénols totaux.....	18
II.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux	19
II.2. Evaluation de l'effet de la propolis sur le stress induit par le benzo[a]pyrène <i>in vivo</i>.....	19
II.2.1. Entretien et traitement des animaux.....	19
II.2.2. Dosage tissulaire	20
II.2.2.1. Préparation de la fraction cytosolique.....	20
II.2.2.2. Dosage des protéines totales	20
II.2.2.3. Mesure du taux de glutathion cytosolique (GSH).....	20
II.2.2.4. Dosage du MDA cytosolique.....	21
II.2.2.5. Mesure de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique (SOD).....	21
II.2.2.6. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase.....	22
II.2.3. Etude histopathologique.....	22
II.2.4. Analyse statistique.....	23

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion.....	24
III.1. Teneur en polyphénols et flavonoïdes	24
III.2. Effet <i>in vivo</i> du B[a]P et la propolis sur les paramètres du stress oxydant	25
III.2.1. variation des taux de glutathion cytosolique cardiaque et pancréatique	25

III.2.2. variation du taux de la peroxydation lipidique des cellules cardiaques et pancréatique	26
III.2.3 Variation de l'activité enzymatique de la SOD et CAT cardiaque et pancréatique	29
III.3. Etude histologique microscopique cardiaques et pancréatiques induites par le benzopyrène et effet protecteur de la propolis.....	32
Conclusion	35
Références bibliographique.....	36
Annexes	

ADN	Acide désoxyribonucléique
Akr	Aldo kéto réductase
ApoE	Apolipoprotéine E
B[a]P	benzo[a]pyrène
BaPDE	7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo[a]pyrene
BBC	Bleu Brillant de Coomassie
BSA	Albumine sérique bovine
BPQ	B[a]P quinone
CAT	Catalase
CYP 450	Cytochrome (s) P 450
DO	Densité optique
DTNB	Acide 5,5-dithio-2-nitrobenzoïque
EAG	Equivalent Acide Gallique
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EEP	Extrait Ethanolique de la Propolis
EQ	Equivalent Quercétine
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion oxydé
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HE	Hématoxyline / éosine
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
IP	Intra péritonéale
MDA	Malondialdéhyde
NQO1	NAD(P) H quinone oxidoreductase 1
OH[°]	Radical hydroxyle
OH⁻	Ions hydroxyles
O₂^{°-}	Anion superoxyde
Pc	Poids corporelles
pH	Potentiel d'hydrogène
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Acide thiobarbituriques

TBARS	Thiobarbituriques acide reactive substance
TCA	Acide trichloracétique
TNB	Acide thionitrobenzoïque
Tris-Hcl	Trishydroxyméthylaminométhane Hydrochloride
UI	Unité international

Figure 1: anatomie macroscopique du cœur.....	2
Figure 2: coupe histologique du pancréas	4
Figure 3: Structure des HAPs classés prioritaires par l'agence Américaine de protection de l'environnement.....	5
Figure 4: Structure du benzo[a]pyrène.....	6
Figure 5: Structure chimique du benzo[a]pyrène (cancérogène) et du pyrène (non cancérogène).....	6
Figure 6: Les 3 voies d'activation du benzo[a]pyrène.....	12
Figure 7: Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de la propolis Algérienne (Chekfa).....	24
Figure 8: Variations du taux du GSH cytosolique cardiaque et pancréatique après traitement par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et /ou la propolis (25 mg /kg).....	25
Figure 9: Variations du taux du MDA cytosolique cardiaque et pancréatique après traitement par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et /ou la propolis (25 mg / kg).....	27
Figure 10: Variations de l'activité enzymatique de la catalase et de la superoxyde dismutase cytosolique dans le cœur et le pancréas des souris après traitement par le B[a]P et /ou la propolis.....	29
Figure 11: Examen des coupes histologiques cardiaque des différents lots observées au microscope optique G x100.....	32
Figure 12 : Examen des coupes histologiques pancréatique des différents lots observées au microscope optique G x100.....	33

Tableau 1 : Principales caractéristiques physico-chimiques du B[a]P.....7

Tableau 2 : Distribution du B[a]P en pourcentage de la dose administrée après administration intraveineuse de 40 µmol/kg sur des rats Sprague-Dawley.....9

Tableau 3 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de la propolis Algérienne (Chekfa)..... 24

Parmi les substances toxiques le Benzo[a]pyrène (B[a]P) qui est l'un des hydrocarbures aromatiques polycycliques présentant un risque toxicologique particulier. Il est produit à la suite d'une combustion incomplète des combustibles fossiles, le bois et d'autres matières organiques (**Sheweita, 2000**). Le B[a]P peut amplifier la production des espèces oxygénées réactives (EOR) aboutissant à un stress oxydant (**Bouayed et bohn, 2010**).

Le stress oxydatif survient suite à la présence d'un déséquilibre entre la production des (EOR) et la capacité des systèmes biologiques à réparer les dommages oxydatifs ou neutraliser les effets des intermédiaires réactifs formés incluant les peroxydes et les radicaux libres. L'augmentation de la production des EOR et la diminution de l'efficacité des mécanismes de défense antioxydants conduisent à des dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADN (**Udensi et Tchounwou, 2016**).

Le stress oxydatif et la génération des espèces oxygénées réactives (EOR), causeraient également divers dommages et perturbations moléculaires et cellulaires dans plusieurs maladies humaines (**Savas, 2012**).

Pour neutraliser les effets négatifs des radicaux libres sur les tissus et les cellules, une grande variété de mécanismes antioxydants et de réparation a été évolué (**Khansari et al., 2009**). Les cellules contiennent des enzymes, comme la superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx) et de la catalase (CAT), pour surmonter les tissus de potentiels effets néfastes des ERO. Ces enzymes sont des composants antioxydants importants de plusieurs mécanismes de défense naturels qui empêchent la déformation à l'oxydation (**Gul et al., 2000**).

Les antioxydants sont des composés qui permettent d'éliminer piègent et empêcher la formation d'ERO, ou s'y opposent leurs actions (**Sheweita et al., 2005**). Parmi eux, nous mentionnons la propolis. L'activité antioxydante de la propolis est liée en partie à ses propriétés de piégeage de radicaux et à forte teneur en phénols de la résine.

Ce qui nous a amené a posé les questions suivantes :

Le benzo[a]pyrène possède-t-il un effet toxique sur les tissus cardiaques et pancréatiques ? Et Quel est le pouvoir de la propolis à inhiber la production des radicaux libre et a protégé les tissus cardiaques et pancréatiques ?

Pour répondre à ces questions, nous avons fixés les objectifs de notre travail consacré à caractériser la capacité du B[a]P *in vivo* à induire le stress oxydant chez des souris Swiss et plus spécifiquement dans le cœur et le pancréas, et le pouvoir de la propolis à inhiber la production des radicaux libre, en évaluant les paramètres du stress oxydatif.

Chapitre I. Anatomie et physiologie pancréatique et cardiaque

I.1 Tissu cardiaque

Le cœur est un organe de forme conique n'est pas plus gros qu'un poing fermé et son poids varie entre 250 et 350g. Il est logé à l'intérieur du médiastin inférieur, cavité centrale du thorax osseux, et est bordé latéralement par les poumons (Marieb, 2008).

Le cœur, moteur central du corps humain, est composé de deux ventricules : le ventricule gauche et le ventricule droit. Chacun des ventricules dispose de sa propre fonction. Chacune de ces fonctions est intimement liée au cycle cardiaque. Le cycle cardiaque est composé de deux phases : la systole et la diastole.

Lors de la systole, le ventricule droit réceptionne le sang désoxygéné et le propulse dans les artères pulmonaires afin de le recharger en oxygène. Pendant ce temps, le ventricule gauche récupère le sang oxygéné venant des poumons et le distribue à l'ensemble du corps. Durant la diastole, toutes les parties du cœur sont relâchées. On assiste alors à un remplissage passif des ventricules à partir des oreillettes.

Ces mouvements cardiaques sont assurés par la contraction du cœur. Cette contraction est réalisée par le myocarde, c'est-à-dire le muscle entourant le cœur. Celui-ci se contracte de façon rythmique à une certaine fréquence appelée la fréquence cardiaque (figure 1) (Milaire *et al.*, 2001).

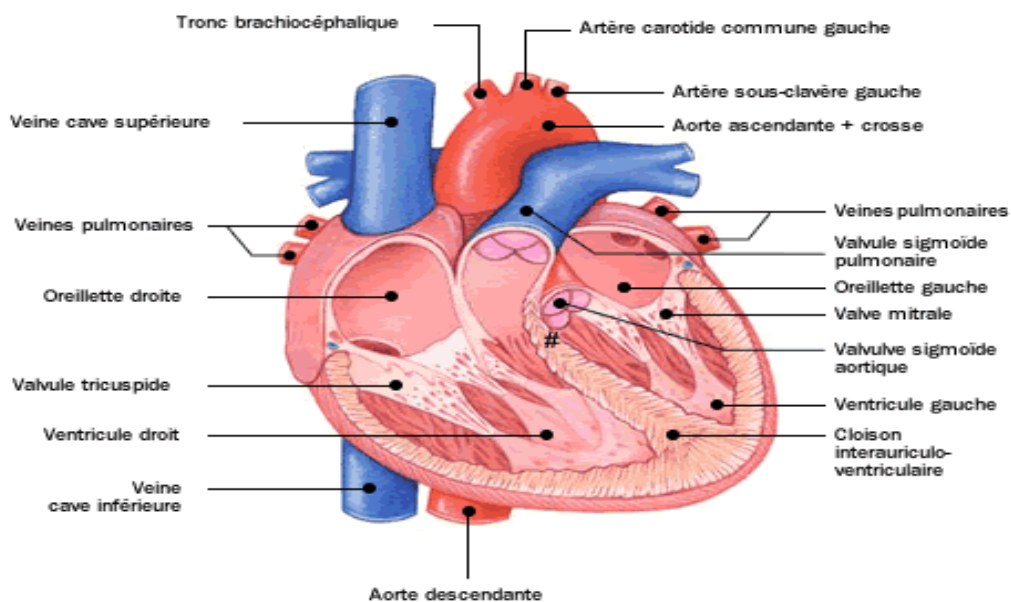


Figure 1: Structure du cœur (Marieb, 2008).

I.2. Tissu pancréatique

Le pancréas est une glande digestive accessoire située derrière l'estomac, et s'étend depuis le duodénum vers la rate, croisant plus ou moins transversalement la paroi abdominale postérieure, dans l'espace rétropéritonéal. le pancréas a voisine les 15 cm de long pour une masse allant de 70 à 100g. C'est la deuxième glande la plus grosse en volume après le foie (**Auberval, 2010**). Il peut être subdivisé en quatre régions : la tête, le col, le corps et la queue (**Moore et Dalley, 2001**).

Le pancréas est une glande à la fois exocrine et endocrine. Il a une capacité de sécrétion hormonale directement dans le système sanguin (rôle endocrine) mais aussi de sécrétion d'enzymes dans le tube digestif (rôle exocrine) (**Wang et al., 2011**).

La fonction exocrine du pancréas est assurée par les acini connectés à un réseau de canaux et qui est responsable de la sécrétion et du déversement dans le duodénum du suc pancréatique contenant des enzymes nécessaires à la digestion.

Les îlots de Langerhans sont responsables de la fonction endocrine du pancréas. Ils sont constitués de 4 types cellulaires différents, où les cellules p se retrouvent au centre et sont entourées des cellules α , β , δ et PP. Les cellules p constituent la majorité des cellules endocrines et sont responsables de la sécrétion d'insuline alors que les cellules α , β , δ et PP produisent et sécrètent respectivement le glucagon, la somatostatine et le polypeptide pancréatique. L'importante vascularisation des îlots de Langerhans permet au pancréas d'accomplir sa principale fonction endocrine soit de contrôler la glycémie (**Tortora, 2001**).

L'insuline est la seule hormone hypoglycémisante connue. L'action d'insuline est médiée par un récepteur. Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire et il est exprimé sur presque tous les types cellulaires des vertébrés. Le récepteur à l'insuline est un récepteur à activité tyrosine Kinase (**Klein et Fanny, 2009**).

la synthèse de l'insuline dans les îlots de Langerhans du Pancréas s'effectue à partir de l'information génétique contenue dans l'ADN, située sur le chromosome 11 (**Melloul et al., 2002**), assure au niveau des ribosomes, la mise en séquence des divers acides aminés de la future molécule d'insuline. la cellule β au niveau de REG, fabrique la pro insuline à partir d'un précurseur appelé pré-pro-insuline.

La pro-insuline constitue d'une seule chaîne polypeptidique, est transformée dans l'appareil de Golgi en insuline et peptide C. L'insuline et le peptide sont stockés sous forme de granules de sécrétion à l'intérieur des cellules β (**Amadou, 2006**). La libération de l'insuline stockée se fait par un mécanisme dit l'exocytose (figure 2).

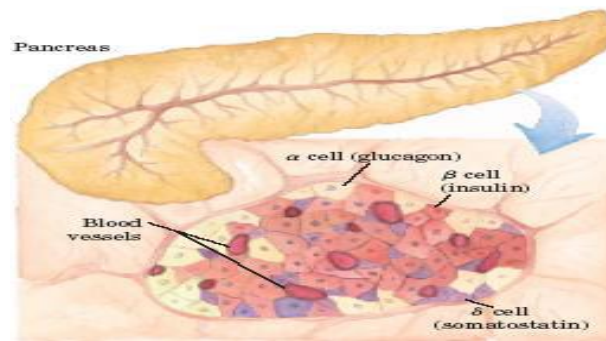


Figure 2: Structure du pancréas (Nelson et Cox, 2004).

Chapitre II : Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les HAPs sont des substances omniprésentes dans l'environnement. Ils se présentent sous forme de mélanges complexes, une centaine de ces composés se retrouve dans l'atmosphère (Lee *et al.*, 1976). Seulement 16 d'entre eux sont considérés comme ayant un potentiel toxique élevé (Figure 3).

De manière générale, les HAPs se forment naturellement au cours de la combustion des matières organiques comme les feux de forêt ou les éruptions volcaniques. C'est la combustion incomplète de la matière organique à haute température qui est responsable de la formation des HAPs (Nikolaou et Monvier 1984).

Les propriétés physiques des HAPs varient selon leur masse moléculaire et leur structure. Les HAPs sont très hydrophobes donc peu solubles dans l'eau. Ils ont aussi un fort potentiel de bioaccumulation dans les organismes et leur dégradation environnementale est lente (Canada, 1994).

Les HAPs sont toujours émis sous forme de mélange, avec des proportions variables entre ces différents composés selon la source d'émission. Ils sont considérés comme des substances cancérigènes capables d'induire une série de gènes tel que les oncogènes impliqués dans la large gamme de pathologies des tissus y compris le cancer (Bansal *et al.*, 2014). Le B[a]P compte parmi les substances d'HAPs ayant un potentiel cancérigène, pour cette raison, il demeure encore beaucoup étudié (Marnett et Gregory, 1979).

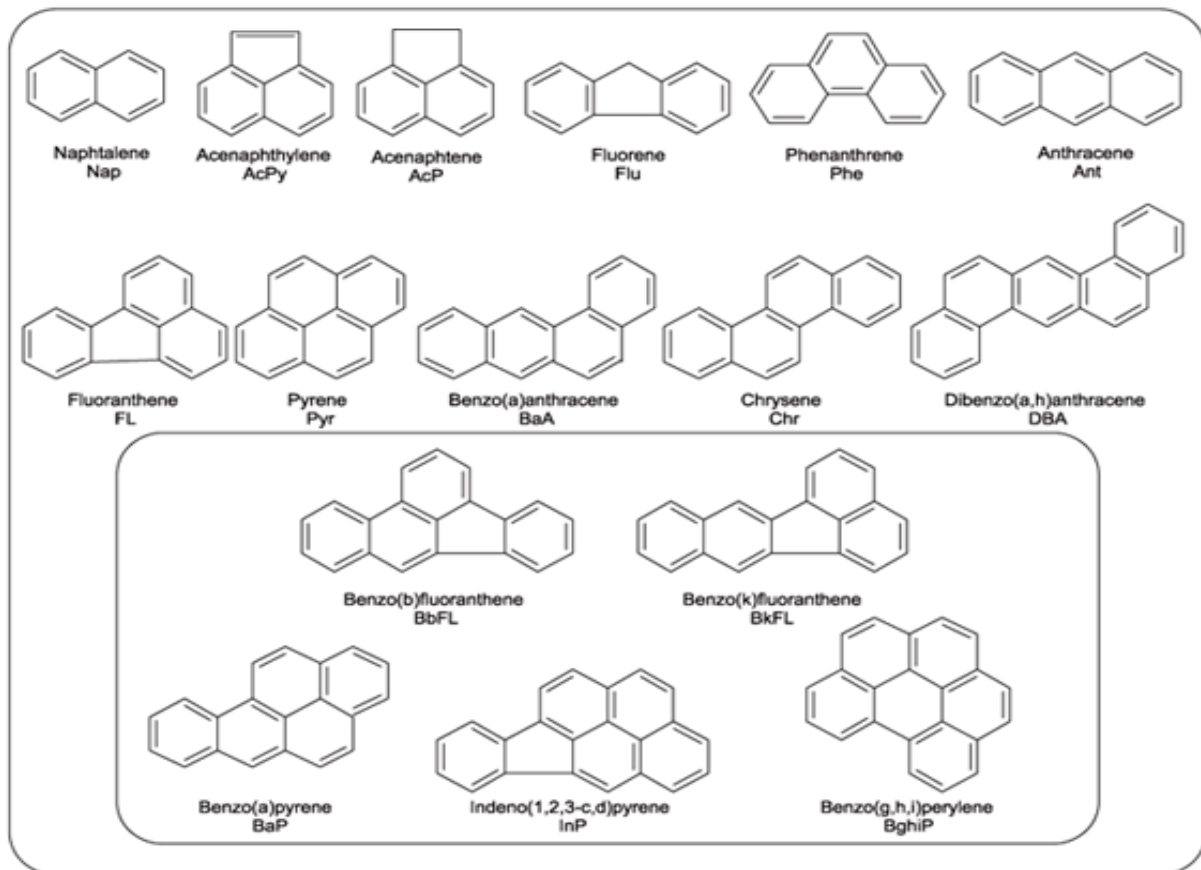


Figure 3: Structure des HAPs classés prioritaires par l'agence Américaine de protection de l'environnement (Paulo, 2008).

Parmi les HAPs les plus étudiés, on compte le B[a]P, qui a été classé cancérigène reconnu chez l'humain par le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC, 2010).

II.1. Benzo[a]pyrène

Le B[a]P est un composé chimique solide qui a un poids moléculaire de 252.32 g /mol, une solubilité égale à 6 et un point de fusion de 179 C° ; il est soluble dans les hydrocarbures aromatiques, cependant sa solubilité dans l'eau est faible (0.2 à 6.1 mg/l) (figure 4) (Bisson *et al.*, 2006).

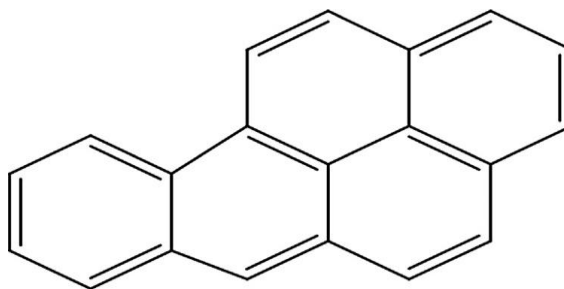


Figure 4: Structure du benzo[a]pyrène (Kasala *et al.*, 2015).

Il est constitué de deux régions qui sont des sites de réactions chimiques (Figure 05). Une région k de grande densité électronique et de haute activité métabolique qui comprise entre le quatrième et cinquième carbone, et une région baie (pour être cancérigène) considérée comme étant très réactive, comprise entre le neuvième et le douzième carbone (Marie, 2007).

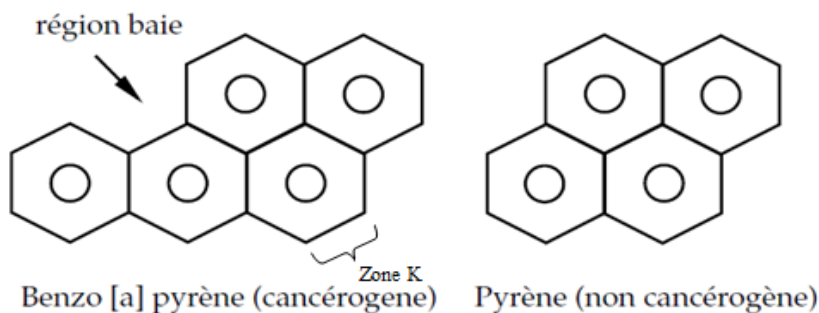
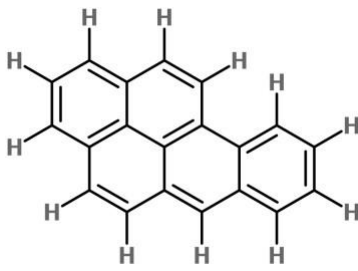


Figure 5 : Structure chimique du benzo[a]pyrène (cancérogène) et du pyrène (non cancérogène) (Marie, 2007).

II.1.1. Caractéristiques physico-chimiques du B[a]P

Le nom officiel du B[a]P selon l'Union internationale de chimie pure et appliquée est benzo(a)pyrène et benzo[a]pyrène. Son numéro de CAS est le 50-32-8. Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées au Tableau 1 (IARC, 1983 ; IARC, 2010).

Tableau 1: Principales caractéristiques physico-chimiques du B[a]P (IARC, 1983).

Propriété chimique	
Formule moléculaire	C ₂₀ H ₁₂
Structure chimique	
Numéro de registre	50-32-8
Noms	B(a)P
Poids moléculaire (g/mol)	252,3
État physique	Solide, jaune pâle
Odeur	Légère odeur aromatique
Propriété physique	
Point de fusion (°C)	178,1
Point d'ébullition (°C)	310-312
Densité (g/cm ³)	1,351
Solubilité dans l'eau (% de la masse)	Insoluble, 3×10^{-7} à 25 °C
Solubilité dans d'autres milieux	Très soluble dans le chloroforme, soluble dans le benzène, le toluène et le xylène

II.1.2. Toxicocinétique du B[a]P

II.1.2.1. Absorption

L'absorption du B[a]P par voie orale est rapide et présente un comportement exponentiel (**Rees et al., 1971**). Dans une expérience sur des cochons cathétérisés, Laurent et ces collaborateurs ont mesuré la radioactivité du B[a]P marqué au C14 dans la veine porte dans l'heure qui suivait l'administration orale. La radioactivité a atteint sa valeur maximale après cinq heures. Une autre expérience de Rees et ces collaborateurs ont mesuré de grandes concentrations de B[a]P dans les ganglions lymphatiques thoraciques trois heures après l'exposition intra-gastrique du B[a]P. Le tractus gastro-intestinal peut également contribuer à la biotransformation du B[a]P et les métabolites produits peuvent facilement traverser les parois intestinales pour atteindre la circulation sanguine. Dans une autre expérience sur des rats, Kawamura et ces collaborateurs (1988) ont démontré que la composition des aliments avec lesquels le B[a]P était administré avait un grand impact sur son absorption. Ainsi, lorsque le B[a]P était administré avec des aliments lipophiles, entre 42 et 50% du B[a]P était absorbé (en référence avec les résultats d'une injection intraveineuse). Pour d'autres types d'aliments, la proportion absorbée diminuait entre 20 et 30%.

L'absorption du B[a]P par voie cutanée est relativement rapide et la biotransformation *in vivo* représenterait un rôle important lors du processus d'absorption selon certains auteurs (**Kao et al., 1985; Storm et al., 1990; Ng et al., 1992; Jacques et al., 2010 ; Brinkmann et al., 2013**). Dans une étude sur des souris, en 1984 Sanders et ces collaborateurs ont observé l'absorption de 6% du marqué au C14 dans l'heure qui a suivi l'application. Dans une expérience *in vitro* sur la pénétration du B[a]P, des chercheurs ont trouvé des différences dans l'absorption du B[a]P au niveau de la peau dorsale de plusieurs espèces animales (**Kao et al., 1985**). Après vingt-quatre heures, la peau de la souris a permis une pénétration de 10% de la dose. L'absorption du B[a]P à travers la peau du ouistiti, du rat et du lapin était de l'ordre de 1 à 3% tandis que celle du cochon d'Inde a seulement été de 0,1%. Dans le même article, les auteurs ont évalué la pénétration du B[a]P à travers la peau humaine à 3%. Dans une autre étude sur l'absorption par voie cutanée *in vitro*, Moody et ces collaborateurs ont observé une absorption de 56% du B[a]P marqué au C14 en solution dans l'acétone par la peau humaine, tandis que seulement 15% a été absorbé lorsque la peau était exposée au sol de jardinage commercial enrichi au B[a]P marqué au C14.

II.1.2.2. Distribution

Le B[a]P absorbé est rapidement distribué dans les tissus. Or, la quantité du B[a]P distribué dans chaque tissu dépend de la voie et du véhicule d'administration (EPA, 1990). Peu importe la voie d'administration, des niveaux détectables du B[a]P sont retrouvés dans tous les organes et tissus entre quelques minutes et l'heure suivant l'administration (Moiret *al.*, 1998). Comme le B[a]P est une substance liposoluble, il est largement distribué dans les tissus adipeux et les glandes mammaires (Agbato, 2006). Des quantités élevées du B[a]P ont été également trouvées dans le foie (Fothet *al.*, 1988). La distribution importante du B[a]P dans le foie facilite la biotransformation par cet organe. Par ailleurs, il a été documenté que le B[a]P peut facilement traverser aussi la barrière placentaire chez le rat et la souris (Neubert et Tapken, 1988 ; Withey *et al.*, 1993 ; Madhavan et Naidu, 2000).

Tableau 2 : Distribution du B[a]P en pourcentage de la dose administrée après administration intraveineuse de 40 $\mu\text{mol/kg}$ sur des rats Sprague-Dawley (Marie *et al.*, 2010).

Tissus	Pourcentage de la dose administrée retrouvée sous forme de B[a]P							
	Temps après l'injection intraveineuse (h)							
	2	4	8	16	24	33	48	72
Sang	0,4	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Reins	0,5	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Foie	2,3	1,9	1,8	0,5	0,2	0,2	0,1	0,0
Poumons	17,0	10,2	17,6	16,9	8,0	11,2	7,4	5,2
Tissus adipeux	2,5	1,4	3,2	3,2	2,1	2,4	1,3	0,7
Peau	7,6	2,7	1,7	0,8	0,1	0,0	0,0	0,0
Fèces	0,0	0,0	0,0	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4
Total	30,3	16,5	24,6	21,6	10,8	14,2	9,1	6,3

II.1.2.3. Excrétion

Au début des années quatre-vingt, Chipman et ses collaborateurs ont démontré que l'excrétion biliaire était la principale voie d'élimination du B[a]P, indépendamment de la voie d'administration. Dans leurs études sur des rats dont le conduit biliaire a été canulé, ils ont observé une excrétion biliaire de 60% et une excrétion urinaire de 3% du B[a]P marqué au C14 six heures après une administration intraveineuse (**Chipman et al., 1982**). Étant donné son caractère lipophile et selon les expérimentations animales réalisées, il a été démontré que le B[a]P est métabolisé avant d'être excrété (**Likhachev et al., 1992**). Le tractus gastro-intestinal peut contenir des niveaux relativement élevés de métabolites résultant directement de la sécrétion biliaire à partir du foie (**Wiersma et Roth, 1983**). Chipman et ces collaborateurs (1982) ont également suggéré que l'élimination du B[a]P suite à l'exposition par voie orale serait plus rapide puisque l'effet du premier passage dans le foie aurait une contribution importante par rapport aux autres voies d'exposition. Auparavant, il avait déjà été démontré que le taux d'élimination était limité par le taux de métabolisme et non pas par le taux d'excrétion biliaire (**EPA, 1990; Schlede et al., 1970**). Ainsi, l'élimination fécale du B[a]P suite à son ingestion serait plus rapide que lors d'une absorption par inhalation ou par contact cutané (**EPA, 1990**).

En 1997, Bouchard et Viau ont analysé l'excrétion urinaire du B[a]P par voie orale, intraveineuse et cutanée chez le rat. Dans leur étude, ils ont observé une élimination urinaire des métabolites principaux du même ordre de grandeur pour les trois voies d'exposition et pour quatre doses différentes. Quant au B[a]P lui-même, la plupart des auteurs n'ont trouvé que des traces de cette substance. Ainsi, des études ont documenté que 0,00012% du B[a]P était excrété dans l'urine de rats dans les vingt-quatre heures après une exposition par voie intraveineuse (**Cao et al., 2005**). Aussi, 0,0065% de la dose du B[a]P se retrouvait dans l'urine de rats au cours des quatre-vingt-seize heures après une exposition par voie intrapéritonéale (**Lee et al., 2003**) tandis que Marie (2010) et ces collaborateurs n'ont pas détecté de B[a]P non métabolisé. Finalement, **Moir et al., (1998)** ont documenté une excrétion urinaire de 6,2, 5,7 et 7,2% trente-six heures après une exposition par voie intraveineuse de 2, 6 et 15 mg/kg de B[a]P marqué au C14 chez le rat.

II.1.3. Voies de métabolisation du benzo[a]pyrène

II.1.3.1. La voie du B[a]P diol-époxyde

La voie des adduits du B[a]P diol-époxyde (BPDE) implique trois réactions enzymatiques. Tout d'abord, une oxydation du B[a]P catalysée par les CYP 450 va conduire à la formation d'un époxyde. S'en suit une hydrolyse par un époxyde hydrolase microsomale formant un *trans*-

dihydrodiol (**Yang et al., 1977**). Pour finir, une nouvelle oxydation d'une double liaison adjacente à la fonction diol, via les CYP 450, va aboutir à la formation d'un diol-époxyde, ou 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tétrahydrobenzo(a)pyrene (BPDE) (**Hassan et al., 2011**).

Ce diol-époxyde est capable de réagir avec l'ADN et former des adduits préférentiellement au niveau des résidus de guanine, à savoir 10 (dioxycuanosin-N2-yl) -7,8,9-trihydroxy-7,8,9,10-tétrahydro (A) pyrène (A) (dG-N2-BPDE) (**Arlt et al., 2008**).

II.1.3.2. Voie du radical cation

La formation du radical cation se fait par l'arrachement d'un électron au B[a]P via une oxydation mono-électronique par les activités peroxydases des CYP 450 (**Lu et al., 2011**). Les adduits du radical cation sont relativement instables. Ils vont se fixer en position N7 des bases guanines et en position N7 ou N3 des bases adénines. Leur instabilité va conduire à une dépurination qui va résulter en la formation de sites apuriniques. Ces sites sont les lieux de dommages importants à l'ADN (**Devanesan et al. 1992**).

II.1.3.3. Voie des quinones

Il y a deux voies dans la formation des quinones. Lors de son métabolisme, le B[a]P va être transformé en diol B[a]P et plus particulièrement en 7,8-diol B[a]P. Ce dernier va être oxydé par des Aldo kéto réductase (Akr) en 7,8-dione-B[a]P ayant la capacité de se lier à l'ADN et libérant au passage des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (**Shou et al., 1993**). D'un autre côté, via la formation de 1,6- et 3,6-dione-B[a]P à partir de 6-OHB[a]P par des réarrangements non enzymatiques, les quinones vont exercer leur toxicité par des dommages à l'ADN ou la libération d'ERO (**Xue et Warshawsky, 2005**). Parmi les ERO, on trouve le radical anion superoxyde (O_2°) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Une interaction entre ces deux molécules ou la décomposition de H_2O_2 peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles (OH°) très réactifs vis-à-vis de l'ADN (**Kim et Lee, 1997**). Parallèlement, l'enzyme NQO1 va réduire les dommages en catalysant la transformation des quinones en hydroquinones, réduisant ainsi la cancérrogénicité des quinones (**Joseph et Jaiswal, 1994 ; Long et al., 2000**).

En plus d'intervenir dans la formation de mécanismes oxydatifs ayant des effets cancérogènes, les B[a]P diones pourraient aussi activer les CYP 450 et augmenter ainsi la formation d'adduits du BPDE (**Burczynski et Penning, 2000 ; Jiang et al., 2005**).

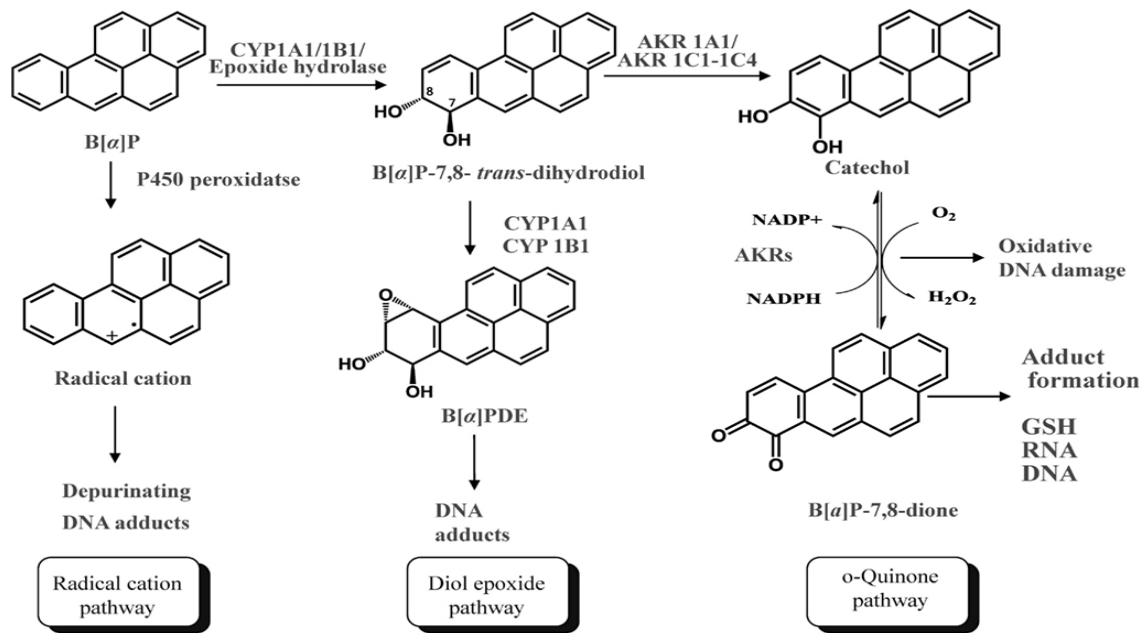


Figure 6: Les 3 voies d'activation du benzo[a]pyrène d'après (Zhang *et al.*, 2012).

II.1.4. Toxicité aiguë du B[a]P

II.1.4.1. Toxicité rénale et hépatique

Il a été constaté une augmentation du poids du foie chez les rats mâles et femelles ayant reçu une dose de B[a]P de 30 mg/kg p.c. par jour par gavage ainsi que chez les rats mâles ayant reçu une dose de 10 mg/kg p.c. par gavage (5 jours/semaine pendant 90 jours) (Kroese *et al.*, 2001) et chez les rats mâles exposés à une dose de 90 mg/kg p.c. par jour (5 jours/semaine pendant 35 semaines) (De Jong *et al.*, 1999). Une vaste étude sur la relation dose-réponse a été menée sur des rats F-344 mâles et femelles ayant reçu par voie alimentaire une dose de B[a]P de 0, 5, 50 ou 100 mg/kg p.c. par jour pendant 90 jours. Il a été enregistré une hausse significative du rapport entre le poids du foie et le poids corporel chez les mâles traités à la plus forte dose (100 mg/kg p.c. par jour), mais pas chez les femelles, quelle que soit la dose (Knuckles *et al.*, 2001).

Dans une autre étude, il a été administré par voie alimentaire à des rats F-344 mâles et femelles des doses de B[a]P de 5, 50 ou 100 mg/kg p.c. par jour pendant 90 jours. Il a été noté une augmentation des cylindres urinaires dans les reins des mâles traités aux doses intermédiaires et fortes, mais il n'a relevé aucun effet chez les femelles, quelle que soit la dose (Knuckles *et al.*, 2001). Les éléments indiquant que le B[a]P aurait des effets sur les fonctions rénale et hépatique sont donc limités.

II.1.4.2. Toxicité cardiovasculaire

Deux études ont été menées sur la susceptibilité à l'athérosclérose après une exposition au B[a]P. Il a été noté une augmentation de la taille moyenne des lésions athérosclérotiques dans l'arbre et les racines aortiques chez les souris sujettes à l'athérosclérose (sans apolipoprotéine E [ApoE]) ayant reçu du B[a]P par gavage en dose de 2,5 mg/kg poids corporelle par semaine pendant 24 semaines par rapport à des témoins traités à l'huile d'olive (Yang *et al.*, 2009). Il a aussi observé une athérosclérose chez les souris sans ApoE ayant reçu du B[a]P par gavage en dose de 5 mg/kg p.c. deux fois en une semaine par rapport à des témoins traités à la tricapriline (Knaapen *et al.*, 2007).

Parmi les autres effets cardiovasculaires relevés figurait une augmentation du poids du cœur et des marqueurs de l'hypertrophie. Il a été noté une hausse du rapport entre le poids du cœur et le poids corporel ainsi que des marqueurs de l'hypertrophie chez des rats Sprague-Dawley ayant reçu par injection intrapéritonéale une dose de B[a]P de 20 mg/kg p.c. par jour pendant 7 jours par rapport aux témoins traités à l'huile de maïs (Aboutabl *et al.*, 2009, 2011). Les effets cardiovasculaires néfastes du B[a]P pourraient également être transmis à la progéniture. Une étude semble indiquer que l'exposition *in vitro* à du B[a]P en dose de 0,6 ou 1,2 mg/kg p.c. entre les 14^e et 17^e jours embryonnaires (par gavage de rates à capuchon Long-Evans gravides) prédispose les petits à des déficits fonctionnels au niveau du développement cardiovasculaire et à des troubles cardiaques plus tard au cours de leur vie (Jules *et al.*, 2012).

II.1.4.3. Toxicité pulmonaire

Des expériences *in vivo* sur des rats suggèrent que le foie et le poumon sont les principaux organes de biotransformation du B[a]P (Harrigan *et al.*, 2006).

Chez des souris mâles et femelles, l'exposition par voie orale au benzo[a]pyrène induit une augmentation de l'incidence des adénomes pulmonaires et des leucémies (Rigdon et Neal, 1966). Dans une autre étude sous-chronique de vingt-six semaines sur des souris, l'administration intragastrique de 67-100 mg/kg de BaP a produit la formation d'adénomes pulmonaires (Sparnins *et al.*, 1986).

II.2. Production des ROS par le B[a]P

Les effets du stress oxydant sur la balance oxydative sont complexes : il peut bien diminuer la concentration et/ou l'activité des antioxydants de petites tailles par leur consommation, tandis que le taux des enzymes antioxydants augmente par expression moléculaire en cas d'un faible stress

(adaptation), soit la diminution de ces enzymes lorsque l'intensité du stress oxydatif est trop importante dans les cellules, donc ces effets dépendent de l'intensité du stress (**pincemail et al., 1999**).

De nombreux arguments ont permis de mettre en évidence une corrélation entre les métabolites du B[a]P et le stress oxydant. Le B[a]P est connu pour induire des quantités énormes des radicaux libres (**Sullivan, 1985; Livingstone, 2003; Anandakumar et al., 2008**).

Au cours du processus métabolique du B[a]P, des ERO sont produites par le CYT P450 1A1 (**Hassan et al., 2011**). Le B[a]P quinone (BPQ) est le métabolite le plus important du B[a]P, et qu'est associé à la production des ERO (**Burdick et al., 2003**), ce métabolite peut représenter un grand rendement dans une variété de tissus et exerce sa toxicité par des dommages à l'ADN via la libération des ERO sous forme de $O_2^{\circ-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , OH° , une interaction entre $O_2^{\circ-}$ et H_2O_2 ou la décomposition de H_2O_2 peuvent donner naissance à des radicaux hydroxyles (OH°) très réactif vis-à-vis de l'ADN (**Miller et Ramos, 2001**).

Chapitre III : Importance thérapeutique de la propolis comme produit d'origine naturel

La propolis est un matériau résineux qui rassemble les abeilles domestiques de l'écorce et les bourgeons de certains types de plantes et d'arbres. La propolis est un mélange très complexe de composants naturels. Il contient des acides aminés, des acides phénoliques, des esters d'acides phénoliques, l'acide cinnamique, des terpènes, des flavonoïdes, l'acide caféique, ... etc (**Bereket et al., 2014**).

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

III.1. Composition chimique de la propolis

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

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

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

III.2. Propriétés thérapeutiques de la propolis

La propolis est utilisée par l'homme sur le plan médical depuis des millénaires. Depuis une cinquantaine d'années, la littérature scientifique a rapporté et confirmé bon nombre d'activités santé de la propolis (**Khalil, 2006 ; Lotfy, 2006**).

La propolis possède des effets antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiparasitaires, antioxydants, hépatoprotectrices, immunomodulateurs, antitumoraux, antiradiation, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et autres activités. Ces propriétés en font un bon candidat pour son application en thérapie.

III.2.1. Activité antioxydante

Les flavonoïdes présents dans la propolis possèdent un fort effet antioxydant. Cette propriété est liée aux polyphénols et aux flavonoïdes pour lesquels il a été démontré qu'ils étaient capables de casser les réactions en chaînes sur les lipides, d'inhiber les réactions de chimioluminescences et de piéger les certains ERO. Les nombreux oligoéléments et minéraux de la propolis favorisent également l'action antioxydante (**Sauvager, 2014**). *In vivo*, la propolis réduit significativement la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumon et cerveau) et module l'expression des enzymes antioxydantes (catalase, superoxide dismutase, glutathion peroxydase) (**Sobocanec, 2006**).

III.2.2. Effet cardioprotecteur

La propolis diminue la tension sanguine et produit un effet sédatif. Les dihydroflavonoïdes contenant dans la propolis renforcent les capillaires. Elle produit une activité antihyperlipidique (**Kedzia et al., 1986**).

III.2.3. Autres effets

La propolis montre un effet préventif contre les neutropénies, anémies et thrombopénies consécutives aux traitements de chimiothérapie et radiothérapie (**Montoro et al., 2011 ; Benkovic et al., 2009**). Ces traitements anticancéreux sont particulièrement toxiques envers certains organes (foie, cœur, rein et neurone). Des études *in vitro* et *in vivo* ont aussi montré un effet protecteur de la propolis contre ces agents chimiques (**Alyane et al., 2008**). Des résultats similaires ont été trouvés avec des intoxications à différents xénobiotiques (paracétamol) (**Gonzalez et al., 1994**) et polluants environnementaux (métaux lourds) (**Bhadauria, 2008**).

Ces effets passent en partie par les propriétés antioxydantes de la propolis qui va protéger les cellules, contribuer au mécanisme de réparation de l'ADN et au mécanisme de défense endogène

(surexpression des enzymes antioxydantes, maintien du glutathion intracellulaire). Une étude a également montré que la propolis pouvait prévenir l'insulinorésistance induite chez l'animal. Cet effet passerait par une modulation du métabolisme des lipides et du glucose, une inhibition de la production d'IL-1 β et de l'activité de la NO synthase (**El-Sayed *et al.*, 2009**).

Notre travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Toxicologie de l'université de Jijel (LTM). Il est consacré à l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de la propolis de Jijel (Chekfa) contre la toxicité aigüe cardiaque et pancréatique induite par le B[a]P chez la souris.

I. Matériel

I.1. Benzo[a]pyrène

Nous avons utilisé le Benzo[a]pyrène (cat n°. B10080, Sigma Aldrich.). Il a été solubilisé dans l'huile d'olive à une concentration de 100 mg/kg et administré aux rats par voie IP.

I.2. Récolte et préparation de l'extrait brut éthanolique de la propolis

La propolis utilisée dans cette étude a été récoltée de la wilaya de Jijel par la coopérative apicole de la commune de chekfa. Pour la préparation de l'EEP, 100 grammes de propolis brute ont été additionnés à 900 ml d'éthanol 80° et laissés à macération pendant 10 jours. La solution est ensuite filtrée et évaporée à 65°. L'extrait résineux obtenu constitue l'extrait brut final. Pour notre étude, une solution hydroalcoolique (1% d'éthanol) a été préparée et administrée à une dose de 25 mg/kg.

II. Méthodes

II.1. Dosage des composés phénolique de l'extrait de la propolis (Chekfa)

II.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols de l'extrait est déterminé par le réactif du folin Ciocalteu (**Li et al., 2007**). L'interaction entre le folin-Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune et les résidus phénoliques conduit à la formation d'un complexe coloré en bleu dont l'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des polyphénols dans l'extrait. Pour cela, à 500 µl de l'extrait dilué en 1/100^{ème}, 2.25 ml d'eau distillé et 250µl du réactif folin-Ciocalteu (5%) sont additionnés, le mélange est bien agité par le vortex pendant 1 min. Après 5 min de repos, 2 ml d'une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) (7.5%) sont ajoutés au milieu réactionnel. Puis le mélange est incubé pendant 60 min à une température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite la densité optique est mesurée à 760 nm. La lecture se fait contre un blanc dans les mêmes conditions.

La concentration des polyphénols totaux est déterminés en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique préparé (0 - 400µg/ml) (annexe).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de propolis.

II.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Selon **Dewanto *et al.*, (2002)**, le dosage des flavonoïdes se fait par la méthode colorimétrique basé sur la formation d'un complexe jaune entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium. Pour cela 250µl de l'extrait dilué en 1/1000^{ème} sont mélangé avec 75µl de NaNO₂ (5%). Après un repos de 6mn, 150µl d'AlCl₃ (2%) et 500µl de NaOH (1M) sont ajoutés, le volume est complété par 2,5 ml d'eau distillée, ensuite la DO est lu à 510 nm.

Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercitine par 1g de propolis (mg EQ/g de propolis).

II.2. Evaluation de l'effet protecteur de la propolis contre le stress induit par le benzo[a]pyrène *in vivo*

II.2.1. Entretien et traitement des animaux

Notre étude *in vivo* a été réalisée sur des souris Swiss mâle (de l'Institut Pasteur d'Alger, Algérie). L'élevage des souris a été effectué au niveau de l'animalerie de l'université Mohammed Seddik Benyahia de Jijel.

Les animaux ayant un poids corporel entre 25 et 30 g sont élevés dans des cages et repartis en quatre lots. Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture. Ces souris ont été soumises à une période d'adaptation de 15 jours environ, aux conditions de l'animalerie à une température de 22°C.

Les différents traitements des souris :

Lot 01« Témoin (T) » : trois souris reçoivent 0.2 ml de véhicule (éthanol + eau distillé) par voie orale pendant 5 jours + une deuxième véhicule (oïl d'olive) aux 5^{ème} jours injecté par voie IP.

Lot 02« Benzo[a]pyrène (B) » : trois souris reçoivent 0.2 ml de véhicule par voie orale pendant 5 jours. Le B [a]P seule à 100 mg/kg dissout dans 0.5 ml d'huile d'olive est injecté au 5^{ème} jour par voie IP à un volume de 0.2 ml /souris.

Lot 03«propolis (P) + Benzo[a]pyrène (B) (BP) » : cinq souris reçoivent 0.3 ml de propolis (25 mg/kg) par voie orale pendant 5 jours. Le B [a]P seule à 100 mg/kg dissout dans 0.5 ml d'huile d'olive est injecté au 5^{ème} jour par voie IP à un volume de 0.2 ml.

Lot 04 « propolis (P) » : cinq souris reçoivent une dose unique par voie orale de propolis à 25 mg/kg dissout dans l'éthanol (1%) à un volume de 0.2 ml pendant 5 jours.

48 heures après le traitement par Le B[a]P et /ou la propolis, les animaux ont été sacrifiés, les organes (cœur et pancréas) ont été collectés, lavé à plusieurs reprises dans le NaCl 0.9% et imbibé en papier buvard pour débarrasser du sang, puis pesé et divisés en deux fractions. L'une a été fixée dans le formol tamponner 10% pour l'étude histopathologique, et l'autre fraction prolongé dans le tampon contenant du Kcl à 1.17 % pour la préparation de la fraction cytosolique et l'évaluation des paramètres du stress oxydatif cellulaire. A la fin les deux organes (cœur et pancréas) sont étiquetés et conservés dans un congélateur à -20 C° jusqu'à leurs utilisation.

II.2.2. Dosage tissulaire

II.2.2.1. Préparation de la fraction cytosolique

Pour évaluer les paramètres du stress au niveau cardiaque et pancréatique, la fraction cytosolique est préparée selon la méthode décrit par **Iqbal et al., (2003)**. Pour cela 0.5g de cœur ou 0.3 g de pancréas sont coupés et homogénéisés dans 3 volumes du tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) contenant du Kcl à 1.17 % à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse (Sigma, 3- 16 PK) à 2000 rpm pendant 15 mn à 4 C° pour séparer les débris nucléaires. Le surnageant obtenu est encore centrifugé à 9600 rpm à 4C° pendant 30 mn. Le surnageant obtenu est utilisé comme source d'enzymes.

II.2.2.2. Dosage des protéines totales

La teneur en protéines a été quantifiée par la méthode de Bradford (**1976**) qui est un dosage protéique de type colorimétrique impliquant la liaison du colorant Bleu Brillant de Coomassie (BBC) avec les acides aminés aromatique (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et avec les résidus hydrophobique d'acides aminés composants les protéines. Le changement d'absorbance à 595 nm est proportionnel à la quantité de colorant lié ; ainsi, en condition d'excès de colorant et en utilisant une gamme étalon d'un standard protéique nous pouvons déterminer la concentration protéiques d'un échantillon.

1ml de BBC a été ajouté à 50µl de l'échantillon dilué à 1/10^{ème}. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min, la DO a été lu à 595 nm. La concentration a été déterminée à partir d'une gamme étalon réalisé dans les mêmes conditions avec de l'albumine sérique bovine (BSA) de concentration (0-10 mg/ml).

II.2.2.3. Mesure du taux de glutathion cytosolique (GSH)

Le dosage du glutathion cardiaque et pancréatique a été réalisé selon la méthode colorimétrique d'Ellman (**Ellman, 1959**). Le principe de la réaction consiste en l'oxydation du GSH par le réactif

d'Ellman ou l'acide 5,5-dithio-2-nitrobenzoïque (DTNB), ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) ; dérivé thiol aromatique coloré, qui à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm.

Pour le dosage, 25 µl de la fraction cytosolique est homogénéisé avec 25 µl d'acide trichloracétique TCA (5%), Puis l'homogénat est centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min et 50 µl du surnageant ont été dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH= 8). A 3 ml du mélange de dilution, 20 µl du DTNB (0.01M) ont été additionnés.

Après une incubation de 15 min à 25 C°, l'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le tampon phosphate. Les concentrations sont exprimées en nmole/ mg de protéines.

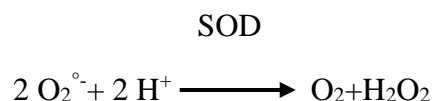
II.2.2.4. Dosage du MDA cytosolique

Le malondialdéhyde (MDA) est un marqueur de la peroxydation lipidique, il a été mesuré par le TBARS assay selon la méthode **d'Ohkawa *et al.*, (1979)**. Le dosage des TBARS (thiobarbituriques acide reactive substance) est basé sur la réaction du MDA avec le TBA (acide thiobarbituriques), sous conditions de haute température et d'acidité. Le complexe de couleur rouge MDA-TBA formé a été mesuré par colorimétrie à 532 nm.

Pour le dosage, à 0.25 ml de la fraction, 0.25 ml d'acide trichloracétique (20%) et 0.5 ml d'acide thiobarbiturique (0.67%) sont additionnés. Le mélange est chauffé à 100 C° pendant 15 min, refroidit puis additionné de 2 ml de n- butanol. Après centrifugation de 15 min à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant à l'aide d'un spectrophotomètre (SHIMADZU 1240). Le taux du MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions et les résultats sont exprimés en nmole/ mg de tissu.

II.2.2.5. Mesure de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase cytosolique (SOD)

La SOD est l'enzyme antioxydante la plus importante dans la défense contre le stress oxydatif. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ en peroxyde d'hydrogène et oxygène selon la réaction suivant :



Pour le dosage, nous avons mis 850 µl de tampon Tris-Hcl (50 mM, pH= 8.2), 100 µl EDTA (10 mM), 50 µl de pyrogallol (2.5 mM dans Hcl 10 mM) et 15 µl de la fraction cytosolique dans une

cuve en quartz, la lecture de la densité optique est effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes. Le taux de la SOD est exprimé en UI/ mg de protéines selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition totale (UI/mg de protéine)} = (\text{DO}_{\text{contrôle}} - \text{DO}_{\text{Echantillon}} / \text{DO}_{\text{contrôle}}) * 100$$

II.2.2.6. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité enzymatique de la catalase (CAT) est déterminée par la méthode de Claiborne, (1985) par analyse spectrophotométrique de taux de décomposition du peroxyde d'hydrogène en présence de source enzymatique qui se trouve au niveau de l'homogénat cardiaque et pancréatique. En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorbance à 240 nm de H₂O₂ chaque 1 min pendant 2 minutes.

L'évaluation de l'activité a été réalisé dans une cuve en quartz, nous avons mis 1ml du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0.1M, pH= 7.2), 975 µl d'H₂O₂ (0.019M) et 25 µl de la source enzymatique. La lecture de la densité optique est effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes.

L'activité de la catalase a été calculée par la formule :

$$\text{Activité catalase} = \frac{2.303}{T} \log \frac{A_1}{A_2} \quad (\text{UI})$$

Où :

T : l'intervalle de temps en minute

A1 : absorbance à t=0

A2 : absorbance à t=1 min ou 2 min

II.2.3. Etude hitopathologique

L'examen anatomopathologique consiste à analyser au microscope des cellules ou des tissus prélevés sur un organe (cœur et pancréas) ; on parle aussi d'examen histopathologique.

Pour la préparation des coupes histologiques, les prélèvements cardiaque et pancréatique des différents lots ont été préalablement fixés par passage de chaque prélèvement dans une série de bains d'alcools de concentrations croissantes qui déshydratent et dissolvent les graisses figurées intra-tissulaires ensuite de permettre l'imprégnation de la paraffine dans le tissu. L'imprégnation a été effectuée grâce à un distributeur automatique de paraffine. La coupe du bloc de paraffine au microtome nous a permis de réaliser des coupes très fines de 2 microns d'épaisseur. Les coupes ainsi obtenus sont déposées et collées sur des lames en verre.

Enfin, les coupes histologiques ont été déparaffinées au xylène et réhydratées dans des bains d'alcools de concentrations décroissantes. Pour permettre la mise en évidence des différentes structures tissulaires et cellulaires, les coupes obtenues ont été colorées par l'hématoxyline / éosine (HE); technique de coloration usuelle associant un colorant nucléaire (hématoxyline) et un colorant cytoplasmique (éosine).

L'examen au microscope optique permettant l'évaluation des changements pathologiques tissulaires cardiaque et pancréatique a été réalisée après montage de la préparation sous lamelle.

II.2.4. Analyse statistique

Les résultats graphiques de l'étude *in vivo* sont présentés sous forme de moyenne \pm d'écart-type. L'évaluation statistique est effectuée en comparant les moyennes des groupes traités par le B[a]P seul à celles des groupes témoins d'une part, et d'autre part à celles traités par la propolis en utilisant le test T de Student :

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

III. Résultats et Discussion

III.1. Teneur en polyphénols et flavonoïdes

Afin de caractériser l'extrait préparé à partir d'échantillon de la propolis, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux a été effectué. Les valeurs de la concentration et de l'écart type correspondant sont exprimées en mg d'équivalent d'acide Gallique par gramme d'extrait brut (mg EAG/g de protéines) pour les polyphénols et en mg d'équivalent de la quercétine par gramme d'extrait brut (mg EQ/g de protéine) pour les flavonoïdes. Les résultats sont représentés dans le tableau (3) et la figure (7).

Tableau 3 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de la propolis Algérienne (Chekfa).

	Polyphénols	flavonoïdes
Concentration (mg EAG, EQ)/g de propolis)	575.61±21.45	454.25±2.5

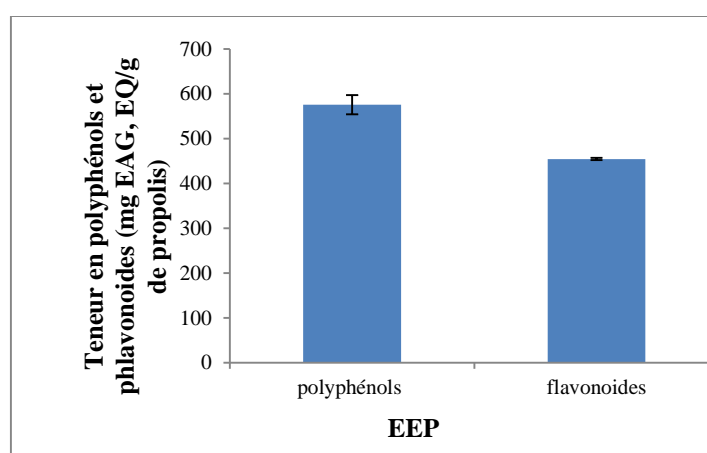


Figure 7 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de la propolis Algérienne (Chekfa).

A partir de dosage de l'extrait de la propolis nous avons constaté que la teneur des polyphénols est importante (575.61mgEAG / g de propolis), bien que la teneur des flavonoïdes totaux atteint (454.25 mg EQ / g de la propolis).

III.2. Etude in vivo du B[a]P et la propolis sur les paramètres du stress oxydant

III.2.1. variation des taux de glutathion cytosolique cardiaque et pancréatique

Les résultats de variation des taux du glutathion cytosolique du tissu cardiaque et pancréatique des souris traité par le B[a]P et/ou la propolis sont représentés dans la figure 8 (A) et 8 (B).

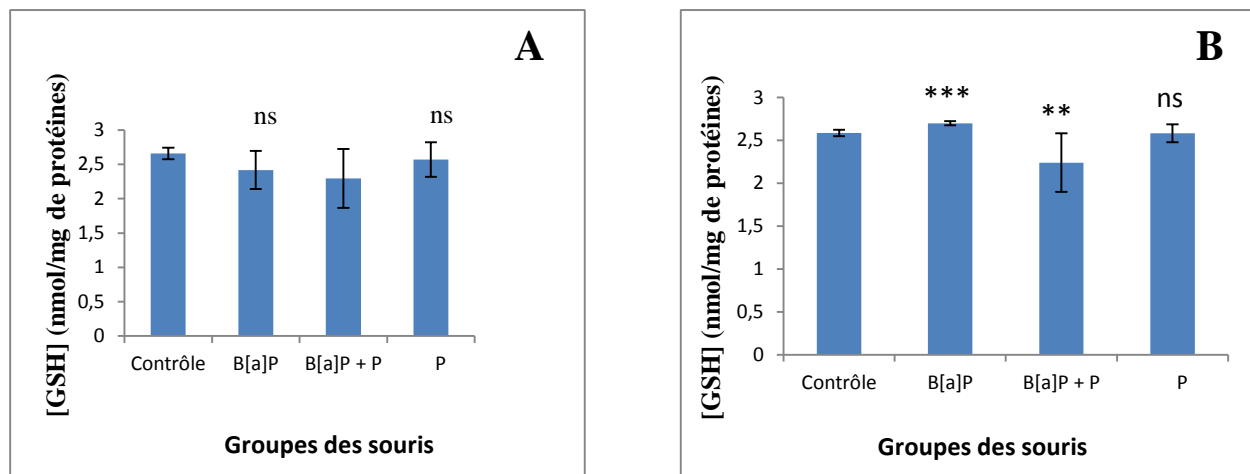


Figure 8 : Variations du taux du GSH cytosolique cardiaque et pancréatique après traitement par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et /ou la propolis (25 mg /kg).(A) : tissu cardiaque, (B) : tissu pancréatique. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type ; test de student : ns (non significative) ($p > 0.05$), (**): $0.001 < p < 0.01$; (***) : $p < 0.001$; (*): $0.01 < p < 0.05$; le groupe du B[a]P et le groupe (p) comparai par rapport au contrôle, le B[a]P + p : comparaison par rapport au B[a]P.

Le traitement des souris par le B[a]P pendant 48 h conduit à une diminution non significative ($p > 0.05$) du taux de GSH dans le cœur (2.42 ± 0.14) par rapport au contrôle (2.63 ± 0.08) et significative ($0.01 < p < 0.05$) chez le groupe (B[a]P +p) atteint (2.29 ± 0.42) par rapport au groupe B[a]P (2.42 ± 0.14) . On observe aussi par comparaison au contrôle une diminution non significative ($p > 0.05$) des souris qui reçoit seulement la propolis (2.57 ± 2.25).

Les souris traitées par le B[a]P seul montrent une augmentation des taux du glutathion cytosolique dans les cellules pancréatiques par rapport aux contrôles. Cette augmentation est très hautement significative ($p < 0.001$) après 48h du traitement (2.7 ± 0.02 nmole/mg contre 2.58 ± 0.03 nmole/ mg de protéines chez les témoins). Par contre une réduction de la teneur du glutathion a été observée chez les souris ayant le (B[a]P + propolis), cette réduction est très significative ($0.001 < p < 0.01$), atteint (2.24 ± 0.34 nmole/mg contre (2.7 ± 0.02 nmole/mg de protéines chez le groupe traité par le B[a]P seul). Aucune modification du taux de glutathion cytosolique n'a été observé après traitement des souris avec la propolis seul (25mg/kg) (2.58 ± 0.10 nmole/ mg de protéines contre 2.58 ± 0.03 nmole/ mg de protéines chez les témoins).

Le GSH est un tripeptide ubiquitaire essentiel contenant un groupement sulfhydryle qui le rend capable de protéger les cellules contre les oxydants, les composés électrophiles et les xénobiotiques.

Nos résultats montrent qu'il y a une diminution non significative du taux du glutathion dans les cellules cardiaque et une augmentation très significative du taux du GSH dans les cellules pancréatique des souris traités par le B[a]P par rapport au témoin contrairement à la littérature où la réserve de glutathion a été diminué à cause de leurs consommation lors des réactions de conjugaison avec les métabolites de B[a]P, avec les produits de la peroxydation lipidique et avec l'H₂O₂ (**Rahman et MacNee, 1999**). La déplétion en GSH dans le cœur des souris traités par le B[a]P est probablement due d'une part à un accroissement de son utilisation par les cellules cardiaques dans la détoxification des métabolites réactifs toxiques de B[a]P, et d'autre part à une diminution de la synthèse du GSH ou une augmentation de son oxydation en GSSG oxydé par les radicaux libres au cours du stress oxydant causé par le B[a]P.

Aussi l'augmentation du GSH dans le tissu pancréatique peuvent être expliqués par une mutation au niveau de l'EH. La mutation (TC) au niveau de l'exon 3 est associée à une diminution de l'activité de l'enzyme de près de 50 % et à une diminution de la quantité d'adduits BPDE à l'ADN (**Pastorelli et al., 1998**). Sachant que la voie du GSH est très importante pour la détoxification du BPDE (**Srivastava et al., 1999**), donc la diminution de la formation de BPDE conduit à la diminution de la consommation du GSH.

Dans le milieu non enzymatique la propolis augmentent le niveau de GSH et de protéger l'ADN de peroxyde d'hydrogène, des molécules d'oxygène singulet et les attaques d'électrons hydraté (**Di Carlo et al., 1999**).

III.2.2. variation du taux de la peroxydation lipidique des cellules cardiaques et pancréatique

Les résultats de la variation des taux du MDA cytosolique des cardiomyocytes et tissu pancréatique chez les souris traité par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et /ou la propolis (25 mg /kg) sont regroupé dans la figure 9 (A) et 9 (B) ci- dessous :

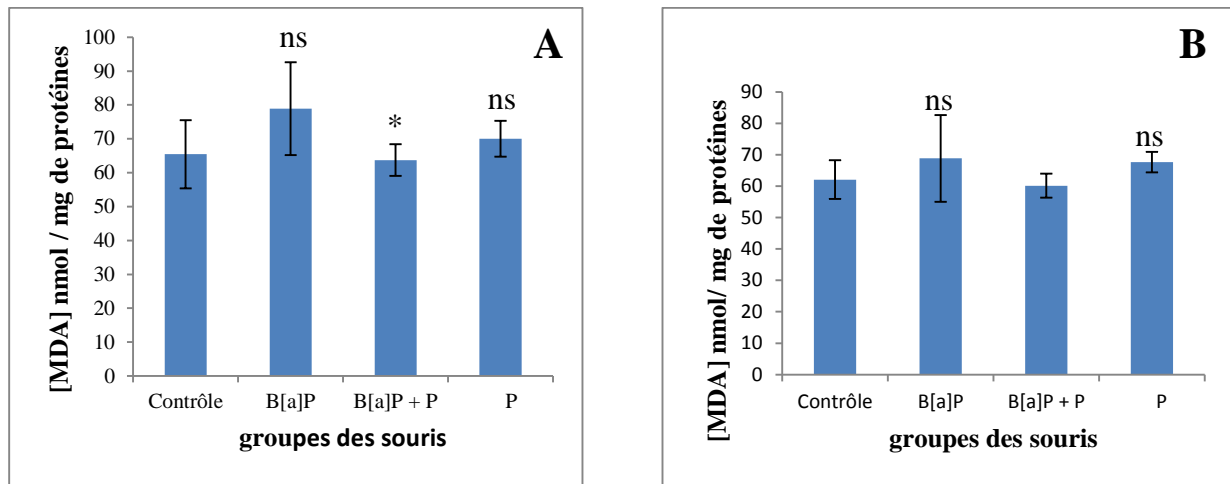


Figure 9 : Variations du taux du MDA cytosolique cardiaque et pancréatique après traitement par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et /ou la propolis (25 mg / kg). (A) : MDA cytosolique cardiaque, (B) : MDA cytosolique pancréatique. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type ; test de student : ns (non significative) ($p > 0.05$), (**): $0.001 < p < 0.01$; (***) : $p < 0.001$; (*): $0.01 < p < 0.05$; le groupe du B[a]Pet le groupe (p) comparai par rapport au contrôle, le B[a]P + p : comparaison par rapport au B[a]P.

Nous constatons chez les souris traités par le B[a]P seul une augmentation non significative ($p > 0.05$) des taux du MDA par rapport aux contrôles. Cette concentration atteint 78.93 ± 13.69 nmole/mg de protéine contre 65.45 ± 10.04 nmole/ mg de protéine chez le contrôle). Le prétraitement par la propolis diminue les taux du MDA de façon significative ($p > 0.05$) (63.73 ± 4.65 nmole/mg de protéines contre 78.93 ± 13.69 nmole/mg de protéines chez le groupe B[a]P). Aussi par comparaison du groupe des souris ayant reçu la propolis à celui du contrôle, une diminution non significative ($p > 0.05$) de groupe qui reçoit seulement la propolis (70.06 ± 5.29 nmole/mg de protéines contre 65.45 ± 10.04 nmole/mg de protéines chez le contrôle) a été remarquée.

Nous constatons chez les souris traités par le B[a]P seul une diminution non significative ($p > 0.05$) des taux du MDA par rapport aux contrôles. Cette concentration atteint 68.82 ± 13.78 nmole/mg de protéine contre 62.08 ± 6.17 nmole/ mg de protéines chez le contrôle). Après traitement, par la propolis, les taux du MDA sont diminués de façon non significative ($p > 0.05$) atteindre 60.14 ± 3.84 nmole/mg de protéines contre 68.82 ± 13.78 nmole/mg de protéines chez le groupe B[a]P). Aussi par comparaison au contrôle une diminution non significative ($p > 0.05$) de groupe qui reçoit seulement la propolis (67.62 ± 3.25 nmole/mg de protéines contre 62.08 ± 6.17 nmole/mg de protéines chez le contrôle).

La peroxydation lipidique, induite par les radicaux libres produits lors du métabolisme qui participent à l'époxydation du B[a]P, provoque probablement l'excrétion accrue du MDA après l'injection du B[a]P.

Le taux du MDA obtenu chez le groupe des animaux traité uniquement par la dose de 100mg/kg de B[a]P a été élevé par rapport à celui obtenu chez les animaux témoins et les animaux prétraités par la propolis. Cette augmentation peut être due à la surproduction des ROS tel que le radical hydroxyl (OH°) accompagnée par un déficit dans le système antioxydant (**Shen et al., 1994 ; Rastogi et al., 2001a**). Le taux élevé du MDA montre que la dose administrée de B[a]P a clairement provoqué une peroxydation lipidique des membranes cellulaires cardiaques indiquant l'effet cardiotoxique de ce produit.

L'évaluation de l'effet du B[a]P sur la peroxydation lipidique au niveau du pancréas montre une augmentation du taux du MDA cytosolique témoignent une production élevée des ROS qui attaque les acides gras polyinsaturés ainsi qu'une altération du système antioxydant. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Kamath et Rajini (2007) qui ont constaté que l'administration du DM pendant 30 jours semble augmenter la peroxydation lipidique au niveau de cellule pancréatiques.

Le groupe d'animaux prétraité par la propolis a marqué un taux du MDA inférieur à celui mesuré chez les animaux traités uniquement par le B[a]P et proche à celui mesuré chez les animaux témoins.

Le prétraitement par la propolis a réduit la formation de MDA dans le tissu cardiaque et pancréatique. Cela peut être expliqué par la présence des flavonoïdes et surtout des polyphénols qui sont considérés comme des antioxydants puissants. L'effet protecteur des flavonoïdes peut être due à leur capacité à réagir avec les radicaux peroxy des acides gras polyinsaturés ; inhibant ainsi de ce fait la peroxydation lipidique (**Tag, 2015; Wang et al., 2016**).

L'étude de Moreno (2000) menée sur propolis Argentine a montré qu'il existe une corrélation entre l'activité anti-oxydante et de la teneur en flavonoïdes. Ils ont également signalé qu'il existe une relation positive entre le contenu flavonoïde et le pourcentage de malondialdéhyde inhibé (MDA) (**Isla et al., 2001**).

III.2.3. Variation de l'activité enzymatique de la SOD et CAT cardiaque et pancréatique

La figure 10 (A), 10 (B) et 10 (c) illustre la variation de l'activité enzymatique de la SOD et la CAT cytosolique cardiaque et pancréatique chez les souris traitées par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et /ou la propolis à 25 mg/kg.

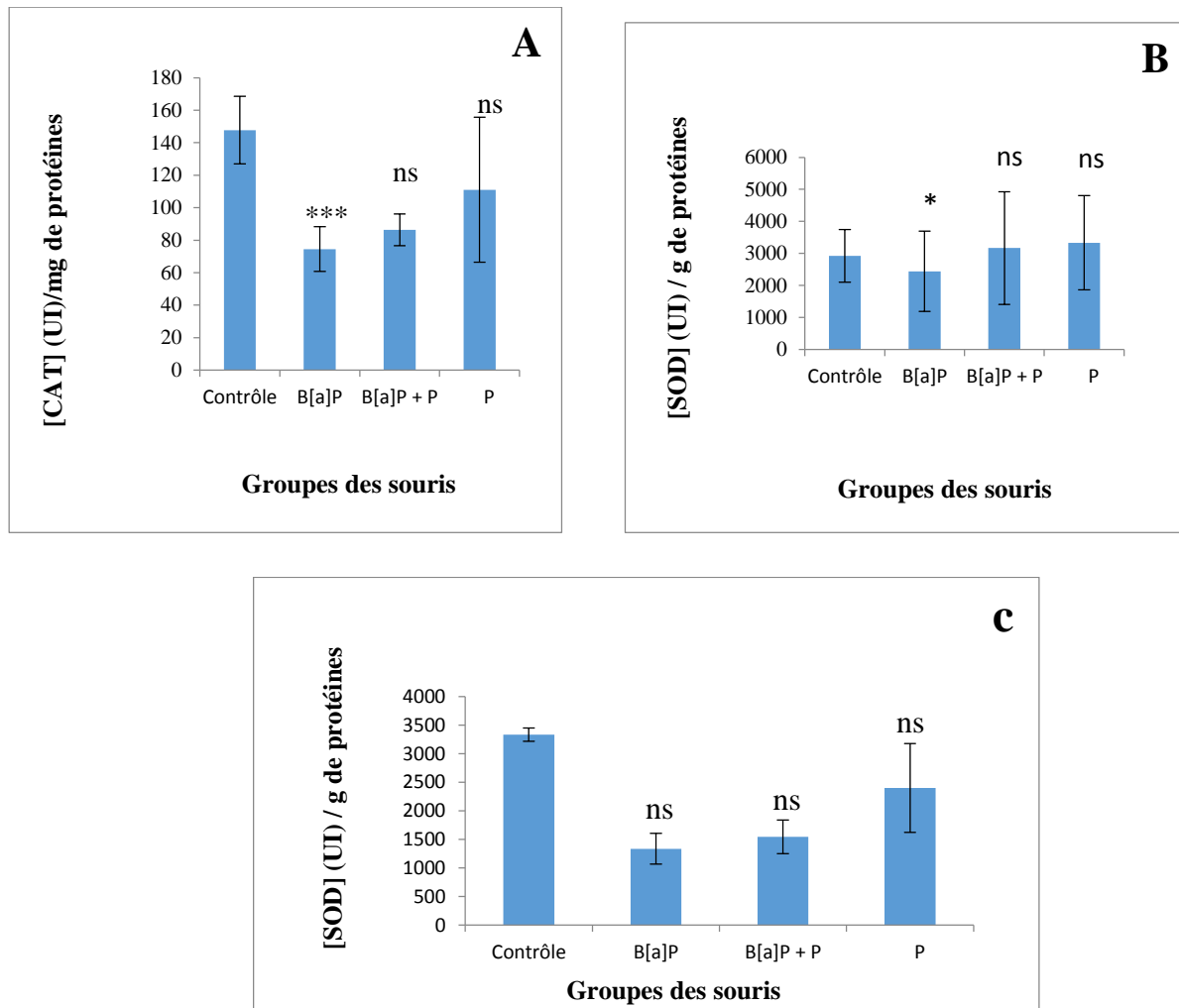


Figure 10 : Variations de l'activité enzymatique de la catalase et de superoxyde dismutase cytosolique dans le cœur et le pancréas des souris après traitement par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et /ou la propolis. (A) : variation du taux du CAT cardiaque, (B) variation du taux du SOD cardiaque, (C) : variation du taux de la SOD pancréatique. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type ; test de student : ns (non significative) ($p > 0.05$), (**): $0.001 < p < 0.01$; (***) : $p < 0.001$; (*) : $0.01 < p < 0.05$; le groupe du B[a]P et le groupe (p) comparai par rapport au contrôle, le B[a]P + p : comparaison par rapport au B[a]P.

L'activité enzymatique de la catalase dans le cœur est largement diminuée de façon très hautement significative ($p < 0.001$) (74.52 ± 13.80 UI /mg de protéines) chez le groupe traité par le B [a]P par rapport au contrôle (147.76 ± 20.81 UI /mg de protéines). On note aussi une augmentation non

significative ($p > 0.05$) chez le groupe traité par le B [a]P + propolis) atteint (86.35 ± 9.75 UI /mg de protéine) par rapport au groupe traité par le B [a]P seul (74.52 ± 13.80 UI /mg de protéines). Une diminution non significative ($p > 0.05$) aussi chez le groupe qui reçoit seulement la propolis (11.01 ± 44.62 UI /mg de protéines) par rapport au contrôle.

En comparaison avec le groupe d'animaux témoins, l'activité de la SOD dans le cœur est diminué de façon significative ($0.01 < p < 0.05$), la concentration atteint ($2438,5 \pm 1254.2$ UI /mg de protéines) après traitement des animaux par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et une augmentation non significative ($p > 0.05$) chez le groupe traité par le B[a]P+ propolis (3165.08 ± 1758.5 UI /mg de protéines) par rapport au groupe traité par le B[a]P seul. Nous avons remarqué aussi une augmentation non significative ($p < 0.001$) du taux de la SOD cytosolique chez le groupe traité par la propolis seul (3332.1 ± 1472.9 UI /mg de protéines).

L'activité de la SOD dans le pancréas est diminué de façon significative ($0.01 < p < 0.05$), la concentration atteint (1336.2 ± 267.9 UI /mg de protéines) après traitement des animaux par le B[a]P à 100 mg/kg/IP pendant 48 h et une augmentation non significative ($p > 0.05$) chez le groupe traité par le B[a]P+ propolis (1544.4 ± 273.9 UI /mg de protéines) par rapport au groupe traité par le B[a]P seul. Nous avons remarqué aussi une augmentation non significative ($p < 0.001$) du taux de la SOD cytosolique chez le groupe traité par la propolis seul (2402 ± 777.55 UI /mg de protéines) par rapport aux témoins (3334.4 ± 115.3 UI /mg de protéines).

Dans notre étude, l'administration unique du B [a]P montre une baisse très hautement significative de l'activité enzymatique de la CAT et significative de l'activité de la SOD cardiaque chez les groupes traité par une dose de 100 mg / kg du B [a]P par rapport au groupe témoin.

La SOD, qui convertit les radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène, est largement distribué dans les cellules ayant un métabolisme oxydatif et qui protège ces cellules contre les effets toxiques de l'anion superoxyde (**Shimeda *et al.*, 2005**).

La diminution de l'activité de la SOD chez les groupes traités peut être attribuée à la consommation de cette enzyme dans la conversion de l'anion superoxyde ($O_2^{\circ-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) étant donné que la SOD peut être inactivée par les produits de sa propre réaction (**Emre *et al.*, 2014**). De plus, cette diminution peut être une conséquence de la diminution de la synthèse protéique de la SOD grâce aux effets exercés par le B[a]P ou son métabolite BPDE sur le gène codant pour cet enzyme sachant que le B [a]P est un composé cancérigène pouvant induire des adduits au niveau de l'ADN (**Emre *et al.*, 2014**).

Dans notre étude, la diminution de la concentration de la SOD a été observée après traitement par le B[a]P à 100 mg/kg/IP, cette diminution peut donner comme conséquence une réduction de l'élimination de l'O₂[°] avec une accumulation accrue d'H₂O₂. Cette diminution de la SOD peut être expliquée que le B[a]P agit, par son effet cytotoxique, sur les gènes qui codent pour la SOD en diminuant l'expression de l'enzyme dans les cellules pancréatique. Mn/SOD a été proposée comme un gène suppresseur de tumeur (**Bravard et al., 1998**). Une étude permet l'identification des éléments d'activation de promoteurs, le rôle des régulateurs de transcription et les mécanismes par lesquels ces régulateurs de transcription coopèrent pour induire l'expression synergétique du gène Mn/SOD (**Mates, 2000**).

Au niveau du pancréas, nous avons signalé une réduction considérable de l'activité enzymatique de la SOD après l'exposition aiguë à la dose 100 mg/kg du B [a]P. Cette réduction est en relation avec la régulation négative des gènes qui codent pour ces enzymes par les radicaux libres ainsi que par certains facteurs humoraux (**Slaga, 1995**) qui s'explique par l'élimination inefficace de l'O₂[°] et d'H₂O₂ produit au cours du métabolisme de B[a]P (**Kiruthiga et al., 2010**).

Par ailleurs, la diminution de l'activité enzymatique de la CAT peut être due à l'excès de l'anion superoxyde suite à la réduction de l'activité de la SOD (**Hassan et al., 2012 ; Mishra et al., 2013**).

Nous avons observé que le traitement par la propolis inversée de manière non significative tous les changements induits par B[a]P en augmentant SOD et CAT. L'activité antioxydant de propolis est liée en partie à ses propriétés de piégeage de radicaux et à forte teneur en polyphénols et flavonoïdes. L'activité enzymatique antioxydante tel que SOD et CAT peuvent être parfois diminuer sous stimulation de la peroxydation des lipides (**Wohaieb et al., 1987**) où être augmenter (**Aliciguzel Y et al., 2003**). Il a été démontré que la propolis et ses composés polyphénoliques augmentent l'activité de la SOD et la CAT.

III.3. Etude histologique microscopique cardiaques et pancréatiques induites par le benzo[a]pyrène et effet protecteur de la propolis

Des coupes histologiques au niveau des cœurs et des pancréas des souris, traités par le B[a]P, ou prétraité par la propolis ont été réalisés afin de permettre la visualisation des changements tissulaire qui peuvent être s'installer suite à l'administration de B[a]P.

L'observation microscopique est représentée dans les figures 11 et 12 ci-dessous.

Les coupes histologiques des cœurs de chaque lot du test sont présentées dans la figure 12.

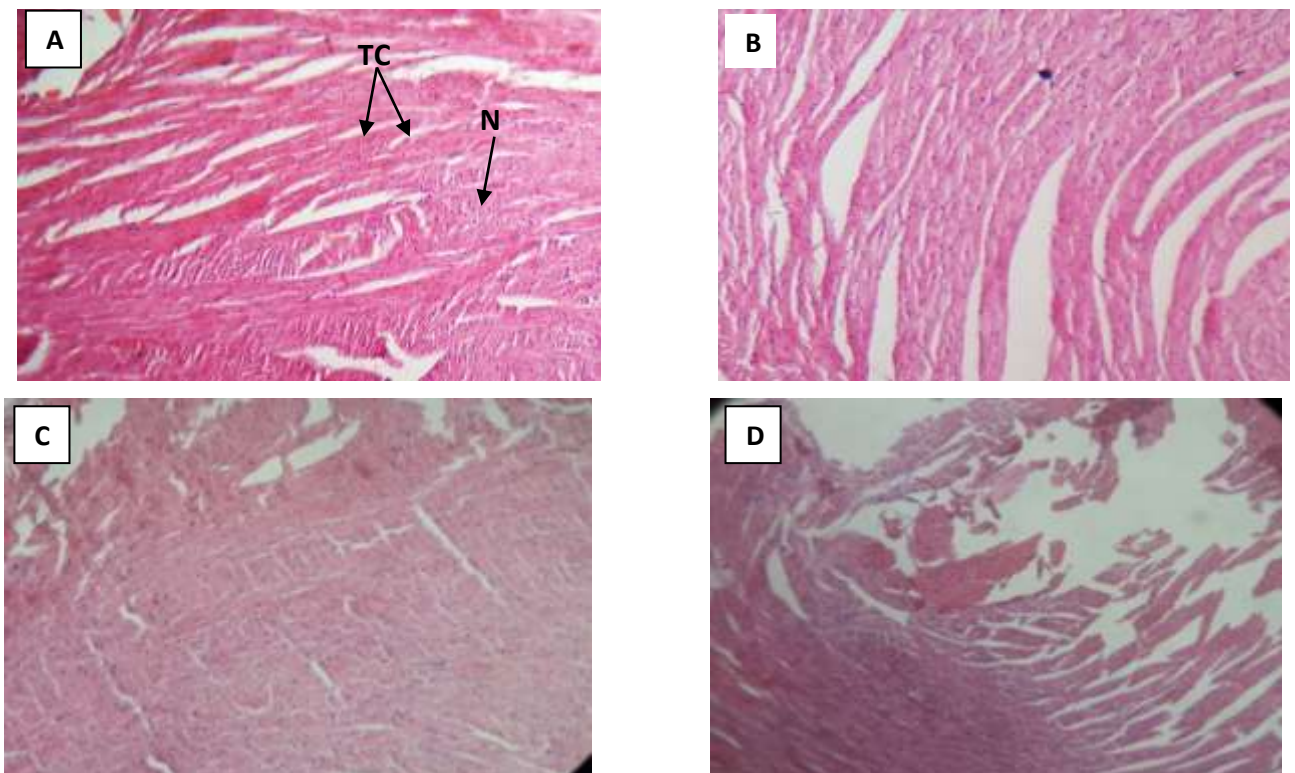


Figure 11 : Examen des coupes histologiques cardiaques des différents lots observées au microscope optique $\times 100$. (Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine [H & E]). *A: coupes réalisée sur le cœur de souris du groupe témoin, B: coupes réalisée sur le cœur de souris du groupe traité par le B[a]P, C: coupes réalisée sur le cœur de souris du groupe traité par le B[a]P + propolis, D: coupes réalisée sur le cœur de souris du groupe traité par la propolis seule.*

N : noyau, TC : tissu conjonctif

L'étude microscopique de cœurs des souris du groupe témoin a montré une structure histologique normale du tissu myocardique (**figure 11.A**). Aussi, Les coupes histologiques des cœurs des souris du groupe traité par le B[a]P et du groupe prétraité par le B[a]P + propolis ne montre aucun effet sur

l'aspect myocardique (**figure 11.B.C**). Aussi au niveau des cœurs des souris du groupe prétraité par la propolis il n'y a pas d'une modification tissulaire.

Ces résultats indiquent que le B[a]P n'arrive pas à induire une toxicité cardiaque, ceci peut être expliqué par la courte durée de traitement (toxicité aigüe).

Les coupes histologiques des pancréas de chaque lot sont présentées dans la figure 12.

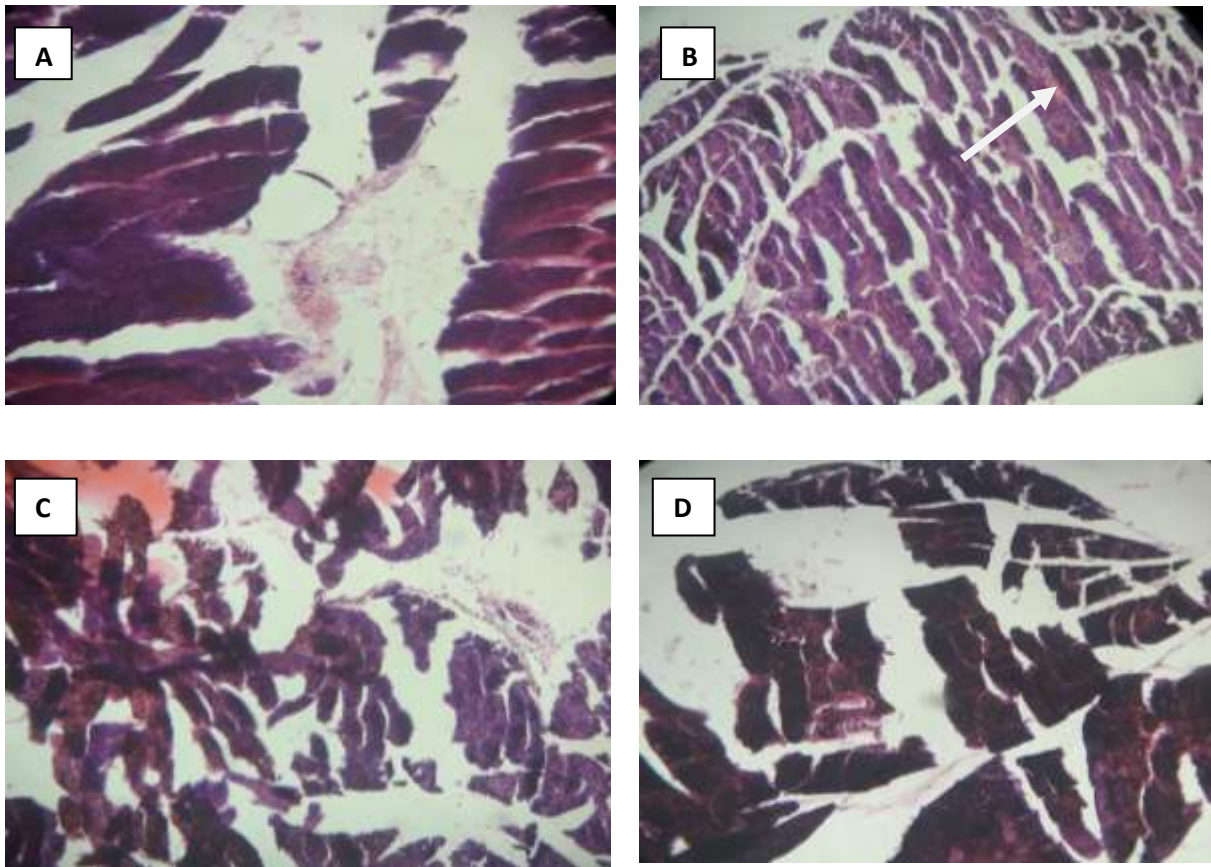


Figure 12 : Examen des coupes histologiques pancréatique des différents lots observées au microscope optique **G** x100. (Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine [H & E]). **A:** coupes réalisée sur le pancréas de souris du groupe témoin, **B:** coupes réalisée sur le pancréas de souris du groupe traité par le B[a]P, **C:** coupes réalisée sur le pancréas de souris du groupe traité par le B[a]P + propolis, **D:** coupes réalisée sur le pancréas de souris du groupe traité par la propolis seule.

L'examen microscopique des coupes histologiques des pancréas des souris témoins montrent un tissu pancréatique d'architecture normale sans anomalies histologiques (**figure 12.A**). Tandis que chez les souris traitée par le B[a]P, on a constaté une présence d'inflammation importante indiqué par la flèche (**figure 12.B**). On observe aussi la présence d'une légère inflammation pancréatique

chez les souris traité par le B[a]P + propolis (**figure 12.C**). Les souris prétraité par la propolis empêché toute altération du pancréas, présentent la perte de l'infiltration inflammatoire lymphoplasmocytaire, on observe une architecture similaire à celle observé chez les animaux du groupe témoin (**figure 12.D**). Ce résultat est clairement indicatif de l'effet non-toxique à l'échelle histologique de cet extrait éthanolique de la propolis.

Divers xénobiotiques tel que le B[a]P sont responsables de générer le stress oxydant et les radicaux libres (ERO). Au contraire la propolis (une substance riche en flavonoïdes et polyphénols) possède des activités anti oxydantes importantes. Notre étude avait ainsi comme objectif l'évaluation *in vivo* de l'effet toxique du B[a]P sur le cœur et le pancréas et le rôle protecteur de la propolis.

A l'issue de ce travail, nous pouvons conclure que l'exposition aiguë à une dose déterminée (100 mg/kg) du B[a]P a un effet toxique sur les deux organes (cœur et pancréas).

Après 48 h de traitement des souris Swiss par une dose de 100mg/ kg de B[a]P, nous avons constaté une perturbation des paramètres du stress oxydant. Cette perturbation se traduit par une diminution de l'activité du superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA) dans les deux organes, ainsi marqué qu'il y a une augmentation du glutathion (GSH) dans le pancréas et une diminution dans le cœur.

D'une autre part on a constaté que la propolis 25 mg /kg/j pendant 5 jour joue un rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydatif induit lors de l'administration de B[a]P chez les souris. Par leur pouvoir scavenger contre les espèces réactives de l'oxygène, elle possède une activité antioxydante.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de notre présente étude, nous ont permis de vérifier l'intérêt de la propolis et ce à travers la réduction des effets toxiques du B[a]P sur le tissu cardiaque et pancréatique. Cependant, cette étude de toxicité aiguë a été réalisée sur des souris et dans ce cas les résultats ne pourront être exploitables en clinique que si on vérifie que la propolis conserve toute son efficacité antioxydante et anticancéreuse sur un modèle de tumeur expérimentale tout en réduisant les effets secondaires du B[a]P. Ce qui constitue alors l'une de nos perspectives en plus de :

- L'évaluation du stress oxydatif que peut provoquer le B[a]P sur les différentes fonctions mitochondriales cardiaques et pancréatique,
- Elargir l'étude en évaluant, sur un modèle cancéreux, les différents paramètres de l'apoptose et la nécrose cellulaire dans le tissu cardiaque et pancréatique (caspases, Bcl-xL, l'expression de p53, l'expression du Ki-67,... etc.) au cours du traitement par la propolis.

Aboutabl, M.E., Zordoky, B.N. et El-Kadi, A.O., (2009). 3-Methylcholanthrene and benzo[a]pyrene modulate cardiac cytochrome P450 gene expression and arachidonic acid metabolism in male Sprague Dawley rats. *Br. J. Pharmacol.*, 158(7): 1808–1819.

Aboutabl, M.E., Zordoky, B.N., Hammock, B.D. et El-Kadi, A.O., (2011). Inhibition of soluble epoxide hydrolase confers cardioprotection and prevents cardiac cytochrome P450 induction by benzo[a]pyrene. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 57(3) : 273–281.

Agbato I. (2006). *Établissement de la cinétique d'excrétion urinaire du 3-hydroxybenzo(a)pyrène suite à l'injection de faibles doses de benzo(a)pyrène chez le rat Sprague-Dawley mâle.*

Aliciguzel Y., Ozen I., Aslan M., Karayalcin U., (2003). Activités de xanthine oxydoréductase et enzymes antioxydantes dans différents tissus de rats diabétiques. *Journal de laboratoire et de la médecine clinique*, 142 (3), 172-177.

Alyane, M., Kebsa, L.B., Boussenane, H.N., et al., (2008). Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci*, 21: 201–9.

Amadou A., (2006). Etude d'une recette traditionnelle, des écorces de tronc de *Sclerocarya birrea* HOSCH ET *D'Uapaca togoensis* Pax utilisées dans le traitement du diabète. Thèse de doctorat. Université de bomako.p107.

Arlt V.M, Stiborova M, Henderson C.J, Thiemann M, Frei E, Aimova D, Singh R, Gamboada Costa G, Schmitz O.J, Farmer P.B, Wolf C.R, and Philips D.H., (2008). Metabolic activation of benzo(a)pyrene in vitro by hepatic cytochrom p450 contrasts with detoxification in vivo: experiments with hepatic cytochrom p450 reductase null mice. *Carcinogenesis*, 29 : 656-665.

Auberval N. (2010). Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par les antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat en science. Université de strasbourg. 257p.

Bankova, V., Castro, S. L., Marcucci, M. C., (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* / (31) :3-15.

Bansal S, Lu A, Gonzalez F.J, Guengerich F.p, Chowdhury A.R, (2014). Anandathheerthavarada H.K and Avadhani N.G. Mitochondrial Targeting of Cytochrome P450 (CYP) 1B1 and its Role in polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Mitochondrial Dysfunction. *JBC papers in press*. 39 : 1-37.

Benkovic, V., Knezevic, A.H., Dikic, D., et al. (2009). Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gammairradiated mice. *Arh Hig Rada Toksikol* /60: 129–38.

Bereket C, ozan F., Sener I., M. Tek, Altunkaynak BZ, Semirgin SU, Özdemir, M. (2014). Propolis accélère la phase de consolidation dans la distraction ostéogénèse. *Journal de chirurgie craniofaciale*, 25 (5), 1912-1916.

- Bhadoria, M., Nirala, S.K., Shukla, S. (2008).** Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food Chem, Toxicol.*46: 2703–12.
- Bisson M, Diderich R, Dujardin R, Hulot C, Lacroix G Lamy M. H, Lefevre J.P, Leveque S, Magaud H, Tissot S., (2006).** Benzo[a]pyrène. 2 : 1-44.
- Bonard M., brondeau M.T., Clavel T., Falcy M., et al. (2007).** Benzo[a]pyrène. INRS fiche toxicologique FT : 144.
- Bouayed J and bohn T., (2010).** Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state. *Lands bioscience*, 3(4): 228-237.
- Bouchard M and Viau C., (1997).** Urinary excretion of benzo[a]pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo[a]pyrene administration. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 185-192.
- Boufadi, Y. M., Soubhy, J., Riazi, A., Vanhaeverbeek, M., Néve, J., Boudjeltia, K. Z. et Antwerpen, P., (2014).** Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis.
- Bradford M.M., (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem.*, 72 :248-252.
- Bravard, A., Cherbonnel-Lasserre, C., Reillaudou, M., Beaumatin, J., Dutrillaux, B. et Luccioni, C., (1998).** Modifications of the antioxidant enzymes in relation to chromosome imbalances in human melanoma cell lines. *Melanoma research*, 8, 329-335.
- Brinkmann J, Stolpmann K, Trappe S, et al., (2013).** Metabolically Competent Human Skin Models: Activation and Genotoxicity of Benzo[a]pyrene. *Toxicological Sciences* 131: 351-359.
- Burczynski, M.E. and Penning, T.M., (2000).** Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res* 60, 908-915.
- Canada, S., (1994).** Hydrocarbures aromatique polycycliques (Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation). Loi canadienne sur la protection de l'environnement National printers (Ottawa) INC., Ottawa.
- Cao D, Yoon CH, Shin BS, et al., (2005).** Effects of aloe, aloesin, or propolis on the pharmacokinetics of benzo[a]pyrene and 3-OH-benzo[a]pyrene in rats. *Journal of toxicology and environmental health. Part A.* 68: 2227-2238.
- Chipman JK, Bhawe NA, Hirom PC, et al., (1982).** Metabolism and excretion of benzo[a]pyrene in the rabbit. *Xenobiotica ; the fate of foreign compounds in biological systems*, 12: 397-404.
- Devanesan, P.D., RamaKrishna, N.V., Todorovic, R., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L., Jeong, H., Jankowiak, R. and Small, G.J., (1992).** Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes in vitro. *Chemical research in toxicology*, 5, 302-309.

- Dewanto V., Wu X., Adomk K K et Liu R.H., (2002).** Thermal processing enhances the Nutritional valu of tomatoes by increasing total antioxidant ativity. *Journal of agriultural and food Chemistry*, 50: 3010-3014.
- Di Carlo G., N. Mascolo, Izzo AA, Capasso, F., (1999).** Flavonoides anciens et nouveaux aspects d'une classe de médicaments thérapeutiques naturels. *Sciences de la vie*, 65 (4), 337-353.
- Ellman, G. L., (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 82 : 70-77.
- El-Sayed, et S.M., Abo-Salem, O.M., Aly, H.A., et al., (2009).** Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pak J Pharm Sci* 22: 168–74.
- Emre M. H., Aktay G., Polat A., Ozturk F., (2014).** Effects of benzo(a)pyrene and Ethanol on Morphology and Antioxydant Status and Transaminase in Rat Liver. *Medicine Science*. 3(1): 1054-106.
- EPA., (1990).** *Toxicological profile for benzo a pyrene*, Atlanta, Georgia : U.S. Department of Health & Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Foth H, Kahl R and Kahl GF., (1988).** Pharmacokinetics of Low-Doses of Benzo[a]Pyrene in the Rat. *Food and Chemical Toxicology* 26: 45-51.
- Ghiszalberty, E., (1979).** Propolis a review. *Bee World* 60 (2): 59-84. Gonzalez, R.R., Rodriguez, D., Gonzalez. S., et al. (1994). Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. *Phytother Res*, 8: 229–32.
- Gul M., Kutay FZ, Temocin S., Hanninen O., (2000).** Implications cliniques et cellulaires de glutathion.
- Harrigan JA, McGarrigle BP, Sutter TR, et al., (2006).** Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicology in Vitro* 20: 426-438.
- Hassan A.M, Alam S.S, Abdl-Aziem S.H and Ahmed K.A., (2011).** benzo-a-pyrene induced genotoxicity and cytotoxicity in germ cells of mice : Intervention of radish and cress. *Genet Eng Biotechn.* 9: 65-72.
- Hassan Z. K., Elobeid M.A., Virk P., Sawsan A., et al., (2012).** Bisphenol A Induces Hepatototoxicity throuth Oxidative Stress in Rat Model. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p : 6.
- Herrmann,R., (2007).** transpor of polycyclic aromatic hydrocarbons through a parthy urbanized river basin. *Water Air Soil Poll.*, 20 :1797-1810.

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.

IARC., (2010). Monographs on the Évaluation of Carcinogénic Risk of Chemicals to Man : Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Lyon.

Isla MI, Moreno MN, Sampietro AR, Vattuone, MA, (2001). Activité anti-oxydante de l'Argentine Propolis extraits. *Journal d'Ethnopharmacologie*, 76 (2), 165-170.

Ivanov, T., (1980). Composition and physico-chemical properties of propolis. *Zhivotnovudni* 17 (8), 96-103.

J. Braz., (2008). Chem. Soc. vol.19 no.6 São Paulo.

Jacques C, Perdu E, Duplan H, et al., (2010). Disposition and biotransformation of C-14-Benzo(a)pyrene in a 8, 365-374.

Jiang H., Gelhaus S.L., Mangal D., Harvey R.G., et al., (2007). Metabolism of Benzo[a]pyrène in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in toxicology*, 20(9) :1331-41.

Jiang, H., Shen, Y.M., Quinn, A.M. and Penning, T.M., (2005). Competing roles of cytochrome P450 1A1/1B1 and aldo-keto reductase 1A1 in the metabolic activation of (+/-)-7,8-dihydroxy-7,8-dihydro-benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar cell extracts. *Chemical research in toxicology*.

Joseph, P. and Jaiswal, A.K. (1994). NAD(P) H: quinone oxidoreductase1 (DT diaphorase) specifically prevents the formation of benzo[a]pyrene quinone-DNA adducts generated by cytochrome P4501A1 and P450 reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8413-8417.

Jules, G.E., Pratap, S., Ramesh, A. et Hood, D.B., (2012). In utero exposure to benzo[a]pyrene predisposes offspring to cardiovascular dysfunction in later-life. *Toxicology*, 295(1-3) : 56-67.

Kamath V., Rajini P.S., (2007). Altered glucose homeostasis and oxydative impairment in pancreas of rats subjected to dimethoate intoxication. *Toxicology*, 231 : 137-146.

Kao J, Patterson FK and Hall J., (1985). Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicol Appl Pharmacol* 81: 502-516.

Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Sriram, C. S. & Gogoi, R., (2015). Benzo pyrene induced lung cancer : role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports*, 67, 996-1009.

Kawamura Y, Kamata E, Ogawa Y, et al., (1988). The Effect of Various Foods on the Intestinal-Absorption of Benzo(a)Pyrene in Rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 29: 21-25.

Khalil, M.L., (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 22–31.

Khansari N., Shakiba Y., M. Mahmoudi, (2009). L'inflammation chronique et le stress oxydatif comme une cause majeure de maladies liées à l'âge et le cancer. Des brevets récents sur l'inflammation et l'allergie découverte de médicaments, 3 (1), 73-80.

Kim, K.B. and Lee, B.M., (1997). Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene. *Cancer letters* 113, 205-212.

Kiruthiga, P., Pandian, S. K. et Devi, K. P., (2010). Silymarin protects PBMC against B(a)P induced toxicity by replenishing redox status and modulating glutathione metabolizing enzymes-an in vitro study. *Toxicology and applied pharmacology*, 247, 116-128.

Klein et fanny, (2009). Relation entre le diabète sucré de type 2 et l'amyloïdose chez le chat. Mémoire de magister. Université paul-sabatier de Toulouse. 87p.

Knaapen, A.M., Curfs, D.M., Pachen, D.M., Gottschalk, R.W., de Winther, M.P., Daemen, M.J. et Van Schooten, F.J., (2007). The environmental carcinogen benzo[a]pyrene induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in vascular tissue: a possible role in atherogenesis. *Mutat. Res.*, 621(1–2) : 31–41.

Knuckles, M.E., Inyang, F. et Ramesh, A., (2001). Acute and subchronic oral toxicities of benzo[a]pyrene in F-344 rats. *Toxicol. Sci.*, 61(2): 382–388.

Laurent C, Feidt C, Lichtfouse E, et al., (2001). Milk-blood transfer of C-14-Tagged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2493-2496.

Lee W, Shin HS, Hong JE, et al., (2003). Studies on the analysis of benzo(a)pyrene and its metabolites in biological samples by using high performance liquid chromatography/fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society* 24: 559-565.

Lee, M.L., Novotny, M. and Bartle, K.D., (1976). Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates. *Analytical Chemistry* 48, 1566-1572.

Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F. et Jiang Y., (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Fd. Chem.*, 102 : 771-776.

Likhachev AJ, Beniashvili D, Bykov VJ, et al., (1992). Biomarkers for individual susceptibility to carcinogenic agents : excretion and carcinogenic risk of benzo[a]pyrene metabolites. *Environ Health Perspect* 98 : 211-214.

- Lotfy, M., (2006).** Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 22–31.
- Lu D, Harvey R.G, Blair I.A, and penning T.M, (2011).** Quantitation of Benzo(a)pyrene Metabolic profiles in Human Bronchoalveolar H358 cells by Stable Isotop Dilution Liquid Chromatography- Atmospheric Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 24(11) : 1905-1914.
- Madhavan ND and Naidu KA., (2000).** Purification and partial characterization of peroxidase from human term placenta of non-smokers : Metabolism of benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol. *Placenta* 21: 501-509.
- Marcucci, M. C., (1995).** Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* (26) : 83-99.
- Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, et al., (2010).** A toxicokinetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats. *Journal of applied toxicology : JAT* 30: 402-410.
- Marie. C., (2007).** Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. Thèse. Université Joseph-Fourier-Grenoble I.
- Marieb E. N., (2008).** Biologie humaine : principes d'anatomie et de physiologie. Pearson Education France.
- Marnett L.J and Gregory A., (1979).** Reed peroxidatic oxidation of benzo(a)pyrene and prostaglandin biosynthesis. *Biochemistry.*18(14) : 2924-2929.
- Mates J., (2000).** Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153, 83-104.
- Melloul D., MarshakS et Cerasi E., (2002).** Regulation of insulin gene transcription. *Diabétologia*, 45: 309-26.
- Milaire J., Beauthier, J.-P. et Dhem, A., (2001).** *Anatomie médicale : aspects fondamentaux et applications cliniques.* DE BOECK.
- Mishra S K., Singh P., Rath S. K., (2013).** Protective Effect of Quercetin on Chloroquine- induced Oxidative Stress and Hepatotoxicity in Mice. *Malaria Research and Treatment* : 10 (7) : 117-121.
- Moir D, Viau A, Chu I, et al., (1998).** Pharmacokinetics of benzo[a]pyrene in the rat. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 53: 507-530.
- Montoro A., Barquinero, J.F., Almonacid, M., et al., (2011).** Concentration-dependent protection by ethanol extract of propolis against gamma-ray-induced chromosome damage in human blood lymphocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* 174853.

- Moody RP, Joncas J, Richardson M, et al., (2007).** Contaminated soils (I) : In vitro dermal absorption of benzo[a] pyrene in human skin. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 70: 1858-1865.
- Moore K.L., et Dalley A.F., (2001).** Anatomie Medicale. Ed. de Boeck Université.
- Moreno M. I. N., Isla M. I., Sampietro A. R., Vattuone, M. A., (2000).** Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1), 109-114.
- Negri G., Marcucci, M. C., Salatino, A. M., Salatino, L. F., (2000).** Comb and propolis waxes from Brazil (states of Sao Paulo and Panama). *J Braz* 1, 5453-457.
- Nelson D.L., Cox M., 2004.** Lehninger Principles of Biochemistry. Ed. W H Freeman and Co. Ltd, 4 th edition, Newyork.p. 881-901.
- Neubert D and Tapken S., (1988).** Transfer of Benzo(a)Pyrene into Mouse Embryos and Fetuses. *Archives of Toxicology* 62: 236-239.
- Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, et al., (1992).** Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di (2-ethylhexyl) phtalate : comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 115: 216-223.
- Nikolaou K, M.P., Mouvier G., (1984).** Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere_a critical review. *Science of the total environment* 32, 103-132.
- Okhawa, H., Ohishi, N. et Yagi, K., (1979).** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95, 351-358.
- Pastorelli, R., Guanci, M., Cerri, A., Negri, E., La Vecchia, C., Fumagalli, F., Mezzetti, M., Cappelli, R., Panigalli, T. et Fanelli, R., (1998).** Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA, and blood protein adducts of benzo (a) pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 7, 703-709.
- Popova, M., Bonkova, V., Chimov, A., Sileva, M., (2002).** A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from Myroxylan balsamum trees. *Apidologie* (33) : 87-88.
- Rahman I. & Macnee, W., (1999).** Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 277, L1067-L1088.
- Rastogi R.K.S., Dogra S.K., Khanna M., (2006).** Das Skin tumorigenic potencial of Aflatoxin B1 in mice Food Chen. *Toxicol*; 44:670-677.
- Rees ED, Mandelstam P, Lowry JQ, et al., (1971).** A study of the mechanism of intestinal absorption of benzo(a)pyrene. *Biochim Biophys Acta* 225: 96-107.

Rigdon R.H. and Neal J., (1966). Gastric carcinomas and pulmonary adenomas in mice fed benzo[a]pyrene. *Tex Rep Biol Med*, **24**, 2, 195-207.

Sanders CL, Skinner C and Gelman RA., (1984). Percutaneous-Absorption of [Benzo[a]Pyrene-7,10-C-14 and [7,12-C-14]Dimethylbenz[a]Anthracene in Mice. *Environmental Research* 33: 353-360.

Savas M., (2012). Oxidative stress in benign prostate hyperplasia. In: Studies on Men's Health and Fertility. Agarwal A, Aitken RJ, Alvarez JG (eds). Humana Press, New York, pp 672.

Schlede E, Kuntzman R, Haber S, et al., (1970). Effect of enzyme induction on the metabolism and tissue distribution of benzo(alpha)pyrene. *Cancer Res* 30: 2893-2897.

Shen H.M., Shi C.Y., Lee H.P., Ong C.N., (1994). Aflatoxin B1- induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol. Appl. pharmacol*; 127:145-150.

Sheweita SA., (2000). Enzymes métabolisant les médicaments : mécanismes et fonctions. *Curr Drug Metab* 1 (2): 107 – 132.

Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H., (2005). Mechanisms of male.

Shimeda, Y., Hirotsani, Y., Akimoto, Y., Shindou, K., Ijiri, Y., Nishihori, T. et Tanaka, K., (2005). Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28, 1635-1638.

Shou, M., Harvey, R.G. and Penning, T.M., (1993). Reactivity of benzo[a]pyrene-7,8-dione with DNA. Evidence for the formation of deoxyguanosine adducts. *Carcinogenesis* 14, 475-482.

Slaga, T. J., (1995). Inhibition of the induction of cancer by antioxidants. *Nutrition and Biotechnology in Heart Disease and Cancer*. Springer.

Sobocanec, S., Sverko, V., Balog, T., et al., (2006). Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *J Agric Food Chem* 54: 8018–26.

Sparnins VL, Mott AW, Barany G, et al., (1986). Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S-transferase activity and BP-induced neoplasia in the mouse. *Nutr Cancer* 8: 211-215.

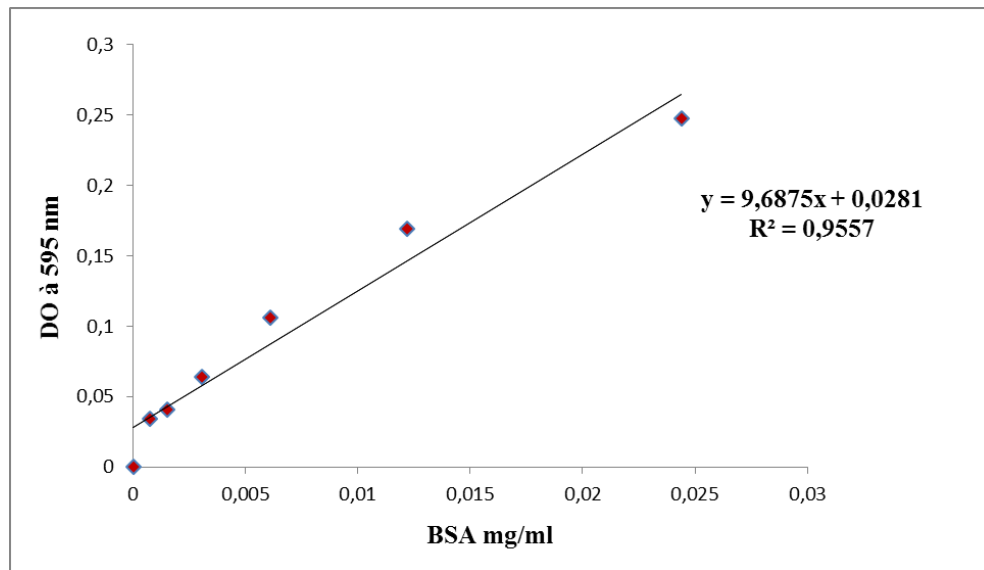
Srivastava, S. K., Hu, X., Xia, H., Awasthi, S., Amin, S. et Singh, S. V., (1999). Metabolic Fate of glutathione conjugate of benzo [a] pyrene-(7R, 8S)-diol (9S, 10R)-epoxide in human liver. *Archives of biochemistry and biophysics*, 371, 340-344.

Tag H M., (2015). Hepatoprotective effect of mulberry (*Morusnigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in albino rat. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15:252.

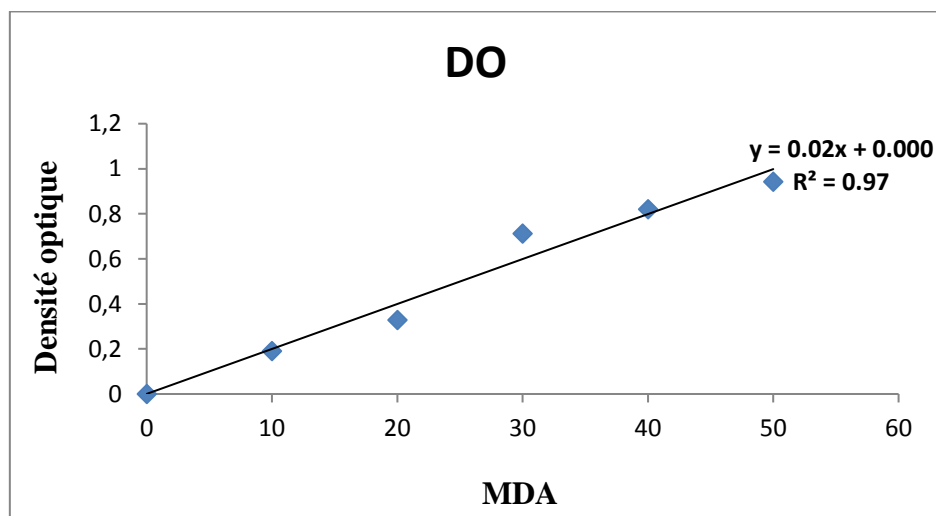
Tortora, G. J. et Grabowski, S. R., (2001). Principes d'anatomie et de physiologie. Édition du renouveau pédagogique inc. Saint-Laurent, Qc, Canada.

- Udensi U.K. and Tchounwou P.B., (2016).** Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *J Exp ClinCancer Res.* 35(1) : 139.
- Wang X, Meloche M, Verchere CB, Ou D, Mui A, Warnock GL, (2011).** Improving Islet Engraftment by Gene Therapy. *J Transplant.* 1-7.
- Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Woo S O, Kwon H W, perumalsamy H, Ahn Y J, (2016).** Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complementary and Alternative Medicine,* 16 :65.
- Wiersma DA and Roth RA., (1983).** Total-Body Clearance of Circulating Benzo(a)Pyrene in Conscious Rats - Effect of Pretreatment with 3-Methylcholanthrene and the Role of Liver and Lung. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 226: 661-667.
- Withey JR, Shedden J, Law FC, et al., (1993).** Distribution of benzo[a]pyrene in pregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained with pyrene. *Journal of applied toxicology : JAT* 13: 193-202.
- Wohaieb SA, DV Godin, (1987).** Des altérations dans les systèmes d'anti-oxydants de tissus dans le spontanément diabétique (BB) Wistar rat. *canadien journal de physiologie et pharmacologie,* 65 (11), 2191-2195.
- Xue, W. and Warshawsky, D., (2005).** Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicological Applied Pharmacology* 206, 73-93.
- Yang, H., Zhou, L., Wang, Z., Roberts, L.J., II, Lin, X., Zhao, Y. et Guo, Z., (2009).** Overexpression of antioxidant enzymes in ApoE-deficient mice suppresses benzo[a]pyrene-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis,* 207(1): 51–58.
- Yang, S.K., Roller, P.P. and Gelboin, H.V., (1977).** Enzymatic mechanism of benzo[a]pyrene conversion to phenols and diols and an improved high-pressure liquid chromatographic separation of benzo[a]pyrene derivatives. *Biochemistry.* 16, 3680-3687.
- Zhao B., Wang J., Geacintov N.E., Wang Z., (2006).** Poleta, polzeta and Rev 1 together are required for G to T transversion mutations induced by the (+) -and (-)-trans-anti-BPDEN2-dGDNA adducts in yeast cells. *Nucle Acide Research,* 34(2) :417-25.

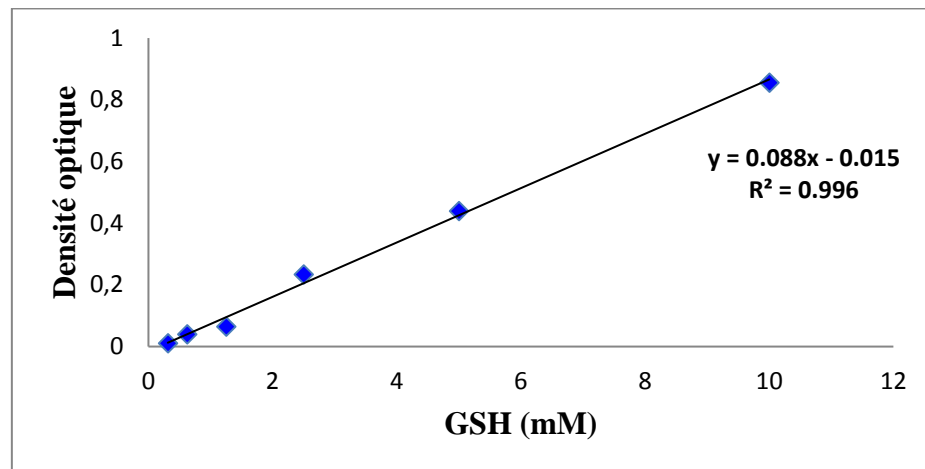
❖ Gamme étalon de protéines :



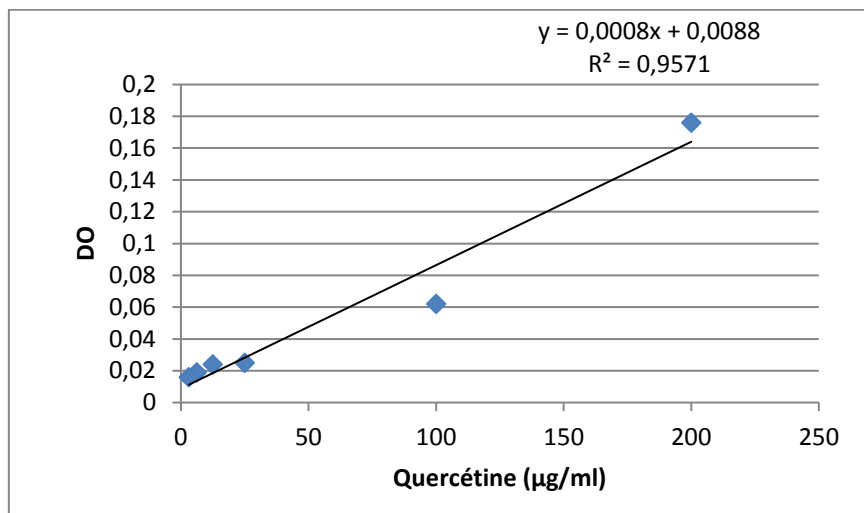
❖ Gamme étalon du MDA



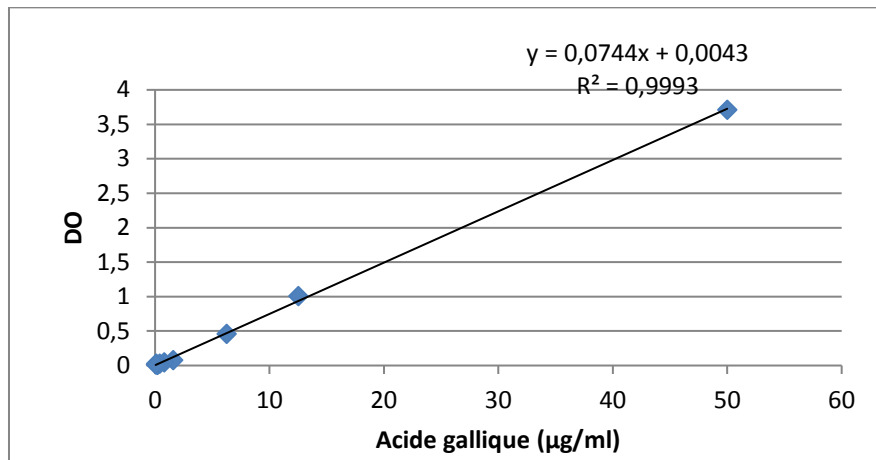
❖ Gamme étalon de glutathion



❖ Gamme étalon de flavonoïdes



❖ Gamme étalon de polyphénols



Présenté par : - Bouchoura Fatima Zohra -Boudjerda Yasmina	Encadré par : Dr. LARICHE NESRINE
Titre de mémoire : Evaluation de l'effet protecteur de la propolis de Jijel contre la toxicité aigüe cardiaque et pancréatique induit par le benzo[a]pyrène chez la souris	
Nature de diplôme : Master académique en biologie Option : Sciences pharmacologiques	
<p>Résumé</p> <p>Le benzo[a]pyrène (B[a]P) est un polluant toxique puissant ayant un potentiel cancérigène. Notre étude vise à divulguer l'effet antioxydant de la Propolis (Chekfa) et leur rôle protecteur contre la toxicité aigüe pancréatique et cardiaque induite par le B[a]P chez des souris Swiss. Les animaux sont répartis en quatre lots et soumis à différents traitements. Les paramètres du stress oxydatif (MDA, GSH, CAT, SOD) ont été évalués. Le B[a]P seul a la dose de 100 mg/kg/IP provoque une diminution de l'activités des enzymes (SOD, CAT) et une augmentation des taux du MDA cytosolique dans les deux organes (cœur et pancréas). La teneur en GSH diminue dans le cœur et augmente dans le pancréas. L'effet antioxydant de la propolis (25mg/kg par voie orale) et sa capacité à piéger les radicaux libres oxygénés a permis de réduire le taux du MDA, et d'augmenter le niveau de GSH. Aussi que la propolis et ses composés polyphénoliques augmentent l'activité enzymatique de la SOD et CAT. Ces résultats montrent clairement le rôle protecteur de la propolis contre la toxicité du B[a]P.</p>	
<p>Mots clé : benzo[a]pyrène, cœur, pancréas, propolis, toxicité aigüe.</p>	
<p>Abstract</p> <p>Benzo [a] pyrene (B [a] P) is a potent toxic pollutant with a carcinogenic potential. Our study aims to disclose the antioxidant effect of Propolis (Chekfa) and their protective role against B[a]P acute toxicity in Swiss mice. The animals divided into four groups are subjected to different treatments. Oxidative stress parameters (MDA, GSH, CAT, SOD) were evaluated. B [a] P alone at a dose of 100 mg / kg / IP causes a decrease in enzyme antioxidants (SOD, CAT) and an increase in cytosolic MDA in both organs (heart and pancreas). The GSH content decreases in the heart and increased in the pancreas. The antioxidant effect of propolis (25mg / kg orally) and it ability to trap oxygen free radicals has reduced the rate of MDA and increase the level of GSH. Propolis and its polyphenolic compounds increase SOD and CAT activities. These results clearly show the protective role of propolis against B [a] P toxicity.</p>	
<p>Key words: benzo [a] pyren, heart, pancreas, propolis, acute toxicity.</p>	
<p style="text-align: right;">ملخص</p> <p>البنزو [أ] بيرين هو ملوث سام قوي و له إمكانات مسببة للسرطان. تهدف دراستنا إلى الكشف عن التأثير المضاد للأوكسدة للدنج الشقيقة ودوره الوقائي ضد السمية الحادة للبنزوبيرين على مستوى القلب و البنكرياس عند الفئران السويسرية. الحيوانات المقسمة إلى أربع مجموعات تم تعريضها لمعاملات مختلفة و تم بعدها تقييم معالمات الإجهاد التأكسدي (MDA ،GSH ،CAT ،SOD). البنزو [أ] بيرين بجرعة 100 ملغ / كغ / IP أدى إلى انخفاض في النشاط الإنزيمي لإنزيمات (SOD ،CAT) وزيادة في معدلات ال MDA الخلوي في كل من القلب والبنكرياس. كما تم تسجيل انخفاض في معدلات ال GSH على مستوى القلب و زيادتها على مستوى البنكرياس. التأثير المضاد للأوكسدة للدنج بجرعة (25 mg / kg عن طريق الفم) وقدرته على فخ الجذور الحرة الأوكسجينية أدى إلى خفض معدلات ال MDA و زيادة معدلات ال GSH وكذا النشاط الإنزيمي لإنزيمات SOD و CAT. هذه النتائج تظهر بوضوح الدور الوقائي للدنج ضد سمية البنزو [أ] بيرين.</p>	
<p style="text-align: right;">الكلمات المفتاحية: البنزو [أ] بيرين،القلب، البنكرياس،الدنج،السمية الحادة.</p>	