الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Science de la Nature et de la Vie

Département: Biologie Moléculaire et Cellulaire

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم: البيولوجيا الجزئية والخلوية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Sciences pharmacologiques

Thème

Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de la propolis de Jijel contre la toxicité cérébrale aigue du benzo(a)pyrène chez la souris.

Membre de Jury

Présidente : Dr LAARICHE Nesrine

Examinateur : Pr LAHOUEL Mesbah

Encadreur : Dr BENGUEDOUAR Lamia

Présenté par :

BEDOUD Omayma

BOUDERGUI Fatima Zohra

Année universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque):

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

On présente nos premiers remerciements à notre encadreur Madame Benguedouar Lamia, maître de conférences à l'université de Jijel pour nous avoir permis de réaliser ce travail de recherche, pour tout le temps qu'il nous a consacré et pour avoir assuré avec intérêt la direction et le suivi de ce travail.

Nos remerciements les plus sincères sont également adressé aux membres de jury, Monsieur le professeur Lahouel Mesbah et Madame Laariche Nesrine qui nous ont honorés en acceptant d'examiner et d'évaluer ce modeste travail.

Nos plus vifs remerciements à tous les enseignants du département de Biologie Moléculaire et cellulaire et plus particulièrement aux enseignants de la filière des sciences pharmacologiques

Enfin, nous remercions toute personne ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents

Pour leur sacrifice et leurs encouragements, et qui grâce à eux j'ai pu continuer mes études.

A mes très chères sœurs :

Abir et Zineb

A ma jumelle Oumeyma

A mon frère et mon meilleur Abdaraouf

A L'ame sœur Halima

A ma tante Joumana

A tous mes amis

Fatima Zohra

Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents

Pour leur sacrifice et leurs encouragements, et qui grâce à eux j'ai pu continuer mes études.

A ma sœur: Asma

A mes frères : Ahmed, Daoud et Amine

A mes tantes, A mes oncles

A ma sœur jumelle Fatima Zohra

Souad, Hosna, Hidaya,

Khadidja, Halima

A toutes mes cousines,

Et à mon petit neveu Adimo

Et à tous ceux

qui m'ont connu.

Omayma

Tableau des figures..... i

Liste des tableaux iv

Liste des abréviations v

Introduction 2

PREMIERE PARTIE : Synthèse BIBLIOGRAHIQUE

Chapitre I : La neurotoxicité du benzo(a)pyrène .

I.1. Le cerveau 4

I.1.1.Anatomie fonctionnelle du cerveau 4

I.1.2.Pathologies du cerveau 6

I.2. Benzopyréne et le cerveau..... 6

I.2.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) 7

I.2.2.Benzo(a)pyrène [B(a)P] 8

I.2.3.Caractéristiques physico-chimiques..... 9

I.2.4.La toxicité du benzo(a)pyrène 10

I.2.5. La toxicocinétique du B(a)P..... 11

I.2.5.1. L'absorption..... 11

I.2.5.2.La distribution..... 11

I.2.5.3.Métabolisme..... 12

I.2.5.3.1.Voie du radical cation 13

I.2.5.3.2.Voie des diol-époxydes..... 13

I.2.5.3.3. Voie des quinones/espèces réactives de l'oxygène..... 14

I.2.5.4.Excrétion 15

Chapitre II : Le stress oxydatif

II.1. Stress oxydant **16**

II.2 . Nature de la réactivité des ROS/RNS **17**

II.3. Systèmes de défense antioxydants **18**

II.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques 19

II.3.1.1 La superoxyde dismutase (SOD) 19

II.3.1.2 .Glutathion peroxydase (GPX) et reductase (GR) 20

II.3.1.3.La catalase (CAT) 21

II.3.2..Les systèmes antioxydants non enzymatiques 21

II.3.2.1. Le glutathion 21

II.4. Les conséquences du stress oxydant 22

II.4.1. La peroxydation lipidique 22

II.4.2. Oxydation des proteines 22

II.4.3. Lésions sur l'ADN 23

II.5. Stress oxydatif dans le cerveau 23

II.6. Le stress oxydant et quelques pathologies associées 24

II.6.1.Mutagénèse et cancérogénèse 24

II.6.2. Sénescence et sénilité – affections neurodégénératives 24

II.6.3. Maladies inflammatoires 25

Chapitre III : propolis

III.1. **Propolis origines géographiques et botanique** 26

III.2. **Composition chimique de la propolis** **26**

III.3. Propriétés biologiques de la propolis 28

III.3.1. Activité antioxydante et antiradicalaire 29

III.3.1.1. Effet de la propolis sur les maladies neurodégénératives et dépressives 29

III.3.2. Autres activités 30

III.4. Toxicité 32

DEUXIEME PARTIE: PARTIE PRATIQUE

Chapitre IV: Matériel et Méthodes

IV .1.Le benzopyréne 34

IV.2. Récolte de la propolis..... 34

IV2.1. Préparation de l'extrait brut éthanolique de la propolis 34

IV.2.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de la propolis 34

IV.2.2 .1 Dosage des polyphénols totaux de la propolis..... 34

IV.2.2.2Dosage des flavonoïdes totaux de la propolis..... 35

IV.3. Traitement des Animaux..... 35

IV.3.1. Entretien des animaux 35

IV.3.2. Traitement et sacrifice des animaux..... 35

IV.3.2. 1. Traitement des animaux par la propolis 35

IV.3.2.2. Induction de la toxicité aigüe par le benzopyrène..... 35

IV.3.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement de l'organe (cerveau) 36

IV.3.3. Préparation de la fraction cytosolique 36

IV.3.4 . Dosage des protéines totales 36

IV.4. Mesure des paramètres du stress oxydant..... 37

IV.4.1. Dosage du MDA cytosolique ou test TBARS 37

IV.4.2. Mesure du glutathion cytosolique 38

IV.4.3. Evaluation de l'activité des enzymes anti-oxydantes 38

IV.4.3.1 Mesure de l'activité enzymatique de superoxyde dismutase (SOD) 38

IV.4.3.2 Mesure de l'activité enzymatique de la catalase 39

IV.5. Examen histologique du tissu cérébral 40

IV.6. Analyse statistiques..... 40

Chapitre V : Résultats et Discussion

V.1 Etude phyto-chimique de de la propolis 42

V.1.1.Teneur en polyphénols et flavonoïdes de la propolis 42

V.2. Evaluation du stress oxydant cérebrale..... 43

V.2.1 Variation des taux du malonyldialdéhyde cytosolique (MDA)..... 43

V .2.2. Variation du taux de glutathion cérébrale 45

V .2.3 . Variation de l'activité enzymatique de la Superoxyde dismutase cérébrale 47

V.3.4 . Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique cérebrale 49

V .3.Etude histologique microscopique 51

Conclusion..... 56

Référence Bibliographique

Annexe

Tableau des figures

Figures	Titre	Page
Figure 1	Le cerveau de la souris.	4
Figure 2	Les principaux axes de référence de l'hippocampe. A gauche, un hippocampe (en bleu) de cerveau humain, et à droite un hippocampe (en rose foncé) de cerveau de souris. Les axes septo-temporal, dorso-ventral et rostro-caudal sont indiqués.	5
Figure 3	La barrière hémato-encéphalique.	6
Figure 4	Structure chimique de quelques HAP.	8
Figure 5	Structure chimique du benzo (a)pyrène.	9
Figure 6	Schéma métabolique du benzo [a] pyrène.	12
Figure 7	Métabolisme du B(a)P en diol époxydes.	14
Figure 8	Cycle redox de la formation benzo(a)pyrène-1,6-quinone.	15
Figure 9	Déséquilibre du statut pro/antioxydant favorisant l'état de stress oxydant.	17
Figure 10	Différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène.	18
Figure 11	Système de défense antioxydant.	19
Figure 12	Les trois types de la SOD.	20

Figure 13	Structure chimique des molécules entrant dans la composition de la propolis.	28
Figure 14	Principe du dosage de Malon dialdéhyde.	37
Figure 15	Principe du dosage du GSH.	38
Figure 16	Quelques étapes de l'autoxydation du pyrogallol.	39
Figure 17	Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait ethanolique de la propolis en mg EAG/g et mg EQ/g de propolis.	42
Figure 18	Variations des taux du MDA cytosolique cérébrale après traitement par le benzopyrène absolu seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours à 25mg/kg.	44
Figure 19	Variations des taux du GSH cytosolique cérébrale après traitement par le benzopyrène absolu seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours à 25mg/kg.	46
Figure 20	Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu cérébrale, après un traitement par le B(a)p seul (100mg/kg), en cas de prétraitement par la propolis (25mg/kg) seul et en cas de la combinaison propolis + B(a)P.	48
Figure 21	Variation de l'activité enzymatique de la CAT dans le tissu cérébrale, après un traitement par le B(a)p seul (100mg/kg), en cas de prétraitement par la propolis (25mg/kg) seul et en cas de la combinaison propolis + B(a)P.	50

Figure 22	Études histologiques de coupes de cerveau vues au microscope optique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine [H & E]) dans les groupes témoin (10 x10).	51
Figure 23	Études histologique de coupes de cerveau vues au microscope optique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine [H & E]) dans les groupes traitée par benzopyrène (10x10).	52
Figure 24	Études histologique de coupes de cerveau vues au microscope optique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine [H & E]) dans les groupes P+B(a)P (10x10).	52
Figure 25	Études histologique de coupes de cerveau vues au microscope optique (coloration à l 'hématoxyline et à l'éosine [H & E]) dans les groupes traités par la propolis (10 x10).	53

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Principales caractéristiques physico-chimiques du B(a)P	9
Tableau 2	Principaux composants chimiques de la propolis	27

Liste des Abréviations

AGPI : Acide Gras Polyinsaturée

AG : Acide Gallique.

AHR : Aryle Hydrocarbon Récepteur.

ATP : Adénosine Triphosphate.

BAP : Benzopyréne.

BBC : Bleu Brillant de Coomassie.

BPDE : Benzopyréne Dihydrodiol Epoxyde.

BSA : Albumine Sérique Bovin.

CAPE : Caffeic Acide Phenethyl Ester**.**

CAT : Catalase.

CE : Cellule Endothélial.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

DTNB : 5,5 dithiodis-2-Nitrobenzoique.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique.

EEP : Extrait Ethanolique de la Propolis.

ERO : Espèces Réactive de l'Oxygène**.**

GPX : Glutathion peroxydase.

GSSG *:* Glutathion oxydé.

GSH : Glutathion Réduit.

HAP : Hydrocarbure Aromatique polycyclique.

HCl : Acide Chlorhydrique.

HOCL : Hypochloreux.

H2O2 : Peroxyde d'Hydrogène.

LPO : Lipide Peroxydation.

MDA : Malon Dialdéhyde.

MPO : Myéloperoxidase.

NADPH, H: Nicotine amide Adénine Di nucléotide Phosphate réduit.

O2•- : Anion Superoxide.

ROS : Réactive Oxygène Species.

SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique.

SNC : Système Nerveux centrale.

SNP : Système Nerveux périphériques.

SOD: Su peroxyde Dismutase**.**

TBA: Thio Barbiturique acide.

TBARS: Thiobarbituric Acide Réactive Substances.

TCA: trichlor acétic acide.

Le benzo(a)pyrène, un contaminant de l'environnement de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques, étant le membre le plus étudié de cette famille, présent dans divers milieux, notamment la fumée de cigarette, les aliments grillés au charbon de bois et les sous-produits de déchets industriels (Sergent et al., 2019). Le Benzo(a)pyrèneest est un composé bien étudié qui nécessite une activation métabolique. B(a)P et ses métabolites peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique sous forme lipophile. Ils atteignent facilement le tissu cérébral et causent des lésions cérébrales (Grova et al., 2007). La neurotoxicité du B(a)P a reçu beaucoup moins d'attention que sa cancérogénicité (Chepelev et al., 2015).

Le stress oxydatif survient suite à la présence d'un déséquilibre entre la production des espèces oxygénées réactives (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) et plusieurs études ont abordé la relation entre le développement de plusieurs maladies neurodégénératives et le stress oxydatif.

Il est nécessaire de chercher de nouvelles molécules qui soient plus efficaces, plus résistantes et à moindre effets indésirables, pour prévenir les maladies neurodégénératives.

La propolis est une substance collante et résineuse, collectée à partir de diverses sources florales, qui est transformée et utilisée par les abeilles mellifères (Apis mellifera) pour construire et entretenir leurs ruches en bouchant des trous dans leurs nids d'abeilles (Kasiotis et al., 2017). Des extraits enrichis en flavonoïdes et en polyphénols issus de la propolis présentent des propriétés anti-oxydantes apportées par plusieurs études (Rouibah et al., 2008 ; Lahouel et al., 2010 ; Kebsa et al., 2014).

A partir de ces données, nous avons fixés les objectifs de notre travail consacrés à étudier et déterminer l'ampleur de ce stress oxydatif cérébrale lors d'une neurotoxicité aigüe du B(a)P d'une part et à établir l'effet protecteur de la propolis contre cette neurotoxicité d'autre part. Et évaluer les paramètres de stress oxydant cellulaire et la visualiser des changements tissulaires.

Chapitre I : La neurotoxicité du benzo(a)pyrène

I.1. Le cerveau

I.1.1.Anatomie fonctionnelle du cerveau :

Sur le plan anatomique, le système nerveux central (SNC) est composé du cerveau et de la moelle épinière, les fibres nerveuses qui quittent le cerveau et la moelle épinière, ainsi tous les neurones situés en dehors des ces structures forment le système nerveux périphérique (SNP). Le cerveau est un objet physique, un organe du corps, un tissu vivant, qui se trouve a l'intérieur du crane, le cerveau est l'organe le plus complexe du vivant (Figure 1).

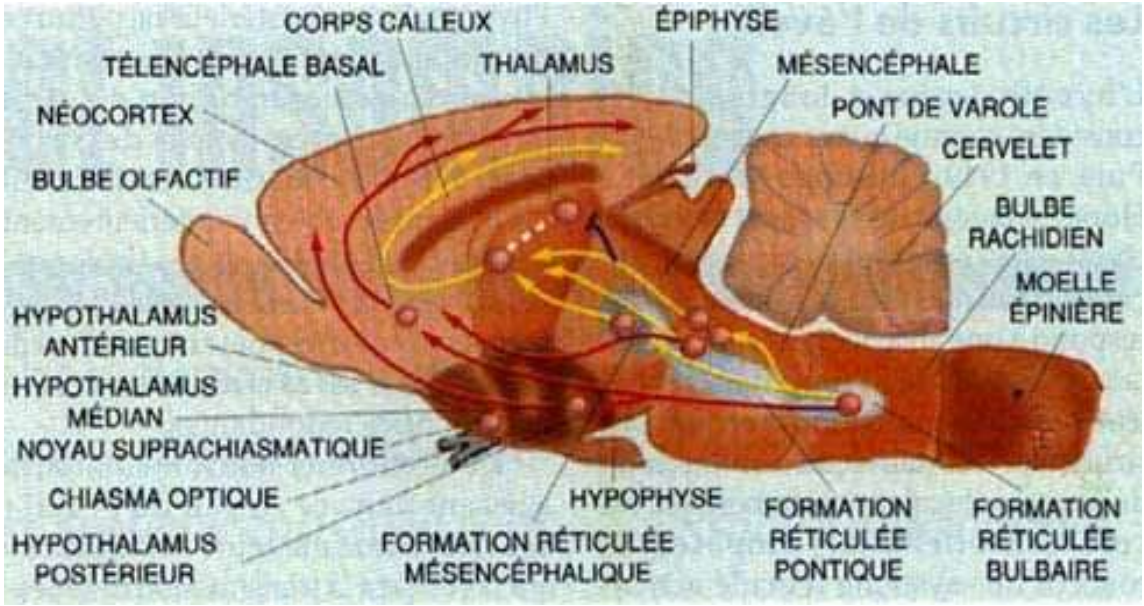


Figure.1 le cerveau de la souris (Leclerc, 2012).

La première fonction du cerveau est de produire un comportement ou des mouvements (Kolb et al., 2019). Le cortex cérébral et l'hippocampe sont des éléments importants du système nerveux central (SNC) (Varallyay et al., 2013). Le cortex cérébral est crucial pour le contrôle de la cogitation et du fonctionnement (Viggiano et al., 2014). L'hippocampe (Figure 2) est une structure clé qui affiche un rôle central dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Lynch, 2004).

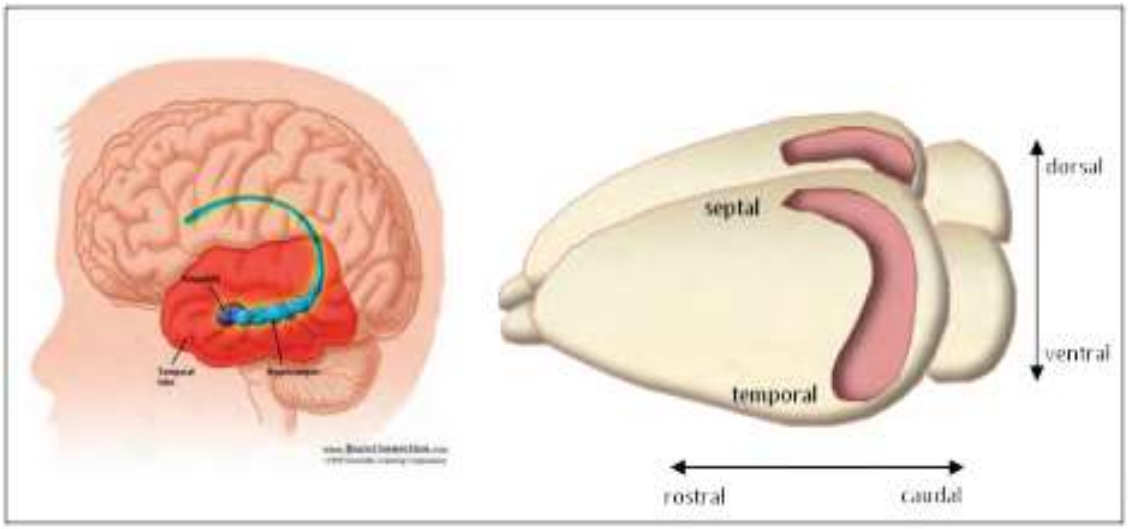


Figure 2 : Les principaux axes de référence de l'hippocampe. A gauche, un hippocampe (en bleu) de cerveau humain, et à droite un hippocampe (en rose foncé) de cerveau de souris. Les axes septo-temporal, dorso-ventral et rostro-caudal sont indiqués (Leclerc, 2012).

Dans le cerveau, entre la circulation sanguine et le système nerveux central (SNC), se trouve la barrière hémato-encéphaIique. La barrière hémato-encéphalique contrôle l'entrée des nutriments et limite l'entrée des substances toxiques au sein du SNC contribuant ainsi à l'homéostasie des fonctions cérébrales. Les CE cérébrales sont les composantes structurales et fonctionnelles de la barrière hémato-encéphalique (Annabi et al., 2010).

Les prolongements des astrocytes établissent des contacts avec les neurones et les vaisseaux sanguins. Ils stimulent les cellules des vaisseaux pour qu'elles forment des jonctions serrées, qui sont à la base de la barrière hémato-encéphalique (Figure 3). Les astrocytes participent également à l'échange de nutriments et de diverses substances entre les vaisseaux et les neurones, fournissent un tissu de soutien aux structures cérébrales, et favorisent la réparation du tissu endommagé (Kolb et al., 2019).

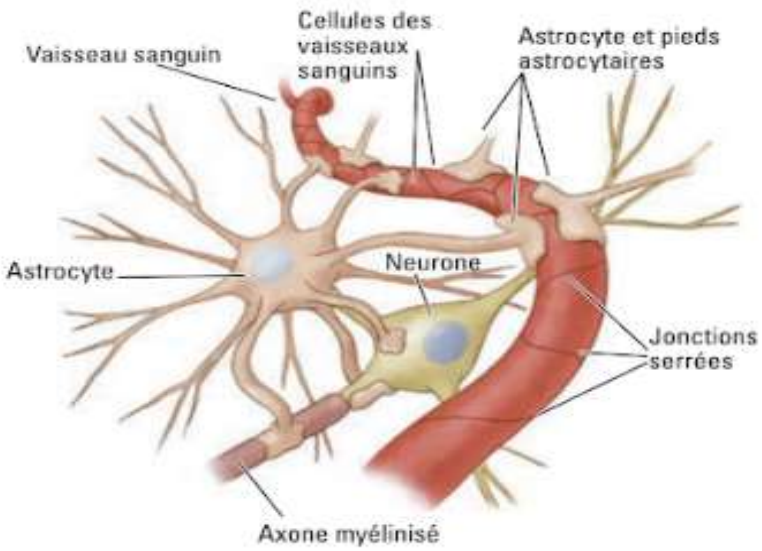


Figure.3 la barrière hémato-encéphalique (Kolb et al., 2019).

I.1.2.Pathologies du cerveau

Plus de 2000 pathologie peuvent d'une façon ou d'une autre être liées à une anomalie cérébrale (Kolb et al., 2019).

La maladie de Parkinson est une autre maladie neurodégénérative largement répandue, associée à la perte de neurones dopaminergiques et à une diminution des niveaux de dopamine striatale (Fontanilla et al., 2011).

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative du système moteur caractérisée par une faiblesse focale puis généralisée conduisant à la paralysie et au décès par insuffisance respiratoire. Les symptômes découlent de la perte de corticospinal (haut) et du tronc cérébralet les neurones moteurs spinaux (inférieurs) (Fontanilla et al., 2011).

Les tumeurs cérébrales sont les tumeurs solides les plus diagnostiquées chez les enfants de moins de 15 ans dans le monde, les tumeurs des hémisphères cérébelleux occupaient le premier rang (Hazmiri et al., 2018).

I.2.Le benzo(a)pyrène et le cerveau

L'ensemble du profil chimique et des caractéristiques physiologiques d'un tissu est essentiel pour comprendre la logique du développement d'une pathologie, en fonction de divers paramètres anatomiques, chimiques et métaboliques (Ogunleke, 2019). La pollution est un mélange hétérogène de composés organiques et de particules susceptibles d'influencer le développement du système nerveux central (SNC) (Morris-Schaffer et al., 2019). Le système nerveux central peut être très susceptible d'être endommagé par le B(a)P (Wormley et al., 2004).

I.2.1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des molécules constituées de carbone et d'hydrogène issus de la dégradation de la matière organique. Leur structure comporte au moins 2 cycles aromatiques condensés. L'agencement de ces cycles aromatiques est linéaire, angulaire ou groupé (Figure 4). Certains HAP peuvent contenir des cycles saturés et d'autres peuvent être substitués (nitro-HAP, amino-HAP, alkyl-HAP, etc.) (Bostrom et al., 2002).

Les HAP sont un groupe de contaminants environnementaux omniprésents formés lors de la combustion incomplète ou pyrolyse de matières organiques et présents dans divers milieux, notamment la fumée de cigarette, les aliments grillés au charbon de bois et les sous-produits de déchets industriels. Il est bien connu que ces polluants ont divers effets néfastes sur la santé humaine, notamment le développement de cancers, de pathologies cardiovasculaires, de perturbations du système endocrinien et de maladies inflammatoires et pulmonaires (Mayati et al., 2012).

La plupart des effets délétères liés aux HAP sont médiés par l'activation du récepteur d'hydrocarbure d'aryle cytosolique (AhR) et sa liaison ultérieure à des éléments sensibles au xénobiotique spécifiques qui se trouvent dans le promoteur des gènes sensibles au HAP. Cependant, certains effets liés aux HAP peuvent être initiés de manière indépendante de AhR (Mayati et al., 2017).

Les HAP ont très faible hydrosolubilité, et sont solubles dans de nombreux solvants organiques et hautement lipophiles, en raison de leur nature lipophile, les HAP peuvent franchir la barrière hémato-encéphalique et provoquer des modifications physiopathologiques telles que la perte d'activité neuronale et la plasticité synaptique et la mort neuronale (Mortamais et al., 2017).

Leur toxicité provient de leur interférence avec le fonctionnement des membranes cellulaires mais aussi avec les systèmes enzymatiques (Rengarajan et al., 2015).

Les HAP ne possèdent pas une toxicité aiguë ou subaiguë très importante. Un potentiel neurotoxique, une toxicité hématologique, rénale et hépatique et une immunotoxicité ont toutefois étaient observés dans différentes études animales utilisant de très fortes doses (Ramesh et al., 2001). Une exposition chronique, même à de faibles concentrations de HAP, provoque des dommages durables, tels que le cancer , la stérilité et la neurotoxicité pour l' homme et la faune (Bollinger et al., 2017). Ces contaminants suscitent un intérêt considérable, car certains d'entre eux sont hautement cancérogènes chez les animaux de laboratoire et ont été impliqués dans des cancers du sein, du poumon et du côlon chez l'homme (Ramesh et al., 2004).

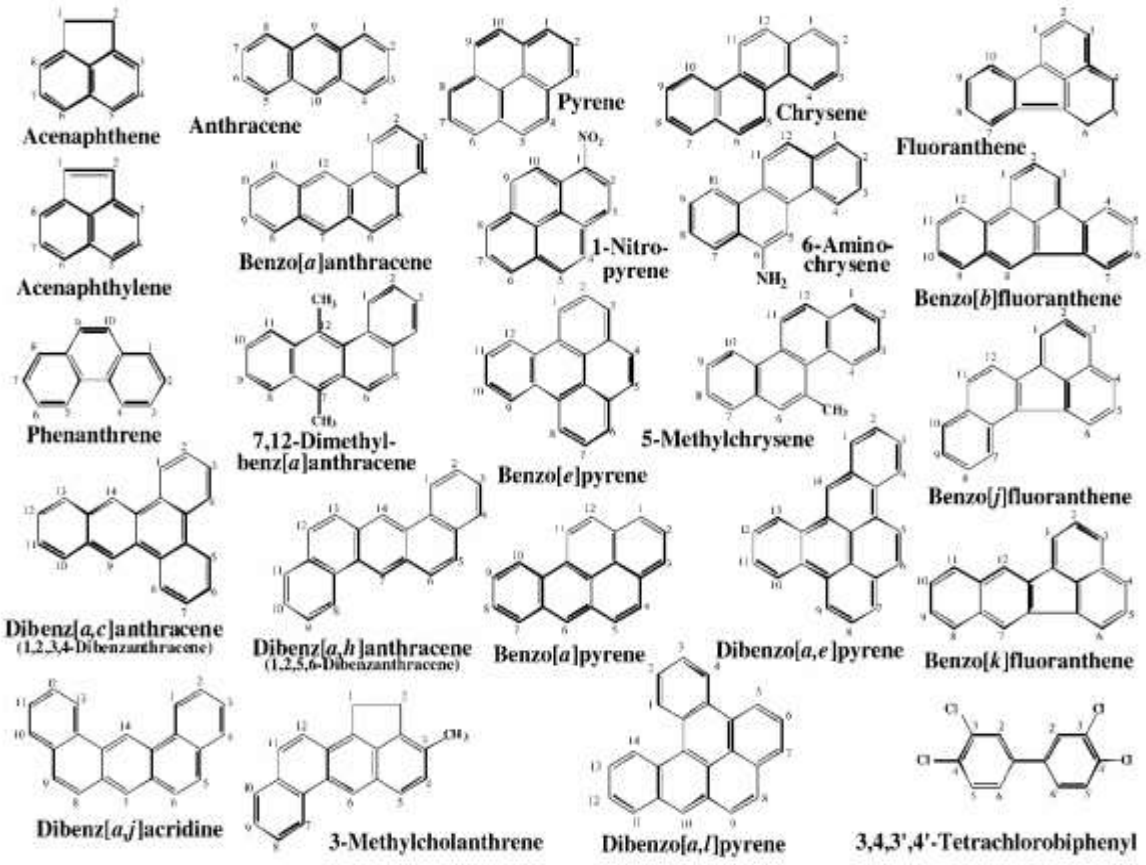


Figure.4 Structure chimique de quelques HAP (Bostrom et al., 2002).

I.2.2. Benzo(a)pyrène

Le benzo(a)pyrène (B(a)P) est un HAP à 5 anneaux aromatiques, étant le membre le plus étudié de cette famille et possédant une région de baie, est émis dans l'atmosphère sous forme particulaire. Il est systématiquement présent dans les mélanges, en quantité assez faible et surtout variable en fonction des sources d'émission. Il est classé cancérogène par l'UE et est le seul HAP classé cancérogène certain par le CIRC (groupe 1) (IARC, 2010).

Le B(a) P a été signalé comme cancérogène probable chez l'homme. L'exposition au B (a)P peut avoir lieu par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés (grillés ou fumés) ou par inhalation d'air pollué (Dutta et al., 2010). Le benzo(a)pyrène est un composé environnemental bien étudié qui nécessite une activation métabolique pour avoir un effet cancérogène. La neurotoxicité du BaP a reçu beaucoup moins d'attention que sa cancérogénicité (Chepelev et al., 2015).

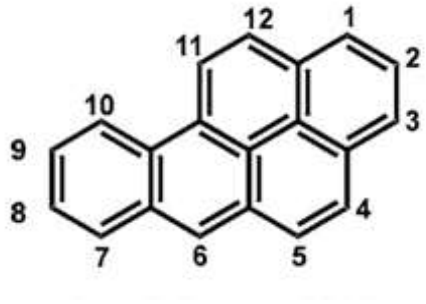
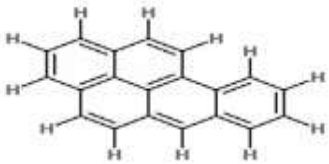


Figure.5 Structure chimique du benzo (a)pyrène (Nebert et al., 2013).

I.2.3.Caractéristiques physico-chimiques

Le nom officiel du B(a)P selon l'Union internationale de chimie pure et appliquée est benzo(a)pyrène. Le Benzo (a) pyrène se présente sous forme cristalline solide et de couleur jaune pâle ayant une Légère odeur aromatique. Il est faiblement volatile et insoluble dans l'eau, mais très soluble dans de nombreux solvants organiques, tel que le chloroforme, le benzène, le toluène et le xylène. Le b(a)P est une substance stable jusqu'à des températures très élevées. En solution, il s'oxyde sous l'influence de la lumière, de l'air et de la chaleur (IARC, 2010). Ces principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées au (Tableau 1).

Tableau.1 Principales caractéristiques physico-chimiques du B(a)P (Sidani et al., 2012).

	Benzo(a)pyrène
Formule moléculaire	C20H12
Structure chimique	
Type de HAP	Lourd
numéro de CAS	50-32-8
Poids moléculaire (g/mol)	252,32
Densité (g/cm3)	1,351
Point de fusion (°C)	178,1
Point d'ébullition (°C)	310-312

I.2.4. La toxicité du benzo(a)pyrène

Les études de toxicité aiguë décrivent les effets néfastes d'une substance qui résulte soit d'une exposition unique ou d'expositions répétées dans une courte période de temps (habituellement moins de 24 heures) et à des fortes doses d'administration (Hayes, 2008 ; Klaassen, 2001).

Lors d'une exposition cutanée au B(a)P, les effets observés sont l'hypersensibilité au contact et l'immunosuppression de glandes sébacées. L'administration intra-péritonéale du B(a)P chez des souris a également mis en évidence des effets hématologiques, immunosuppresseurs, neurologiques (effets sur la production de certains neurotransmetteurs) et sur le système reproducteur (Heredia Ortiz, 2015). Le b(a)P et ses métabolites peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique sous forme lipophile. Ils atteignent facilement le tissu cérébral et causent des lésions cérébrales. L'exposition subaiguë au B (a) P chez la souris adulte module également l'expression génique dans les zones du cerveau fortement impliquées dans la fonction cognitive, comme l' hippocampe (Grova et al., 2007). Des symptômes neurologiques, notamment une dysrégulation végétative et une perte de mémoire à court terme, ont été signalés chez des travailleurs exposés à une exposition aiguë au B (a) P dans des usines de production de coke en Pologne (Majachrzak et al., 1990).

Une diminution de la réponse aux stimuli sensoriels et un dysfonctionnement autonome chez des rats ayant reçu une dose unique, doses (25, 50, 100 et 200 mg kg-1) de B (a) P (Saunders et al., 2002). Ces résultats démontrent que le système nerveux est une cible pour la toxicité comportementale induite par le B (a) P.

Le benzo (a) pyrène produisait des tumeurs chez toutes les espèces (souris, rat, hamster, cobaye, lapin, canard, triton, singe) pour les quelles des données ont été rapportées à la suite d'une exposition par différentes voies (orale, cutanée, par inhalation, intratrachéale, intrabronchique, sous-cutanée, intrapéritonéale, intraveineux). Il avait un effet cancérigène local et systémique, était un initiateur de la cancérogenèse cutanée chez la souris et était cancérogène lors d'études à dose unique et à la suite d'une exposition prénatale et transplacentaire (IARC, 2010).

Les principaux critères de jugement fonctionnels altérés par le B(a)P comprenaient les fonctions neuromusculaires, les fonctions sensorimotrices (son et douleur) et les fonctions autonomes (augmentation du nombre de mictions et défécations) (Saunders et al., 2002).

I.2.5. La toxicocinétique du B (a)P

I.2.5.1. L'absorption

Le B(a)P peut être absorbé par différentes voies. Les 3 voies principales d'absorption sont la voie cutanée, respiratoire (inhalation) et gastrique (ingestion). La vitesse et la quantité de B(a)P absorbé dépendent du véhicule. L'administration du B(a)P avec divers aliments modifie son absorption chez les rats. Cette absorption est de 42 % à 50 % avec les aliments lipophiles. Elle diminue de 20 à 30 % avec les autres aliments (Kawamura et al., 1988)

Les HAP sont des molécules lipophiles. Cette propriété leur permet d'être facilement dissous dans la bicouche lipidique et de traverser les membranes cellulaires par diffusion passive. Ainsi, le B(a)P est absorbé par les voies respiratoire, digestive et cutanée. Son hydrophobicité ralentit sa diffusion à travers les épithéliums, du fait de la présence d'espaces inter-membranaires aqueux. Ce phénomène a pour conséquence une concentration en B(a)P plus élevée au niveau du site d'entrée que dans le compartiment sanguin et les tissus éloignés (Gerde, 1993).

L'absorption du B(a)P par voie orale est rapide et présente un comportement exponentiel (Rees et al., 1971). Rees et al. (1971) ont mesuré de grandes concentrations de B(a)P dans les ganglions lymphatiques thoraciques trois heures après l'exposition intragastrique 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 (Rees et al., 1971).

I.2.5.2. La distribution

La distribution du B(a)P est très importante dans tout l'organisme et l'équilibre entre les concentrations sanguines, hépatiques, dermiques et rénales est atteint dans les 2 heures suivant l'exposition (Marie, 2010). Malgré cette importante distribution du B(a)P dans les différents compartiments de l'organisme, la diminution de ses concentrations plasmatiques pendant les premières heures suivant l'exposition est principalement due à son métabolisme hépatique lors d'une injection IV chez le rat (Heredia-Ortiz, 2011).

La distribution du B(a)P est similaire après administration sous cutanée, intraveineuse ou intra-trachéale chez les souris et les rats. Il est détecté dans tous les organes après quelques minutes à quelques heures suivant l'administration (Foth et al., 1988). Ramesh et al. (2001) ont montré la présence d'une grande distribution du B(a)P dans le plasma 6 heures après son administration par voie orale. 10 % de cette dose a été détectée dans le foie après 24 heures alors que 45 % a été éliminée dans les urines et les fèces. Pour étudier la distribution après administration par voie

intra-trachéale (Ramesh et al., 2001). Weyand et Bevan (1986) ont administré du B(a)P marqué au 3H. Après 5 min, le B(a)P se distribue 60 % au niveau des poumons et 13 % dans le foie. Après une heure, 27 % de radioactivité est retrouvée dans la carcasse, 24 % dans les intestins, 16 % dans le foie et 15 % dans les poumons (Weyand et Bevan, 1986). Le tissu adipeux et les glandes mammaires constituent des sites très importants de distribution et d'accumulation de B(a)P dû à sa nature lipophile (Modica et al., 1983). Le B(a)P peut aussi traverser la barrière placentaire chez la souris et le rat (Madhavan et Naidu, 2000). Une distribution temporelle du B(a)P métabolisé dans le plasma et les tissus cérébraux après une administration orale de 25, 50, 100 et 200 mg / kg (Saunders et al., 2006).

I.2.5.3. Métabolisme

Le B(a)P est métabolisé par les enzymes de phase I, les cytochromes P450s (CYPs), qui donnent des composés plus hydrophiles tels des époxydes, des dihydrodiols, des phénols et des quinones (Osborne et Crosby, 1987). Ces derniers forment une classe de métabolites cancérigènes ultimes du B(a)P. Les principaux CYP impliqués dans la formation des diols et des diol-époxydes sont le CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 (Shinada, 2006). Plusieurs voies métaboliques sont impliquées dans la biotransformation du B(a)P qui aboutissent à la formation d'un radical cation, de différents métabolites hydroxylés, d'orthoquinones et des diol-époxydes.

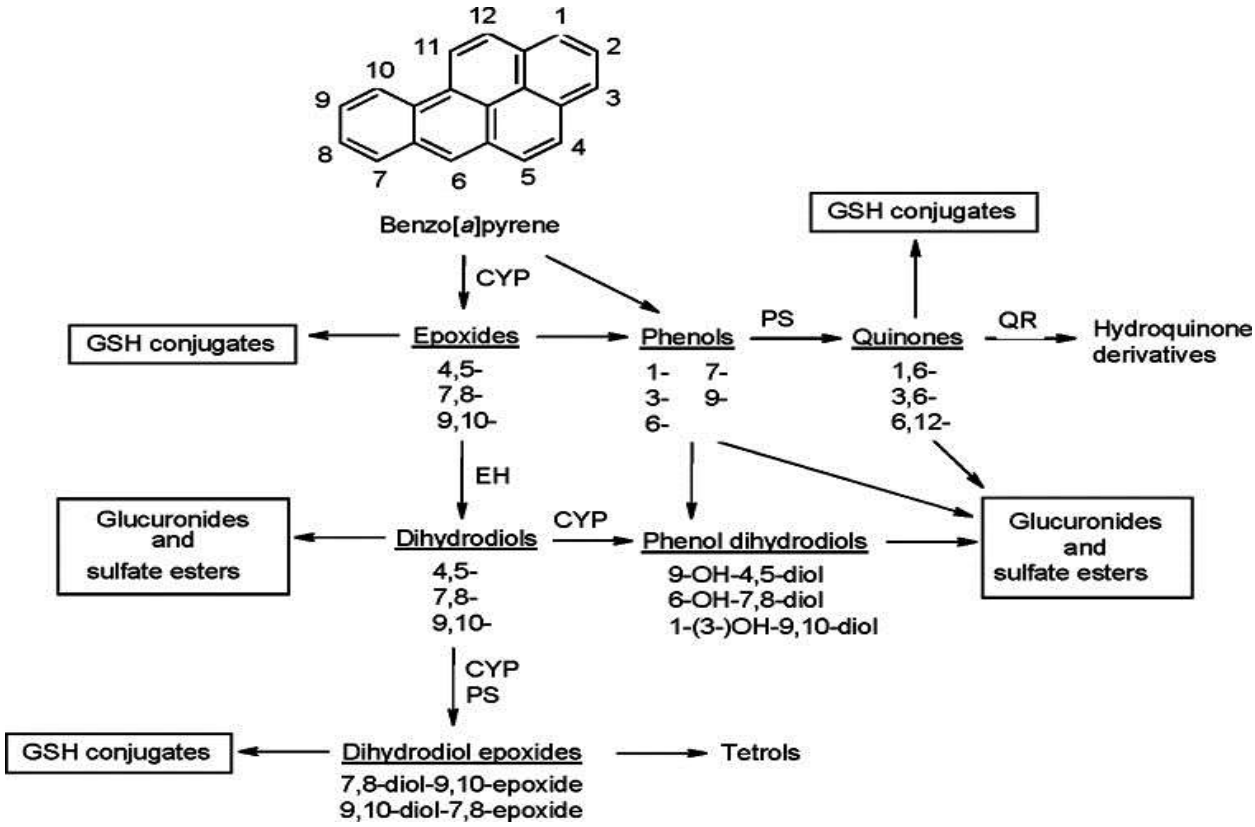


Figure.6 Schéma métabolique du benzo (a)pyrène (IARC, 2010).

I.2.5.3.1. Voie du radical cation

La première réaction enzymatique sur le squelette carboné du B(a)P, peut être une peroxydation conduisant à la production d'un radical cation. Son hydrolyse spontanée aboutit à la formation du 6-OHBaP. Ce dernier peut être spontanément oxydé, ou bien métabolisé par les CYP, en quinones : BaP-1,6-, 3,6-, et 6,12-diones. Ces métabolites subissent ensuite l'action de la NADPH quinone oxydoréductase 1 pour former des hydroquinones. Un dérivé dicarboxylique est également produit de façon importante après l'ouverture d'un des cycles aromatiques de la 1,6-dione ou de la 3,6-dione, lors d'une exposition intrapéritonéale (IP) de rats au 14C-B(a)P (Yang et al., 2000).

I.2.5.3.2. Voie des diol-époxydes

Les trans-dihydrodiols proches de la région de baie peuvent également être une nouvelle fois oxydés par les CYP, ou les radicaux peroxydes générés par l'activité peroxydase de la prostaglandine H synthase. Comme précédemment, les arènes oxydent les moins stables issus de cette réaction sont spontanément hydrolysés en phénols, aboutissant à la formation de monohydroxy-dihydrodiols (triols). Quant aux plus stables, ils ne sont pas hydrolysés et forment les dihydrodiols-époxydes (diol-époxydes). Ainsi, le BaP-9,10-dihydrodiol est majoritairement transformé en BaP-1-hydroxy-9,10-dihydrodiol et dans une moindre mesure en BaP-9,10-diol-7,8-époxyde (rev-BPDE), tandis que le BaP-7,8-dihydrodiol est principalement métabolisé en BaP-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE). la majorité du BPDE et du rev-BPDE est hydrolysée pour former le 7, 8, 9,10-tetrahydroxy-tetrahydrobenzo(a)pyrène (BaP-7, 8, 9,10-tétraol) (Simpson et al., 2000).

Cette réaction n'est pas nécessairement médiée par une enzyme et peut être spontanée, à partir de l'attaque de l'eau présente dans le média (Yang et al., 1976).

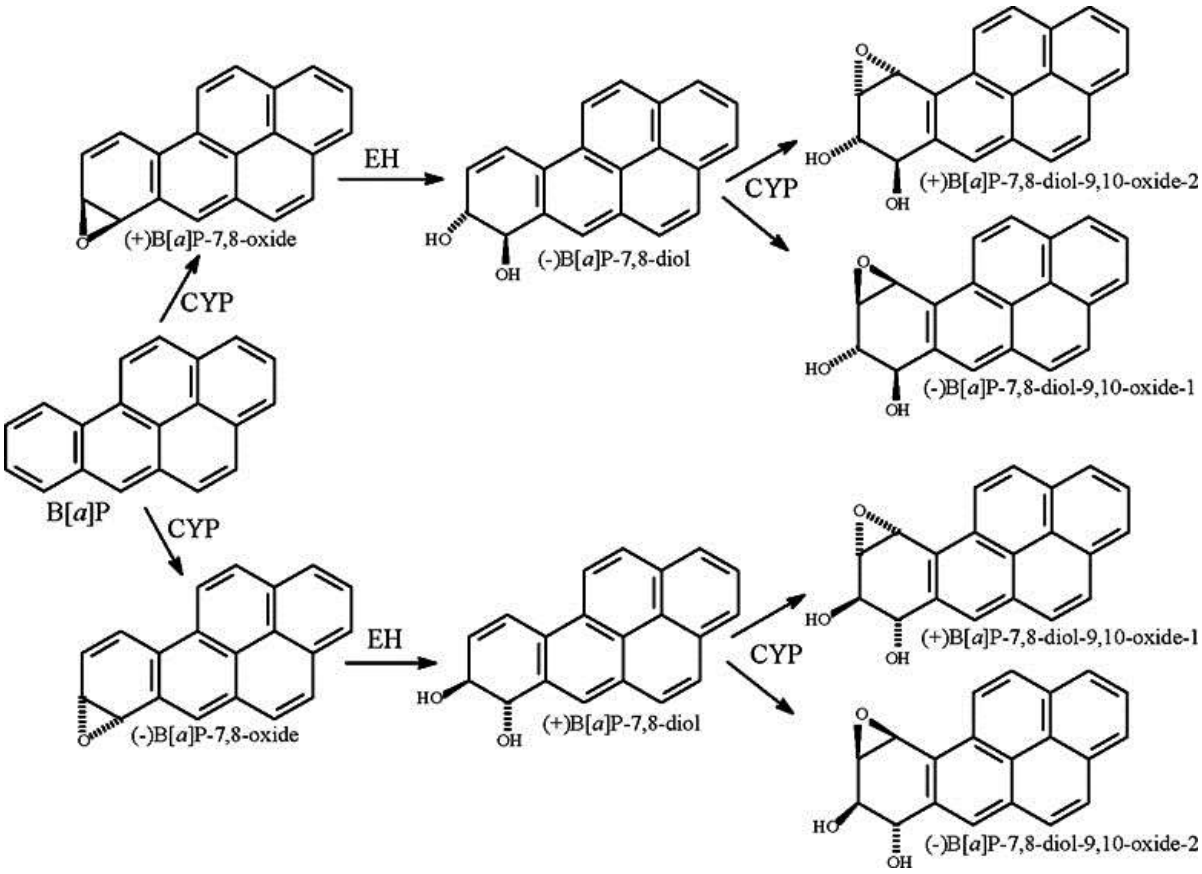


Figure.7 Métabolisme du B(a)P en diolépoxydes (IARC, 2010).

I.2.5.3.3. Voie des quinones/espèces réactives de l'oxygène

C'est une oxydation enzymatique du benzo(a)pyrène-7,8-diol en benzo(a)pyrène-7',8- quinone, molécule réactive électrophile vis-à-vis de l'ADN, par les aldo-céto-réductases (AKR) (Mangal et al., 2009). Dans les lignées cellulaires humaines A549 du cancer du poumon, le benzo(a)pyrène-7,8-quinone augmente la formation du 8-oxo-désoxyguanosine (Mangal et al., 2009). Le benzo(a)pyrène-7,8-quinone peut également subir un cycle répétitif d'oxydoréduction qui génère des espèces oxygénées réactives (EOR) qui endommagent l'ADN (Penning et al., 1999). Il existe aussi plusieurs autres sources des EOR induites par le B(a)P. Les souris et les rats métabolisent le B(a)P en benzo(a)pyrène-1,6-quinone (figure 9), benzo(a)pyrène-3,6-quinone et benzo(a)pyrène-6,12-quinone à partir du 6-oHB(a)P par des réarrangements non enzymatiques. Ces quinones entrent dans le cycle redox et sont responsables de l'induction de mutations (Xue et Warshawsky, 2005).

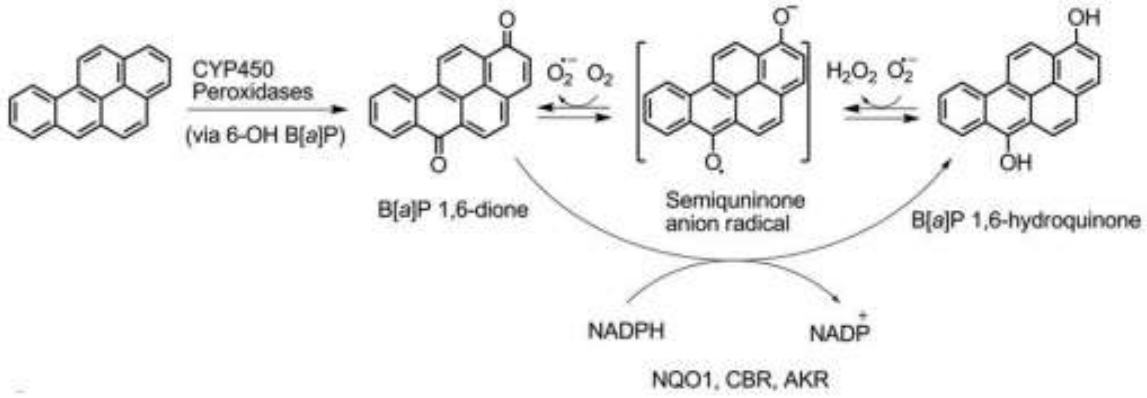


Figure.8 Cycle redox de la formation benzo(a)pyrène-1,6-quinone (Sen et al., 2012).

Les intermédiaires réactifs du B(a)P (oxydes, diol-époxydes et cations radicalaires) ainsi que les EOR générées par la quinone peuvent perturber l'équilibre de la balance prooxydants/anti-oxydants en réduisant les niveaux des antioxydants ce qui entraine un stress oxydant. Parmi ces EOR, il y a principalement l'anion superoxyde (O.- 2) et le peroxyde d'hydrogène (H2O2). Le H2O2 peut par la suite donner naissance à un autre radical, le radical hydroxyle OH. Qui est très réactif vis-à-vis de l'ADN (Kim et Lee, 1997).

I.2.5.4.Excrétion

Le système hépatobiliaire et le tractus gastro-intestinal sont les voies principales d'élimination du B(a)P et de ses métabolites,quelle que soit la voie d'exposition.la forte excrétion fécale (70-75 % d'une dose sous-cutanée chez la souris) suggère l'existence d'un cycle entéro-hépatique.

L'excrétion urinaire est une voie mineure.chez le rat et la souri (4-12%),le maximum d'élimination se situe entre 24 et 48 h , la majeure partie de la dose urinaire totale étant excrétée en 72 h. elle contient des métabolites du B(a)P conjugués sous forme de GSH de glucuronides, de sulfates et d'acides mercaptiriques (80% de la dose excrétée),des cmposés phénoliques et des esters, éthers et conjugués avec des sucres neutres (13-18% de la dose excrétée). Il n'y a pas d'élimination dans l'air expiré (IARC, 2010).

Lee et al. (2003) ont rapporté que 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. Les rats traités par voie intrapéritonéale par le B(a)P, excrètent du 7-(benzo(a)pyrène-6-yl)- N7-guanine dans les fèces et l'urine. Cet adduit a été aussi détecté dans les tissus pulmonaires de souris traitées avec du B(a)P par voie intrapéritonéale (Banasiewicz et al., 2004).

Chapitre II : Le stress oxydatif

II.1. Le stress oxydant

Lorsque les cellules utilisent l'oxygène pour produire de l'énergie, des radicaux libres peuvent être créés en parallèle de la production de l'ATP (adénosine triphosphate), au sein des mitochondries, mais cette voie n'est pas unique. Ces sous-produits sont généralement des espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species en anglais), qui résultent de processus redox cellulaires. Ces espèces peuvent avoir un effet néfaste sur le métabolisme de l'organisme lorsque leur concentration augmente trop. Ainsi, à concentration élevée, elles génèrent une situation dite de stress oxydant, processus délétère qui peut endommager les structures cellulaires et conduire à l'apoptose (Favier, 2003).

La définition du stress oxydant se réfère à une rupture de l'équilibre homéostatique entre la production des espèces réactives de l'oxygène et la défense antioxydante de l'organisme. Il s'agit donc d'une perturbation dans l'équilibre pro-oxydant/antioxydant en faveur de la formation des espèces réactives, conduisant à des dommages potentiels sur les cellules, les tissus, l'ADN, etc...(Anderson, 1997).

Les espèces oxygénées réactives (EOR) sont produites par les organismes vivants au cours du métabolisme cellulaire normal. Lorsqu'elles sont présentes en concentrations faibles ou modérées, ces EOR participent au déroulement des processus cellulaires physiologiques. A des concentrations élevées, elles produisent des dégâts aux macromolécules comme les protéines, les lipides et l'ADN (Valko et al., 2006).

Pour faire face à ces EOR, les organismes aérobies sont munis de systèmes de défense antioxydants qui sont enzymatiques et non enzymatiques et qui servent essentiellement à les éliminer. Cependant, dans les conditions pathologiques, les systèmes antioxydants sont le plus souvent désactivés (Birben et al., 2012).

Le changement de l'équilibre entre prooxydants et antioxydants en faveur des premiers est appelé « stress oxydatif ». Les dommages oxydatifs peuvent être exacerbés par une diminution de l'efficacité des mécanismes de défense antioxydants (Minciullo et al., 2015).

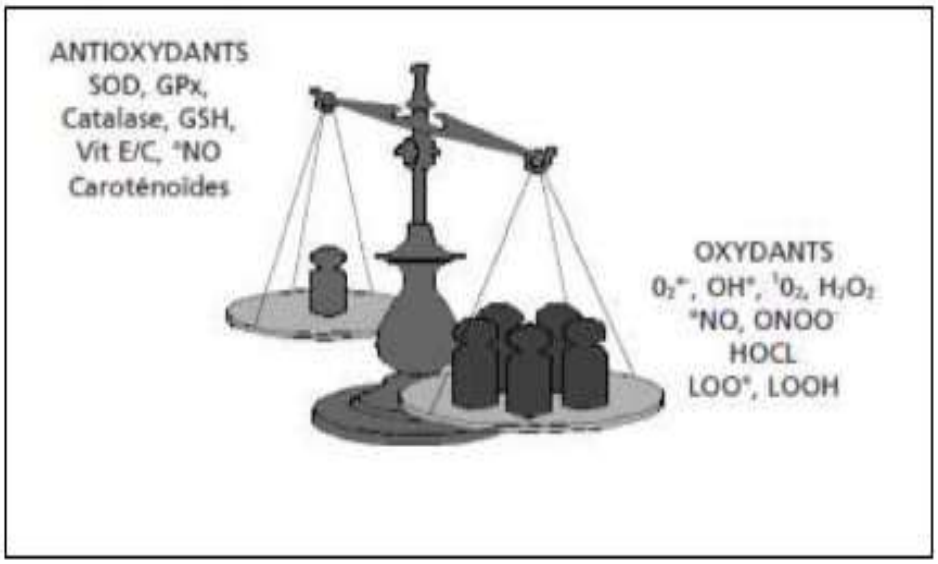


Figure.9 Déséquilibre du statut pro/antioxydant favorisant l'état de stress oxydant (OPARA, 2002).

II.2. Nature de la réactivité des ROS/RNS

ROS et RNS sont des termes génériques imprécis utilisés en biologie et en médecine. Ils décrivent plusieurs espèces, pouvant être radicalaires, chargées ou non. On peut citer par exemple les radicaux hydroxyles (OH•), l'anion-radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le monoxyde d'azote (NO•), le dioxyde d'azote (NO_2•), les peroxydes (ROO•) et les lipides peroxydés (LOO•). En outre, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet ($1O_2$), l'acide hypochloreux (HOCl), l'acide nitreux (HNO_2), le peroxynitrite ($ONOO^-$), le trioxyde d'azote (N_2O_3), et le peroxyde lipidique (LOOH), sont des dérivés non radicalaires tout aussi bien couverts par ces acronymes. Toutes ces espèces peuvent conduire à des réactions radicalaires ou globalement oxydantes dans les organismes vivants (Genestra, 2007).

Dans la famille des radicaux, on distinguera les radicaux primaires qui ont un rôle physiologique particulier et les radicaux secondaires, produits par réactions (non contrôlées, généralement) des radicaux primaires avec plusieurs matériaux biologiques présents

dans une cellule soumise à un stress oxydant (lipides, protéines, glucides…) (Favier, 2003).

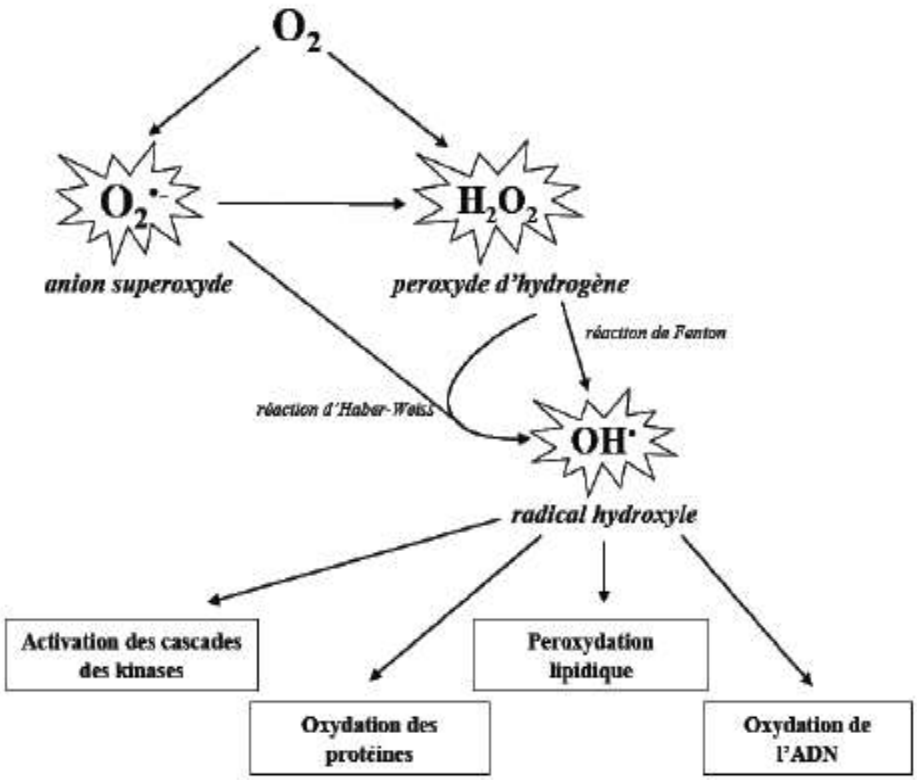


Figure.10 différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Chen et Chung, 1996)

II.3. Systèmes de défense antioxydants

La production excessive ou incontrôlée d'espèces oxydantes induit une perturbation du statut redox pouvant induire de sérieuses altérations des structures cellulaires. Il donc nécessaire que cette production de (ERO) soit contrôlée. Pour cela, les cellules disposent se système de défense antioxydants classées en antioxydants enzymatiques ou non- enzymatiques. Les antioxydants peuvent être classés selon leurs modes d'action, leurs localisations cellulaires et leurs origines (Halliwell, 1990).

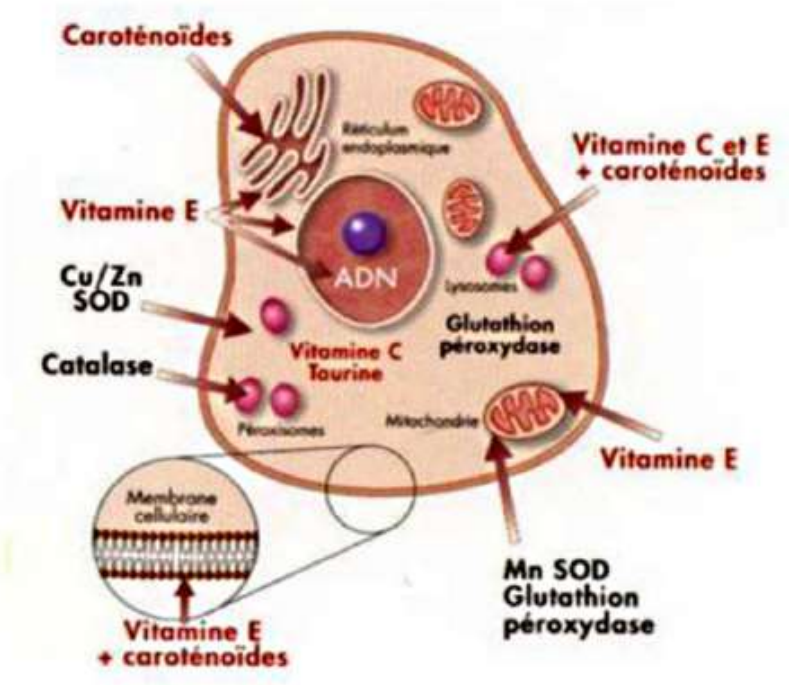


Figure.11 Système de défense antioxydant (OPARA, 2002).

II.3.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Les Systèmes de défense contre le stress oxydatif ont pour rôle d'inhiber l'oxydation d'un substrat. Les antioxydants primaires, qui sont pour la plupart des enzymes, vont limiter la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les antioxydants secondaires, qui peuvent être des substances lipo ou hydrosolubles, vont piéger les ERO sous une forme peu réactive (Zielinski et Portner, 2000). Parmi les enzymes antioxydantes.

II.3.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme antioxydante primaire essentielle qui réagit en défense de l'organisme contre les produits toxiques du métabolisme cellulaire.elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD) et une forme extracellulaire (EC-SOD). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace intermembranaire (Okado-Matsumoto et Fridovich, 2001 ; Sturtz et al., 2001).

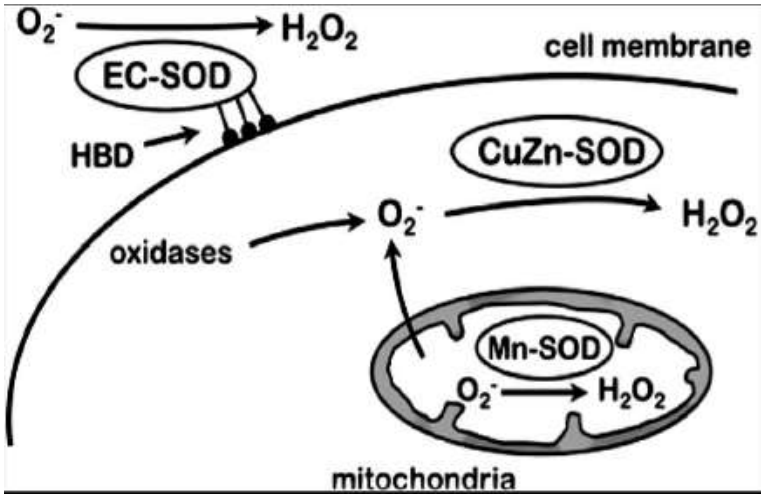


Figure.12 Les trois types de la SOD (Faraci et al., 2004).

II.3.1.2. Glutathion peroxydase (GPX) et reductase (GR)

La glutathion peroxydase (GPX) catalyse la réaction de transformation des peroxydes d'hydrogène H_2O_2 et lipidiques ROOH respectivement en eau et alcool ROH. Cette réaction met en jeu une molécule antioxydante non enzymatique, le glutathion, sous sa forme réduite GSH. En fait la forme réduite du glutathion (GSH) est le régulateur majeur du redox intracellulaire et se trouve en abondance dans les cellules, ses concentrations pouvant atteindre 10 mM (Meister et Anderson, 1983).

Le glutathion agit comme un capteur direct des radicaux libres, un co-substrat pour l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase, co-facteur de plusieurs autres enzymes, et forme des conjugués dans des réaction d'endoet de xénobiotiques (Gregus et al., 1996). En réalité 2 molécules de GSH sont nécessaires et formeront la forme oxydée du glutathion à savoir le glutathion disulfide GSSG.

$$H_2O_2 + 2\,GSH \xrightarrow{GPX} 2\,H_2O + GSSG \qquad \text{(Powers et Jackson 2008)}$$

$$ROOH + 2\,GSH \xrightarrow{GPX} ROH + H_2O + GSSG \qquad \text{(Powers et Jackson 2008)}$$

La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'éléctrons. La concentration cellulaire en

glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPX maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2\,GSH + NADP^+$$ (Powers et Jackson 2008)

II.3.1.3. La catalase (CAT)

La catalase se trouve dans les peroxysomes essentiellement. Elle assure la transformation en eau et dioxygène du peroxyde d'hydrogène H2O2, pour lequel elle a une moins forte affinité que la GPX. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{Cat} \bullet\ 2\,H_2O + O_2$$ (Powers et Jackson, 2008)

II.3.2.Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent etre apportés par l'alimentation.dans cette catégorie d'antooxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytrochrome c et les vitamines E et C.

II.3.2.1. Le glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide permettant la réduction des peroxydes cellulaires grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPX). Le GSH intervient également dans le cycle de régénération de 2 vitamines antioxydantes : la vitamine E et la vitamine C (Powers and Jackson 2008). Le rapport entre la forme réduite du glutathion GSH et la forme oxydée GSSG permet de caractériser le statut redox de la cellule et constitue aussi un bon marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté (Ji et al., 1992).

II.4. Les conséquences du stress oxydant

Les dommages induits par les ERO sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée). Les ERO initient l'apoptose en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité.

II.4.1. La peroxydation lipidique

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona et al., 2000). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques, qui sont très réactifs. La peroxydation de lipides induit une diminution de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong et al., 2006). Tout ceci peut conduire à l'apoptose si les dégâts sont importants (Mc Michael, 2007).

Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonenal (4- HNE) sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Echtay et al., 2003).

La peroxydation lipidique des constituants membranaires des érythrocytes a de lourdes conséquences et peut mener à une hémolyse oxydative grave (Gallo et al., 2013).

La peroxydation lipidique a été démontrée comme une conséquence majeure du stress oxydatif et joue un rôle critique dans les dommages neuronaux et les maladies neurodégénératives (Romero et al., 1998).

II.4.2. Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être

oxydées par les ERO. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le $Fe^{2+,}$ peuvent être classées en deux catégories : 1) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique, 2) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

Les ERO provoquent aussi une dénaturation des protéines : altération des groupements thiols, formation de ponts disulfures, accentuation du caractère hydrophobe d'où agrégation des protéines qui les rend plus résistantes à la protéolyse physiologique (Grandjean, 2005). Cela concerne en particulier les enzymes cytosoliques et les protéines de transport qui perdent leurs fonctionnalités à la suite de ces modifications délétères (Durand et al., 2013).

II.4.3. Lésions sur l'ADN

Les lésions des ERO sur l'ADN des cellules sont principalement provoquées par le radical hydroxyle. Le monoxyde d'azote peut également participer à une fragmentation de l'ADN. Les dommages oxydatifs de l'ADN peuvent aboutir à une mutagénèse, une perturbation des processus de réplication, de transcription et de traduction provoquant un arrêt des synthèses et pouvant mener à la mort cellulaire (Lenzi, 2011). Le stress oxydant accélère et amplifie toutes les lésions spontanées produites sur l'ADN (Tissier, 2011).

La mutagénèse intervient quand les procédés de réparation de l'ADN n'ont pas le temps d'agir et que l'ADN cellulaire se réplique avec les erreurs (provoquées en partie par le stress oxydant). Plus le degré de stress oxydant est élevé, plus les phénomènes de mutagénèse dépassent les processus de réparation (Tissier, 2011).

II.5. Stress oxydatif dans le cerveau

De nombreux auteurs comme Favier (2006) et Tissier (2011) ou encore Valko et al. (2007) décrivent un lien entre le stress oxydant et les dommages cellulaires causés. En effet, un stress oxydant dit « léger » entraine une prolifération cellulaire accrue, un stress oxydant « moyen » provoque une apoptose cellulaire, un stress oxydant « fort » induit une nécrose cellulaire et enfin un stress oxydant « majeur » est responsable de modifications membranaires à l'origine de lyses cellulaires. Le cerveau est l'un des organes les plus susceptibles à l'attaque des radicaux libres. Il possède une activité métabolique plus élevée, une plus forte quantité de gras polyinsaturés, il y a un fort taux d'oxydation neurochimique et d'auto-oxydation de certaines catécholamines, une forte quantité de fer et il possède un taux plus faible d'enzymes détoxificateurs, comme la catalase (CAT), la glutathione peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD) (Bureau, 2006).

le stress induit par la B(a)P module les enzymes métabolisant dans le cerveau de façon indirecte par le biais de systèmes neuroendocriniens impliquant des récepteurs alpha 2 adrénergiques, ce qui aboutit à la formation de métabolites réactifs à l'origine d'une toxicité (Konstandi et al., 2000).

II.6. Le stress oxydant et quelques pathologies associées

Un défaut d'équilibre entre la production des radicaux libres et les mécanismes de défense constitue un stress oxydant. Le stress oxydant est incriminé dans les processus de vieillissement cellulaire (Andreyev et al., 2005). Le stress oxydatif a été mis en cause dans la pathogénèse de nombreuses maladies humaines, notamment, les accidents vasculaire cérébraux et les maladies neurodégénératives tel que la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la maladie de parkinson (Desport et Couratier, 2002).

II.6.1. Mutagénèse et cancérogénèse

Valko et al. (2007) expliquent que les ERO et, plus généralement, le stress oxydant est directement lié aux processus de cancérogénèse par les lésions de l'ADN qu'ils provoquent (notamment le radical hydroxyle), l'activation des procarcinogènes en carcinogènes, l'amplification de signaux prolifératifs et l'inhibition de certains gènes suppresseurs de tumeurs (Klebanoff, 2005).

Il est intéressant de noter qu'une mutation sur le gène codant la MPO (ayant pour conséquence un remplacement d'un nucléotide G en un nucléotide A sur la paire de base 463) provoque une moindre expression du gène et une moindre synthèse de la MPO. Chez les patients atteints de cette mutation, on a observé une diminution du risque des cancers des poumons, du larynx, de la vessie et de l'hépatoblastome (Klebanoff, 2005).

La lipoperoxydation peut entraîner la formation d'aldéhyde et notamment de malondialdéhyde, agent mutagène pour les cellules des mammifères et carcinogènes chez le rat. Le produit majeur de la lipoperoxydation reste l'hydroxynonenal qui est moins mutagène mais qui reste très toxique (Valko et al., 2007). Paradoxalement, lorsque la cancérogénèse est avancée, les radicaux libres interviennent au sein des lymphocytes NK (Natural Killer) dans la lutte anticancéreuse en induisant un sénescence précoce puis une apoptose des cellules tumorales (Valko et al., 2006).

II.6.2. Sénescence et sénilité – affections neurodégénératives

L'implication du stress oxydant (et notamment du système impliquant la MPO) dans des maladies neurodégénératives humaines comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson est communément admise. Si le cerveau est si sensible au stress oxydant c'est parce qu'il s'agit d'un tissu riche en acide gras polyinsaturés, sujets à la peroxydation lipidique. Chez l'Homme, certaines aires du cerveau sont constituées de tissus riches en fer ce qui augmente la probabilité de production d'ERO (Tissier, 2011).

Le vieillissement cérébral physiologique associé à la diminution des capacités cognitives porte le nom de sénescence. Lorsque, celle-ci devient pathologique et lorsqu'on est en présence de dysfonctionnements cognitifs (perte d'énergie, détérioration de la qualité des relations avec le propriétaire, comportements compulsifs, etc…), on parle alors de sénilité. Selon Jungbluth (2008), la sénilité s'accompagne de l'accumulation cérébrale d'un peptide amyloïde β possédant la même séquence d'acides aminés que le peptide incriminé dans la maladie d'Alzheimer chez l'Homme. Ce peptide serait neurotoxique et à l'origine de la production de nombreuses ERO. Même si le lien de causalité n'a pas été trouvé, de nombreuses études ont montré que le dysfonctionnement cognitif, la présence anormale de ce peptide et l'augmentation des marqueurs du stress oxydant sont corrélés dans la sénilité canine (Jungbluth, 2008).

II.6.3. Maladies inflammatoires

Lorsqu'un phénomène inflammatoire survient, trois phases .Une surproduction d'ERO survient lors de l'inflammation car : Il y a stimulation de l'expression d'enzymes constitutives comme les NOS endothéliales et neuronales, la XOR, certaines NOX et COX1, Il y a activation des enzymes inductibles comme NOX2, NOSi et COX2. Selon Jungbluth (2008), les mécanismes à l'origine de la surproduction d'ERO sont initiés par des cytokines produites lors de l'inflammation et les cellules phagocytaires en sont les principales productrice même si les cellules endothéliales, les fibroblastes et les chondrocytes peuvent également produire des ERO. De plus, il a été montré que les ERO interviennent dans la régulation de l'inflammation par la stimulation de la synthèse de molécules d'adhérence et de médiateurs de l'inflammation (Jungbluth, 2008).

L'inflammation dans le cerveau (neuroinflammation) pouvait jouer un rôle important dans le déclenchement, ou du moins dans la progression de la MP, si la neuroinflammation et le stress oxydatif semblent deux sujets très distincts, ils sont pourtant intimement reliés dans la MP, au cours du processus de neuroinflammation, diverses cytokines et radicaux libres sont produits et peuvent causer la mort neuronale par apoptose. Les radicaux libres produits par la microglie activée peuvent augmenter l'état de stress oxydatif et causer l'apoptose des cellules neuronales. Les cytokines enclenchent aussi la mort neuronale via le processus de mort apoptotique, puisqu'ils lient les récepteurs de mort cellulaire (Bureau, 2006).

Chapitre III : propolis

III.1. Propolis origines géographiques et botanique

La propolis est un produit naturel appartenant à la grande famille des produits apicoles, est l'un des six produits de la ruche avec le miel, la gelée royale, le pollen, la cire et le venin d'abeille. Le mot Propolis est un terme complexe provenant de deux mots grecs anciens: pro- debout pour « avant ou en défense » et polis qui signifient ville. Ainsi, en apiculture, sa signification fait référence à l'hébergement de la ruche. La propolis est une substance collante et résineuse, collectée à partir de diverses sources florales, qui est transformée et utilisée par les abeilles mellifères (Apis mellifera) pour construire et entretenir leurs ruches en bouchant des trous dans leurs nids d'abeilles. Il est également utilisé pour lisser les murs internes et protéger l'entrée de la ruche des intrus (Kasiotis et al., 2017).

Il existe plusieurs types de propolis qui sont fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents sur cette zone géographique, de la disponibilité des végétaux pendant la saison et de l'espèce de l'abeille. Tout cela explique que l'on va trouver des propolis de couleur jaune ambre jusqu'au brun foncé en passant par des variétés qualifiées de vertes ou de rouges. L'abeille va aller chercher sa résine dans son écosystème et c'est bien de cet écosystème que va dépendre la composition de la propolis (Cardinault et al., 2012).

La propolis est insoluble dans l'eau froide et soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme etc. Aux températures élevées, la propolis est douce, souple et très collante; cependant, une fois refroidi, et particulièrement lorsqu'il est gelé ou presque, il devient dur et cassant. Il restera fragile après un tel traitement, même à des températures plus élevées. La propolis deviendra généralement liquide entre 60 et 70 ° C, mais pour certains échantillons, le point de fusion peut atteindre 100 ° C (Kuropatnicki et al., 2013).

III.2. Composition chimique de la propolis

La composition chimique de la propolis est sensible à la localisation géographique, à l'origine botanique et aux espèces d'abeilles, L'analyse d'échantillons de propolis provenant de diverses parties du monde a montré que la propolis contient plus de 300 composés chimiques différents (Huang et al., 2014). elle comprend généralement des cires d'abeilles, des baumes, des huiles essentielles et des résines (Tableau 2), riches en métabolites secondaires des flavonoïdes, les terpènes, les composés phénoliques (figure 13) et leurs esters, les xanthones, les propolones et les guttiferones,(De Mendonça et al., 2015). Polysaccharides, protéines, acides aminés, amines, amides et débris organiques (Kuropatnicki et al., 2013). Les aldéhydes aromatiques et

les alcools, les acides gras, les stilbènes et les β-stéroïdes (Watanabe, 2011). La propolis contient également des vitamines importantes, telles que les vitamines B1, B2, B6, C et E, ainsi que des minéraux utiles tels que le magnésium (Mg), le calcium (Ca), le potassium (K), le sodium (Na), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn) et le fer (Fe). Quelques enzymes, telles que la déshydrogénase succinique, la glucose-6-phosphatase, l'adénosine triphosphatase et la phosphatase acide (Pasupuleti et al., 2017). Une propolis algérienne est dérivée de deux espèces principales Populus spp et Citrus spp et se compose de pinocembrine, de chicorique et de caféique les acides et leurs esters, la galangine (Boutabet et al., 2011) .

Tableau 2. Principaux composants chimiques de la propolis (Ghedira et al., 2009).

Substances principales	Constituants chimiques
Résine et baume 50 à 55 % Cire 30 % Pollen 5 %	
Huiles essentielles 10 %	Prédominance pour le bornéol et le menthol à-côté´ d'un mélange variable de terpènes et sesquiterpènes b-bisabolol, 1,8-cinéole, a-copaene, cymène, limonène
Autres substances 5 %	
Flavonoïde	Flavones : apigénine, chrysine, tectochrysine, artepilline. Flavonols : galangine, apigénine, quercétine , fisétine. Flavanones : naringénine, pinocembrine, pinostrobine. Dihydoflavonols : pinobanksine.
Acides phénols	Acide benzoique, acide p-hydroxybenzoique, acide férulique, acide cinnamique, acide p-coumarique, acid gentisique, acide caféique et l'ester phényléthylique de l'acide caféique (CAPE).
Divers	Acides et esters aliphatiques Coumarine, esculétol Sucres simples (fructose, glucose) et polysaccharides stérols : acétate de calinastérol, acétate de b-dihydrofucostérol
Vitamines	Complexe vitaminique B, provitamine A, vitamine PP.
Minéraux	Al, Ar, Ba, Bo, Cr, Co, Cu, St, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Se, Ti, Va, Zn, silice.

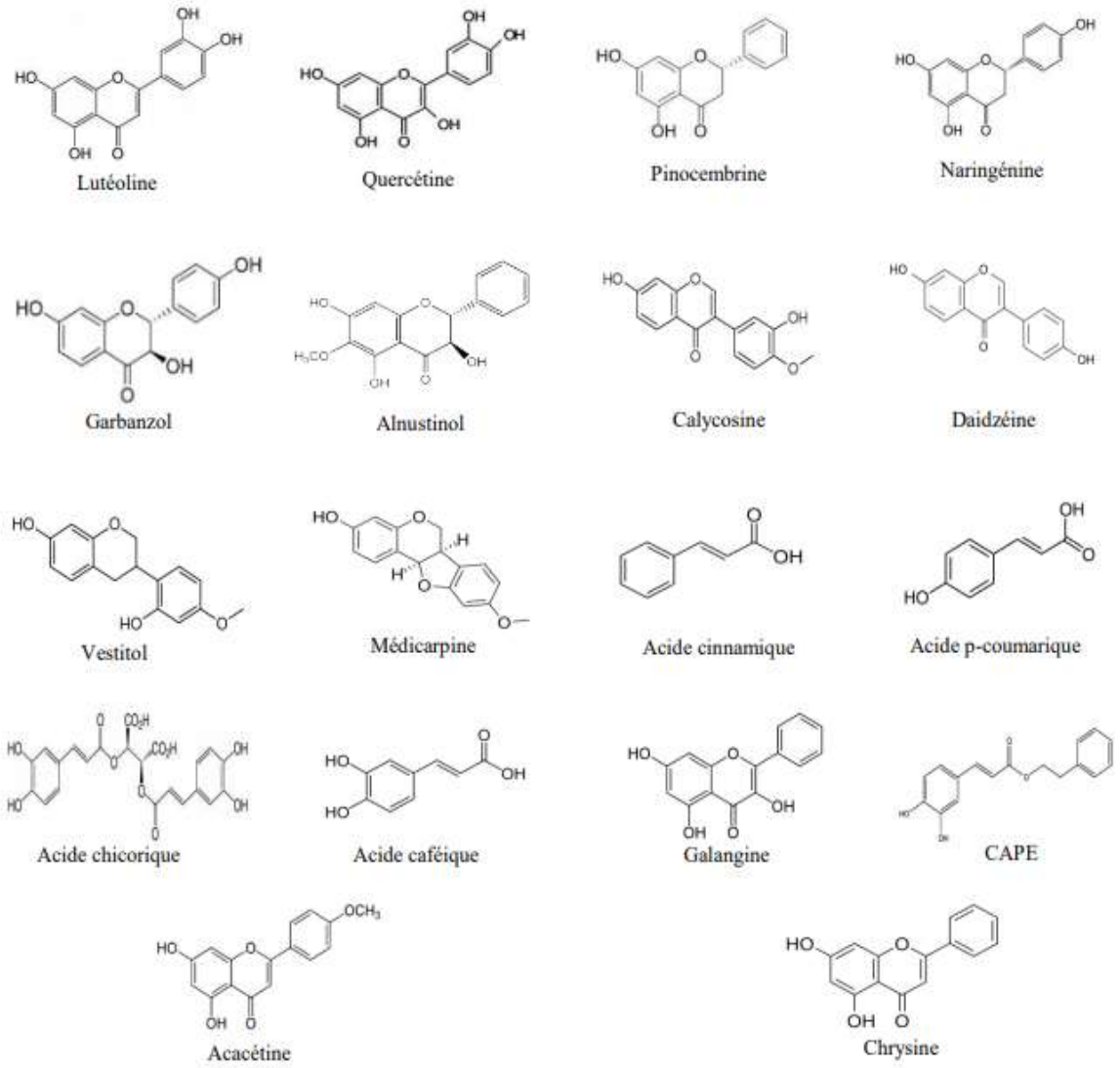


Figure.13 Structure chimique des molécules entrant dans la composition de la propolis (Toreti et al., 2013) .

III.3. Propriétés biologiques de la propolis

La propolis est un produit naturel ayant de nombreuses activités biologiques démontrées et l'extrait de propolis a été utilisé dans les industries alimentaires, pharmaceutique et cosmétique. Différents travaux ont montré les variations de la composition chimique, et par voie de conséquence, de l'activité biologique de la propolis associée à son type et à son origine géographique (Nunes et al., 2018). La propolis et ses extraits ont de nombreuses applications dans le traitement de diverses maladies en raison de ses propriétés antiseptiques, anti-inflammatoires, antioxydantes, antibactériennes, antimycotiques, antifongiques, anti-ulcéreuses, anticancéreuses et immunomodulatrices (Pasupuleti et al., 2017).

III.3.1. Activité antioxydante et antiradicalaire

L'activité antioxydante d'un composé ou d'un extrait correspond à sa capacité à diminuer ou à empêcher les réactions d'oxydation. Les antioxydants naturels les plus connus sont le β- carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés (poly) phénoliques en général (Popovici et al., 2009). Des extraits enrichis en flavonoïdes et en polyphénols issus de la propolis présentent des propriétés anti-oxydantes par inhibition de la lipoperoxydation de l'acide linoléique. La propolis à forte activité antioxydante contient des composés antioxydants tels que le kaempférol et le phénéthylcaféate (Kumazawa et al., 2004).

L'activité anti radicalaire est mise en évidence vis-à- vis du radical DPPH. C'est la fraction la plus concentrée en flavonoïdes qui piège le radical libre DPPH (Alencar et al., 2007). La propolis peut également agir en tant que piégeur contre les radicaux oxygène. Des études récentes indiquent que la propolis est capable d'inhiber la formation de l'anion superoxyde, qui est produite lors de l'autoxydation du b-mercaptoéthanol (Castaldo et Capasso, 2002).

L'activité antioxydante de la propolis de Bornes (Nord-Est) et de Fundăo (Centre) au Portugal a été aussi étudiée. Sa capacité de piégeage des radicaux libres et de protection contre la peroxydation lipidique a été évaluée dans les érythrocytes humains (Valente et al., 2011). La propolis rouge de la région Nord du Brésil possède l'activité antioxydante la plus puissante par rapport aux propolis vertes et marrons (Machado et al., 2016). L'extrait éthanolique de la propolis jaune brésilienne provoque une diminution de la production de l'oxyde d'azote et du malondialdéhyde chez les rats Wistar sans pour autant affecter les activités des enzymes antioxydantes superoxyde dismutase et catalase (da Silva et al., 2016). La propolis réduit significativement la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumon, cerveau) et module l'expression des enzymes antioxydantes (catalase, superoxide dismutase, glutathion peroxydase) (Okutan et al., 2005). Le CAPE est le composé présentant le meilleur pouvoir antioxydant (Farooqui et Farooqui, 2010).

III.3.1.1. Effet de la propolis sur les maladies neurodégénératives et dépressives

Parmi les différentes pathologies liées aux troubles de l'oxydation, les maladies neurodégénératives ont une place particulière. La propolis à d'intéressantes propriétés antioxydants qui pourrait être utilisé comme un composé prophylactique. D'où Reis et al. (2014) décrit que l'extrait d'huile de propolis exerce effets stimulants, antidépresseurs sur le système nerveux central associé à une activité antioxydante chez le rat (Reis et al., 2014). Extrait éthanolique de propolis coréenne ont également effet antidépresseur en améliorant la fonction

des récepteurs des glucocorticoïdes (Lee et al., 2013). Huile essentielle de propolis verte brésilienne, riche en terpénoïdes, possède des effets thérapeutiques contre l'anxiété en modulant l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (Li et al., 2012). Un prétraitement avec la propolis améliore de manière significative la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène dans les cellules SHSY5Y de neuroblastome humain, réduit de manière significative les espèces d'oxygène réactif dérivées des mitochondries et de la 8-oxo-20-désoxyguanosine et inverse l'accumulation de b-amyloïde par la modulation de PI3 K sentier (Ni et al., 2017). la propolis pourrait protéger des dommages neurodégénératifs dans les neurones qui surviennent pendant la maladie d'Alzheimer et le vieillissement (da Silveira et al., 2016). Les peptides d'amyloïde-b s'accumulent dans le cerveau et déclenchent une cascade d'événements pathologiques dans la maladie d'Alzheimer. Il est intéressant de noter que la pinocembrine, enrichie en propolis, inhibe l'accumulation de peptide amyloïde-b in vitro (Wang et al., 2016) et in vivo (Liu et al., 2014). Fontanilla et al. (2011) ont rapporté que l'ester phénylique de l'acide caféique (CAPE) atténuait la neurodégénérescence dopaminergique et la perte de dopamine dans le modèle murin MPTP de la maladie de Parkinson (Fontanilla et al., 2011). Le même composé diminue également les signes de sclérose latérale amyotrophique et augmente la progression de la survie en atténuant à la fois la neuroinflammation et la mort des cellules du neurone moteur (Fontanilla et al., 2012). Enfin, CAPE a également un effet protecteur contre la perte neuronale dopaminergique induite pharmacologiquement chez le rat en protégeant contre la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-3 (Barros Silva et al., 2013).

III.3.2. Autres activités

La propolis présente des propriétés antimicrobiennes (antibactérienne, antifongique, antiparasitaire, antivirale) (Scazzocchio et al., 2006).

L'activité bactéricide de la propolis et de ses constituants est la plus largement documentée. Cette activité à large spectre a été démontrée sur des bactéries Gram+ et Gram– (de type anaérobie et aérobie) mais avec une plus grande efficacité sur les souches Gram+. Parmi les bactéries inhibées, des Staphylococcus (aureus et mutans) (Lu et al., 2006). des Streptococcus (mutans et sanguinis) (Koo et al., 2002). Des Bacilles (cereus et subtilis) (Pavilonis et al., 2008) , des Proteus (vulgaris et mirabilis), des Pseudomonas (Onlen et al., 2007), des Listeria(Yang et al., 2006) , des Salmonella(Uzel et al., 2005), des Clostridium, des Pyogènes, Escherichia coli et faecalis et Helicobacter pylori (Boyanova et al., 2005) .

Une nouvelle option thérapeutique pouvant être envisagée pour des investigations in vivo ultérieures comme candidat au traitement de la leishmaniose cutanée (Miranda et al.,

2015).quelques études ont montré que la propolis était efficace contre les trichomonas, les trypanosoma (responsable de la maladie du sommeil), les leishmania ou Giardia lamblia (parasitose intestinale) qui sont pour la plupart des parasites très répandus dans les pays tropicaux et subtropicaux (Cardinault et al., 2012).

La propolis AF-08 du Brésil est active contre le virus de la grippe et améliore les symptômes grippaux chez la souris. L'ester phényléthylique de l'acide caféique (CAPE) est un des plus puissants agents anti-intégrase du VIH. (Ghedira et al., 2009). Un extrait de propolis contenant une concentration de $20 . 10^{-2}$ mg / ml de flavonoïdes était suffisant pour provoquer la mort cellulaire des 67 levures (Oliveira et al., 2006).

La propolis possède un effet ant i- inflammatoire significatif sur différent s modèles in vivo

d'arthrite, d'oedème de la patte ou d'inflammation chronique ou aigüe (Ramos et Miranda, 2007). Le CAPE s'est révélé être le composé possédant le plus fort effet inhibiteur sur l'activité des cyclooxygénases COX-1 et COX-2, évalué par la production de prostaglandines pro-inflammatoires (Rossi et al., 2002).

La propolis possède une action immunomodulatrice in vitro et in vivo sur l'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou acquise (Orsatti et al., 2010 ; Park et al., 2010). Elle augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-6, IL-8), renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (Orsi al., 2000 ; Sforcin, 2007). La prise de propolis réduit les éternuements et irritations dans le cas de rhinite allergique par inhibition de la libération d'histamine (Shinmei et al., 2009).

De très nombreuses études in vitro et in vivo ont été réalisées sur l'activité antitumorale de la

propolis et de ses principaux constituants (Sforcin, 2007 ; Sawicka et al., 2012). Les résultats montrent un effet antiprolifératif vis-àvis d'un très grand nombre de lignées tumorales (sang, peau, côlon, sein, poumon, pancréas, foie, rein, prostate, cerveau) (Watanabe et al., 2011). Une autre étude portant sur l'effet de l'extrait éthanolique de propolis algérienne sur la croissance tumorale de mélanome a montré que la galangine, un flavonoïde commun de la propolis, induisait de façon remarquable l'apoptose et inhibait les cellules de mélanome in vitro (Benguedouar et al., 2016). La propolis turque exerce une action cytotoxique sélective sur les cellules cancéreuses du poumon humain en induisant un stress du réticulum endoplasmique, une apoptose et une activité de la caspase et en réduisant le potentiel de la membrane mitochondriale. (Demir et al., 2016).

III.4. Toxicité

Les études en rapport avec la toxicité de la propolis sont rares et très faible. Elle n'est pas toxique pour les hommes et les animaux, si elle est consommée en quantités raisonnables. L'extrait alcoolique de propolis incorporé dans l'eau potable (rat et souris) et utilisé aux doses 1875 et 2470 et 4000 mg/kg/J pendant 30, 60 et 90 jours, ne montre aucun effet toxique (Segueni, 2011). Les effets indésirables se manifestent par quelques gastralgies (Cuzzolin et al., 2006). Il existe des allergies de contact : dermatite de contact et eczéma (Lee et al., 2006).

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Toxicologie Moléculaire, à l'université de Jijel, il est consacrée à l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait ethanolique de la propolis de Jijel contre la toxicité cérébrale aigue induit par le benzopyréne chez la souris.

IV .1. Le benzopyréne

Le benzopyréne utilisée dans cette étude est le benzopyréne sigma Aldrich.

IV.2. Récolte de la propolis

La propolis utilisée dans ce travail a été récoltée dans la wilaya de Jijel, au sein de la coopérative apicole de la commune de chekfa) par les apiculteurs et l'extraction de composées actif, a été effectuée au sein du laboratoire de recherche de toxicologie Moléculaire(LTM).

IV.2.1. Préparation de l'extrait brut éthanolique de la propolis

100 grammes de propolis brute ont été additionnés à 900 ml d'éthanol 96° et laissés à macération pendant 10 jours. La solution est ensuite filtrée et évaporée à 69°C. L'extrait résineux obtenu constitue l'extrait brut final.

Pour l'étude *in vivo* est afin d'évaluer l'effet protecteur, une solution hydro alcoolique (1% en éthanol) a été préparée et administrée à une dose finale de 25 mg/kg.

IV.2.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de la propolis

IV.2.2 .1 Dosage des polyphénols totaux de la propolis

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode (Singleton et Rossi,1965) en utilisant le réactif de folin-ciocalteu**.** 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 le dosage 500µlde l'extrait dilué en 1/100^{éme}, sont ajouté à 2.25ml d'eau distillée et 250 µl du réactif de folin-ciocalteu (5%). Après 5 mn de repos, 2ml de Na_2CO_3 (bicarbonate de sodium) (7.5%) ont été additionné, le mélange est ensuite incubé pendant 60mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin la densité optique (DO) est lue à 760nm (Singleton et Rossi, 1965).

La quantification des polyphénols est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage en milieu alcoolique (éthanol 70%) réalisée avec l'acide gallique (utilisé aux concentrations massiques de (50 µg/ml, 25µg/ml, 12.5 µg/mg6.25 ug/ml ,3.125 ug/ml)) dans les mêmes conditions que l'extrait (Annexe I, figure 1).Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids de propolis(mg EAG/g de propolis).

IV.2.2 .1 . Dosage des flavonoïdes totaux de la propolis

Selon Dewanto et *al.* (2002), le dosage des flavonoïdes se fait par la méthode colorimétrique basée sur la formation d'un complexe jaune entre les flavonoïdes, et le chlorure d'aluminium. 250 µl de l'extrait dilué en 1/1000ème sont mélangés avec 75µl de $NaNo_2$ (5%). Après un repos de 6mn, 150 µl d'$AlCl_3$ (2%) et 500 µl de NaOH (1M) sont ajoutés, le volume est complété par 2,5 ml d'eau distillée, ensuite la DO est lu à 510 nm (Dewanto et al., 2002).

La teneur en flavonoïdes totaux, est exprimée en milligramme équivalent de la quercétine par gramme de l'extrait, en utilisant une courbe d'étalonnage de la quercétine (annexe I, figure 2) (200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25µg/ml, 12.5 µg/ml). Tous les dosages sont réalisés 3 fois.

Etude *in vivo :*

IV.3. Traitement des Animaux

IV.3.1.Entretien et traitement des animaux

Les souris utilisées dans ce travail sont des souris males sains de souche *swiss albinos*, Pesant chacun entre 20 et 45 g, fournis par l'institut pasteur d'Alger. Les souris sont maintenues dans l'animalerie de l'Université de Jijel dans des conditions standards ; une température ambiante de 22 ° C, une humidité relative de 60% et à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Les souris sont mises en quarantaine 7 jours avant leur utilisation.

IV.3.2.Traitement et sacrifice des animaux

IV.3.2. 1. Traitement des animaux par la propolis

Après la période d'adaptation des animaux, nous avons commencé un traitement préventif, utilisant de l'extrait de propolis à une dose quotidienne de 25mg/kg pendant cinq jours successifs.

IV.3.2.2. Induction de la toxicité aigüe par le benzopyrène

Après le traitement par la propolis, une induction chimique d'une toxicité aigüe cérébrale par le benzopyrène est réalisée par l'administration d'une dose unique de 100 mg/kg véhiculée dans 1 ml d'huile d'olive+ 1% de DMSO ; le B(a)P a été administré aux animaux par voie intra-péritonéale (IP) (Likhachev et al., 1992).

Les animaux sont placés dans des cages en plastique. Ils ont un accès libre à la nourriture et à l'eau. les animaux ont été répartis en 4lots :

Groupe 1 témoin(T) : 3 souris reçoivent 0.2 ml (eau distillée+ Ethanol) par voie orale (vo) pendant 5 jours, et 0.2ml d'huile d'olive par voie intra péritonéal (IP) le 6 éme jours.

Groupe 2 benzopyréne (B(a)p): 03 souris recevant 0.2ml (Ethanol+ eau distillée) par voie oral (vo) pendant 5 jours + 0.2ml de B(a)P par voie intra péritonéal (IP) a une dose unique de 100 mg/Kg au 6 éme jours.

Groupe 3 propolis+Benzopyréne (EEP+B(a)p) :5 souris reçoivent 0,2ml de la propolis à une dose de 25 mg/souris par voie orale quotidiennement pendant 5 jours et suivi par une injection intrapéritonéale unique du B(a)P de 0.2 ml d'une dose de 100 mg/kg administré au 6éme jour.

Groupe 4 propolis(P) : 05 souris recevant une seul injection de 0.2 ml de propolis par voie oral d'une dose unique quotidienne de 25mg/ml pendant 05 jours.

IV.3.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement de l'organe (cerveau)

A la fin des délais du traitement de benzopyréne pendant (48h) les animaux sont sacrifiés, ensuite le cerveau sont soigneusement prélevés, rincés dans une solution de chlorure de sodium (Nacl 0.9%), puis pesés. L'un est congelé à (-20 °C) pour les dosages tissulaires des paramètres de stress oxydatif (MDA, GSH, SOD, CAT,) et l'autre est fixé dans la solution de formol tamponné10% pour l'étude histologique.

IV.3.3.Préparation de la fraction cytosolique

Nous avons préparé la fraction cytosolique selon la méthode décrit par (Iqbal et al., 2003). Pour cela, 0.5 g du cerveau sont coupés et homogénéisés avec trois volumes de tampon phosphate KH2PO4 (0,1 M à pH 7,4) contenant du KCl 1,17 %à l'aide du broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à2000 tours pendant 15 min à 4°C, pour éliminer les débris nucléaires ; le surnageant est ensuite centrifugé à 9 600 tour/min) pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant final est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques .

IV.3.4 .Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du bleu brillant de Coomassie (BBC) à 595 nm, Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié donc à la concentration en protéines dans l'échantillon. Pour cela, 2ml de Bleu de Coomassie a été ajouté à 50µl de l'échantillon. Ensuit le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min et la DO a été lue à 595nm. La concentration en protéines a été détermine à partir d'une gamme étalon réalisé dans les mêmes conditions avec de l'albumine sérique bovine (BSA) aux concentrations (0-1mg/ml), dans les mêmes conditions (annexe II, figure 4).

IV.4. Mesure des paramètres du stress oxydatif

IV.4.1. dosage du MDA cytosolique ou test TBARS

La détermination de la concentration du MDA au niveau de la fraction cytosolique est réalisée par la méthode (Ohkawa et al., 1979) en utilisant l'acide Thio barbiturique (TBA). En effet, la détection du MDA présent dans les échantillons biologiques se base sur la réaction au cours de laquelle, une molécule de MDA en milieu acide (pH 2 à 3) à chaud (100°C) est condensé avec deux molécules de TBA pour former un complexe coloré en rose (figure 14) susceptible d'un dosage spectrophotométrie à une longueur d'onde λ = 532 nm.

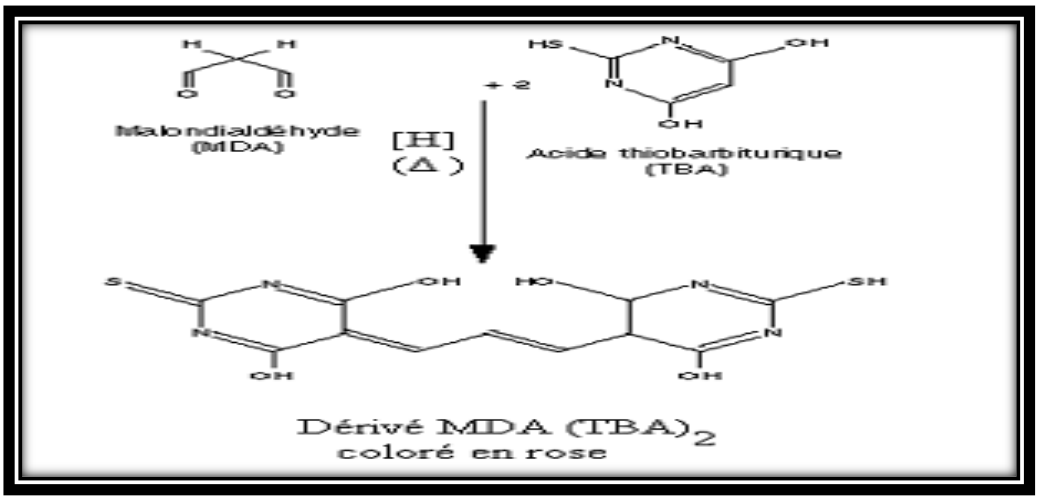


Figure 14 : Principe du dosage de malondialdéhyde (Laguerre *et* al., 2007).

Pour ce dosage, un mélange réactionnel est préparé qui est constitué de : 0.25 ml de la fraction cytosolique de cerveau, 0.25 ml du TCA (20%) et 0.5 ml du TBA (0.67% dans NaOH 50 mM). Ce mélange est chauffé à 100°C pendant 15 min puis refroidi sous l'eau de robinet. 2 ml de n-butanol sont ajoutées et après une centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, la densité optique du surnageant est mesuré à 532 nm .

Le taux du MDA en terme uM/mg de protéine selon la formule suivant :

$$DO = \text{Ɛ} * L * c$$

Ɛ : coefficient d'extinction molaire du MDA (1.53*100000 M .Cm^{-1}).

L : longueur du trajet optique (1cm).

C : concentration de la MDA en mol/mg de protéine.

IV.4.2. dosage du glutathion cytosolique

Le dosage de glutathion réduit est effectué selon la méthode de Ellman (1959) au niveau du cerveau. C'est une méthode basée sur l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman DTNB (5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)) par les groupes (SH) en formant l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque, ce dernier est caractérisé par une coloration jaune intense, et par conséquent peut être utilisée pour évaluer les groupes thiols (SH) (figure15) ce qui permet sa quantification spectrophotométrie à 412 nm (Ellman.1959).

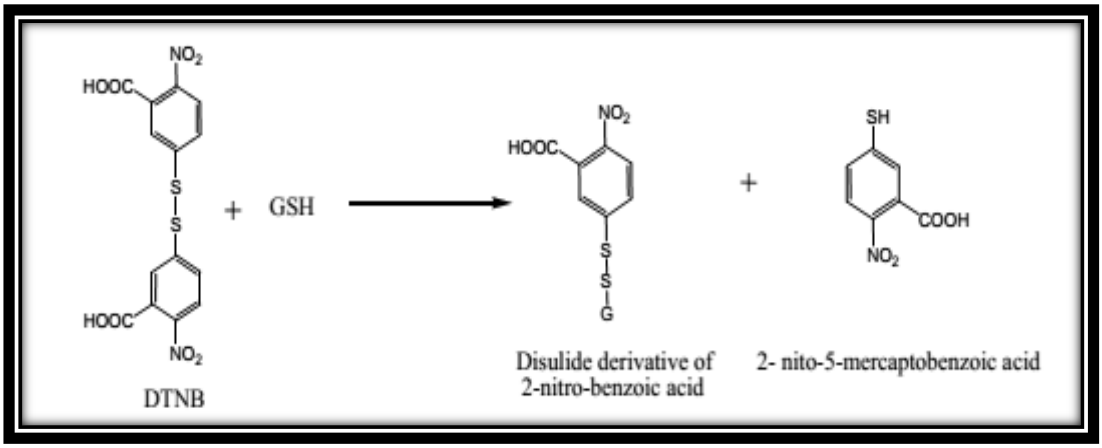


Figure 15 : principe du dosage du GSH (Sedlak et Rayond, 1967).

Ainsi, 50ul de TCA à5% sont mélangés avec 50ul d'échantillon. Le mélange est agité et laisse au froid (4c°) pendant 5 minutes ensuite, les tubes sont centrifugés 10 minutes à 2000 tours/mn.

Pour ce dosage cela 25 µL du surnageant sont diluées dans 5 ml de tampon phosphate (Na2HPO4, 0,1 M ; pH = 8). 20µl du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution, Après 15 min d'incubation nous avons effectués la lecture de la densité optique à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage. Les résultats sont exprimés en mM/mg de protéines.

IV.4.3. Evaluation de l'activité des enzymes anti-oxydantes

IV.4.3.1. Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

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

$$2O_2^{-\circ} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

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

La figure16 illustre quelques étapes de l'autoxydation du pyrogallol **(Kim et al., 1994).**

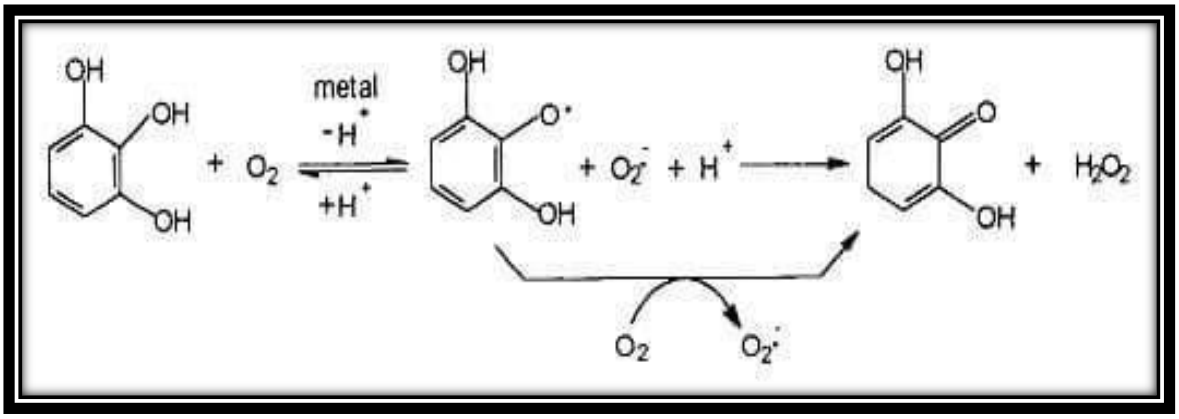


Figure 16 : Quelques étapes de l'autoxydation du pyrogallol **(Kim et al., 1994)**.

Cette autoxydation en présence d'EDTA est inhibée par la SOD jusqu'à 90% avec un pH entre (7.9 à 9.1), ce qui indique la dépendance de l'anion superoxyde dans cette autoxydation **(Kim et al., 1994).**

Pour la mesure de l'activité de la SOD, dans la cuve de mesure on met : 850µL du tampon tris HCL (50mM, PH=8.2), 15 µL de la fraction cytosolique, 100µL de l'EDTA (10mM) et ensuite 50µL de pyrogallol (2.5 mM dans HCL 10mM). La lecture de la DO est effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes.

Les résultats sont exprimés en **UI** de SOD / mg de protéines, une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'enzyme qui causerait l'inhibition de 50% de l'autoxydation du Pyrogallol.

L'activité enzymatique en terme d UI /mg de protéine selon la formule suivante :

% d'inhibition = [(DO contrôle/ΔT-DO échantillon /ΔT) /ΔT DO contrôle] *100

SOD UI/mg =%d'inhibition /n*50.

n : quantité de proteine en mg dans le volume de l'echantillon utilisée .

IV.4.3.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la catalase a été déterminée selon la méthode décrite par Clairbone (1985). Le principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de la source enzymatique à 25° C. Un mélange constitué de 1ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 0,1M,

pH=7,2), 0,950 ml du peroxyde d'hydrogène (0,019M) et 0,025 ml de la source enzymatique est préparé.

L'absorbance est mesurée à 240 nm chaque minute pendant 2mn. L'activité enzymatique est exprimée en UI /mg de protéine selon la relation suivante :

$$\textbf{UI /g de protéine= (2,3033/T. log}A_1/A_2\textbf{) / concentration des protéines}.$$

Sachant que :

A_1 : absorbance au temps 0mn.

A_2 : absorbance au temps 1mn.

T : intervalle de temps en mn

IV.5. Examen histologique du tissu cérébral

Les fragments de cerveau sont coupés en tranches fines et fixées dans le formol 10%. Un processus de déshydratation est réalisé par trempage dans des bains successivement plus concentré d'éthanol puis dans l'éthanol absolu, puis dans du xylène pour éliminer l'alcool. Ensuite dans des bains de paraffine et laissés se solidifier à froid. Après la réalisation des blocs, des coupes de 4µm d'épaisseur ont été préparé à l'aide du microtome. Les coupes obtenues sont ensuite déparaffinées par le xylène puis réhydratées dans des bains d'éthanol successivement moins concentrés, puis dans l'eau, ensuite colorées avec l'hématoxyline et l'éosine, afin de permettre la mise en évidence des noyaux (bleu pourpre) et du cytoplasme (rouge) lors de l'observation microscopique (Farias et *al*., 2014).

IV.6 .Analyse statistiques

Les résultats sont données sous forme de moyenne ± écartype. Nos résultats sont vérifiés par le test de *student* avec un seuil de signification supérieur à 95% ($p < 0.05$).

($P > 0.5$), effet non significatif ns.

($p < 0.05$), désigne effet significatif * ou #.

($p < 0.01$), désigne effet hautement significatif ** ou ##.

($p < 0.001$), désigne effet tres hautement significatif *** ou ###.

(* comparaison avec le témoin) ou (# comparaison avec le lot traité par le benzopyréne).

V.1: Etude phytochimique de la propolis

V.1.1.Teneur en polyphénols et flavonoïdes de la propolis

L'étude quantitative de l'extrait ethanolique de la propolis (EEP) au moyen du dosage par spectrophotométrie avait pour objective la détermination de la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes .deux courbes d'étalonnages (annexe I, figure1et 2) ont été tracés, la première réalisée avec l'acide gallique à différentes concentration, l'autre avec la quercétine les mesures de densité optique ont été réalisées à 760 nm pour les polyphénols et 510nm pour les flavonoïdes ,

La quantité des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans l'EPP, exprimée en mg EAG/g de propolis respectivement, est illustrée dans la figure 17.

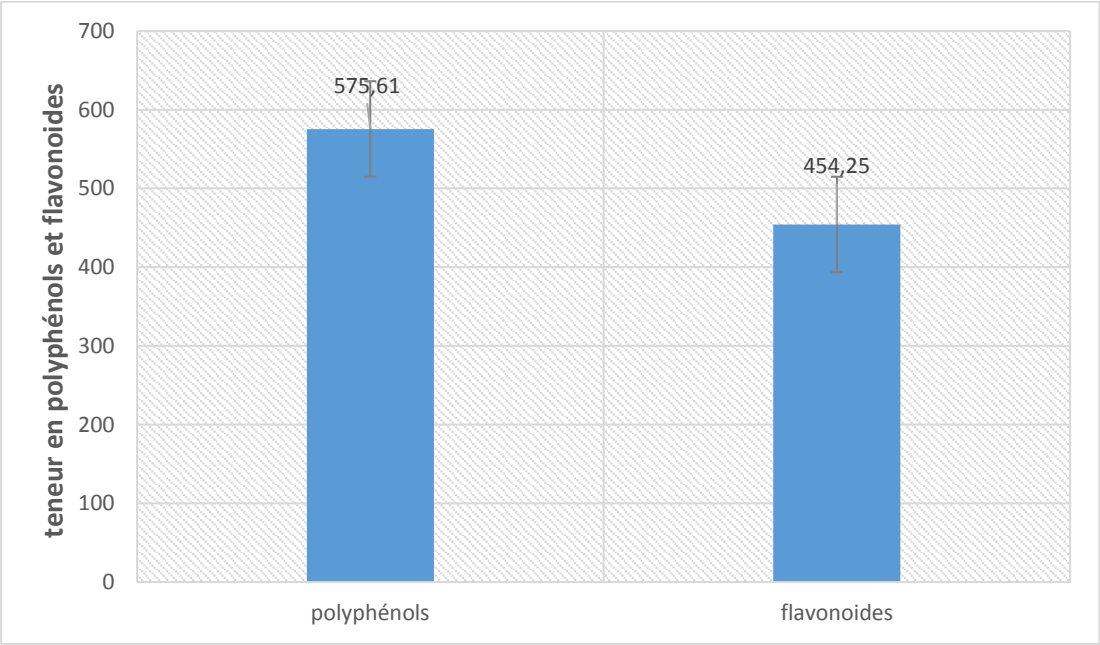


Figure17 : teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait ethanolique de la propolis en mg EAG/g de propolis et mg EQ/g de propolis.

Nos résultats montrent que la propolis de chekkfa présente un teneur élevé et riche en Polyphénols et flavonoïdes (575.61±21.45 mg EAG/g de propolis) et (454.25±2.5 mg EQuercétine /g de propolis).Les résultats de l'analyse phytochimique de la teneur en polyphénols et flavonoïdes effectuée Sur l'extrait éthanolique de la propolis(EEP) ont montré la présence des phénols et Flavonoïdes. Les composés phénoliques sont bien connus comme des agents antioxydants et dirigé contre les radicaux libres associés aux dommages oxydatifs.

Cette différence dans les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dépend essentiellement de l'origine de la propolis, la saison de la récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les conditions de conservation et les espèces d'abeilles.

D'autre part une corrélation positive a été détectée entre la teneur en flavonoïdes de la propolis et son activité antioxydant. Cette activité antioxydant est due à la présence de certains éléments dans la structure flavonoïde, tels que la présence d'une double liaison entre C-2 et C-3 dans le cycle B et la présence de groupes hydroxyle hautement réactifs (3 'et 4'- dihydroxy) dans le cycle, capable de donner un électron et de l'hydrogène à ROS ; ainsi, en interrompant la réaction de propagation des radicaux libres conduisant à la peroxydation des lipides (LPO) (Kurek-Górecka et al., 2014).

Par conséquent, la concentration de ces phénols et flavonoïdes peut contribuer de manière synergique dans le pouvoir antioxydant important de propolis et peut ainsi soutenir l'usage local pour le traitement des maladies liées par des radicaux libres (Awoyinka *et al*., 2007) ainsi que la composition chimique de la propolis varie essentiellement avec la région de collection et par conséquent l'activité biologique (Lahouel *et al*., 2010).

Plusieurs études ont montré l'effet préventif de la propolis de chakfa contre le stress oxydant induit par plusieurs substance (Alayne *et al*., 2008 ; Lahouel *et al*., 2010**)**. La teneur élevée de la propolis de chakfa et sa richesse en flavonoïdes et en polyphénols comme : chalcone, la galangine, la tectochrysine (boutabet *et al*., 2011) est responsable de ses propriétés antioxydants et à sa capacité à piéger les radicaux libres et à protéger les membranes contre les dommages de la peroxydation lipidique. L'effet protecteur de la propolis peut être alors le résultat de ses propriétés antioxydants ainsi qu'à la capacité de la molécule à piéger les radicaux libres.

V.2. Evaluation du stress oxydant cérébrale

V.2.1. Variation des taux du malonyldialdéhyde cytosolique (MDA)

Il existent de nombreux marqueurs pour l'evaluation de la peroxydation lipidique dont le malon dialdéhyde (MDA) qui est sans doute le plus connu et le plus utilisée (Guichardant et al.,2006).la quantification de taux de ce derniers est generalement accéptée comme ndicateur du stress oxydatif resultant d'une surproduction de ROS et de la diminution des defenses antioxydants (servais, 2004).

Le test le plus largement utilisé pour la peroxydation des lipides est La MDA, qui est considérée comme un indice de peroxydation lipidique, et est produite au cours du stress oxydatif, (Singletary et al., 2004).

Les variations des taux du MDA cytosolique cérébrale après injection intrapéritonéal de Benz (a) pyrène (100mg/kg) seul, en association avec l'EEP (25mg/kg) sont illustrées dans la figure (18).

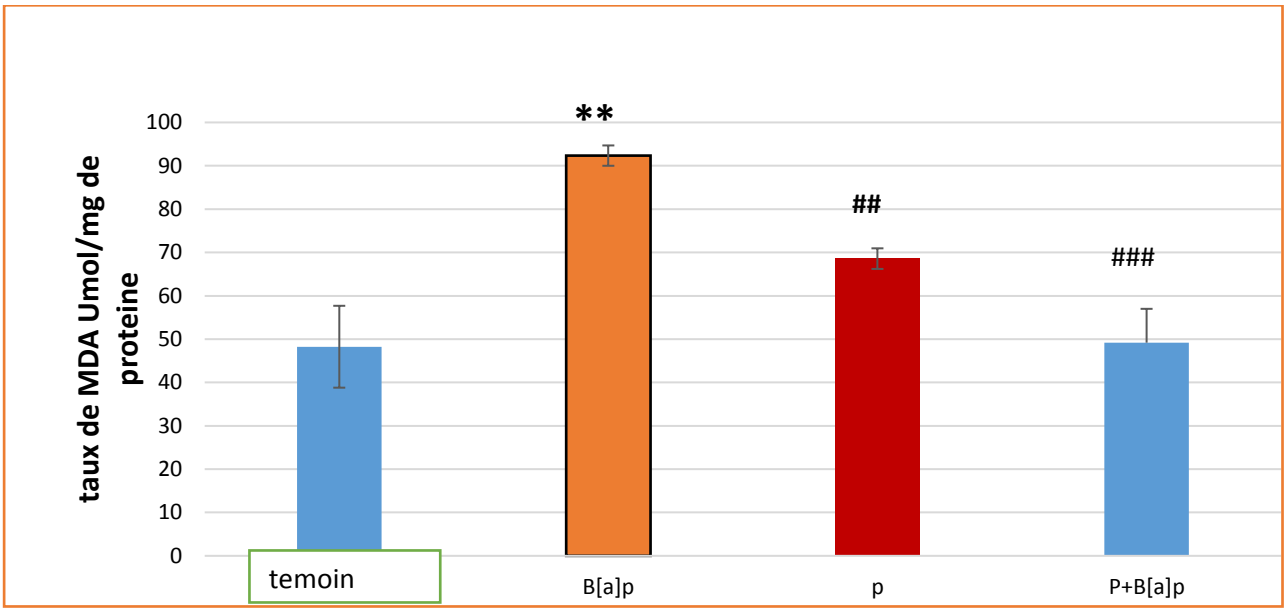


Figure 18 : Variations des taux du MDA cytosolique cérébrale après traitement par le benzopyrène absolu seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours à 25mg/kg.

(* : Significative relatif au témoin, ** : hautement significative, *** : très hautement significative, # : significative relatif au benzopyrène, ## : hautement significative, ### : très hautement significative).

Nos résultats montrent une augmentation hautement significative (P<0.01) du taux de MDA chez les souris traitées par le B [a]P seule par rapport aux souris témoins (92.351±2.34 contre 48.24 ± 9.44Umol /mg de protéine). Concernant les souris traitée par l'EEP, on constate une diminution très hautement Significative (P<0.001) par rapport aux souris traités par le B(a)P seule (49.18±7.80 contre 92.35±2.34 Umol /mg de protéine).et on observe aussi dans le groupe traitée par l'EEP une diminution hautement significative par rapport au B(a)P L'augmentation du taux de MDA conduit à une augmentation des effets délétères des B(a)p, une richesse en lipide , une production excessive de radicaux libres et à l'inhibition des enzymes de piégeage des radicaux libres. Les produits de la peroxydation lipidique comprennent le Malon dialdéhyde, qui interagit avec diverses molécules conduisant à un stress oxydatif et qui serait impliqué dans la formation de tumeurs (Ramakrishnan et al., 2007).

La Peroxydation lipidique, accrue des tissus cérébraux des groupes traitée par le B(a)P ,et pourrait être une conséquence de la formation accrue de radicaux libres, et cette peroxydation peut également être attribuée à un statut antioxydant altéré après l'administration de B (a) P (Madrigal et al ., 2003). La peroxydation lipidique a été démontrée comme une conséquence majeure du

stress oxydatif et joue un rôle critique dans les dommages neuronaux et les maladies neurodégénératives.

Les données expérimentales ont démontré que le B (a) P traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et induit une toxicité neurocomportementale aiguë par le biais du stress oxydatif (Murawska-Cia1owicz et al., 2011).

Cette diminution de taux de MDA chez les souris prétraitée par l'EEP, est due à l'effet scavenger des polyphénols de la propolis qui a la capacité de réduire le taux de ROS et d'augmenter les capacités anti-oxydantes tissulaires .et à la présence de flavonoïdes en peut contribuer à cet effet, car ils sont révélés d'être un potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique (Siegers et Younes. 1981).

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par (Yildiz et al., 2008 ; Kasala et al., 2016) qui ont démontré les effets protecteurs des polyphénols contenus dans la propolis, tels que la Chrysine et le CAPE, contre les dommages oxydatifs dans le cerveau des souris, Ces résultats sont en accord selon lesquels la concentration en MDA était inhibée dans le groupe traité avec EEP ajouté , après le traitement par B (a) P, est confirmait que l'activité antioxydant piégeant les radicaux libres par l' EEP pour réduire les effets délétères de B (a) P. En ce qui concerne les effets de la propolis sur le système nerveux, des preuves montrant que la propolis et / ou ses composants sont neuroprotecteurs contre diverses agressions cérébrales *in vivo* ou des lésions neuronales. (Bankova, 2005 ; Izuta et al., 2008 ; Kasaï et al., 2011).

Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona et al ., 2000). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une diminution de la fluidité, et la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong et al., 2006).

V .2.2 .Variation du taux de glutathion cérébrale

Le glutathion est un antioxydant non enzymatique, constitue la première ligne de défense (Ré et al., 2005). Il possédé une forte capacité de donner les électrons en se liant sur son groupe SH aux métabolites toxique (Aouacheri et al., 2009).

le glutathion, et un des cofacteurs des voies de détoxification et de régulation du potentiel redox, ainsi que l'augmentation des activités des enzymes antioxydants, ce qui permet de réduire l'effet néfaste des ROS (Oršolić et al., 2013).

Les variations des taux du GSH cytosolique cérébrale chez des souris traitée par le B(a)p 100mg/kg), et la propolis (25mg/kg ou en cas de prétraitement par le B(a)p +P pendant 7 jours sont présentées dans la figure 19ci-dessous.

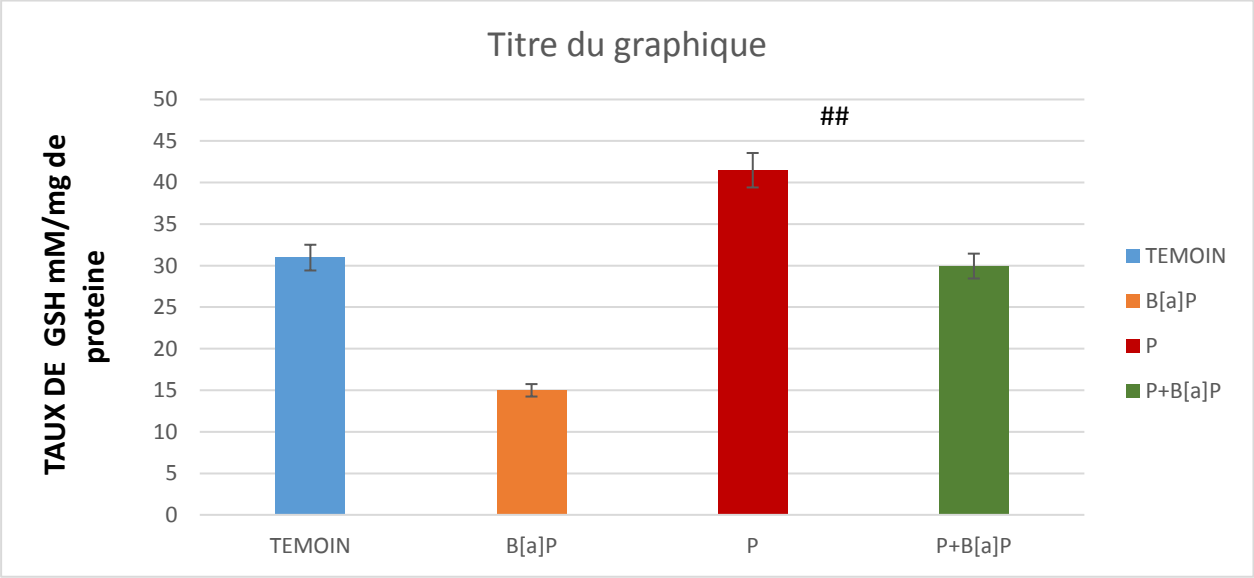


Figure 19 : Variations des taux du GSH cytosolique cérébrale après traitement par le benzopyrène absolu seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours à 25mg/kg.
(* : Significative relatif au témoin, ** : hautement significative, *** : très hautement significative, # : Significative relatif au benzopyréne, ## : hautement significative, ### : très hautement significative).

D'après nos résultats, on observe que l'administration de B(a)P provoque un appauvrissement significative ($p < 0,05$) des taux de GSH (14.99±4.80 mM/ mg de protéine) Par rapport au groupe témoin (30.96 ±15.40 Mm/mg de protéine). Alors que le taux de GSH augmente de façon significative ($p \leq 0.05$) chez les souris prétraitées par l'EEP et en associant avec le B(a)p (29.94±6.19Mm/mg de protéine).

La diminution de GSH dans le groupe B(a)p dépend à la production importante de ROS, ce statut consomme et par conséquent modifie les niveaux d'enzymes antioxydants. Cependant, le degré de diminution de la concentration de GSH est différent entre les tissus cérébraux. Ce résultat pourrait être lié aux activités de la γ glutamyl cystéine synthétase, et la glutathion synthétase, qui servent toutes deux à synthétiser le GSH (Mendoza. et al., 2005).

Le système de défense antioxydant dans le cerveau peut être insuffisant pour assurer une protection complète et améliore donc les processus de peroxydation lipidique provoquée par L'administration de [B (a) P] les enzymes GSH sont beaucoup plus faibles dans le système nerveux central que les érythrocytes et les tissus périphériques (Husain et al., 1996).

Dans le groupe traitée par B(a)P +P, et avec le prétraitement des souris par l'EEP à (25mg/kg) on observe une augmentation du taux de GSH dans le cerveau par rapport au groupe traitée par le B(a)P, que montré que la propolis augmentait les groupes sulfidryles, probablement par ses composés phénoliques qui sont capables de capter les radicaux ainsi La propolis peut être un agent thérapeutique et préventif naturel potentiel contre les dommages causés par le B(a)p (Ramanathan et al., 2003), elle a des propriétés antioxydants. Les principales classes chimiques présentes dans la propolis sont les flavonoïdes et les phénoliques. Les bios flavonoïdes sont des molécules antioxydants qui jouent un rôle important dans le piégeage des radicaux libres, produits par les maladies neurodégénératives.

V .2.3. Variation de l'activité enzymatique de la Superoxyde dismutase cérébrale

Le stress oxydatif dans le cerveau peut être lié à une altération de l'apprentissage et de la mémoire. (Cini et al., 1994).

Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques cytosolique figurent en première ligne la superoxyde dismutase **(**SOD**)**. Le O2-°première espèce toxique formé à partir De l'oxygène, est éliminé ou au moins maintenu à un niveau de concentration assez bas par la SOD qui catalyse sa disparition par dismutation. Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé est dismuté en oxygène et en eau par la catalase (Andreyev *et* al., 2005).

La SOD est essentiellement une enzyme protectrice qui élimine les ions superoxydes produits sous la forme de sous-produits cellulaires pendant le stress oxydatif (Pushpakiran .,et al 2004). Son activité réduite peut entraîner des effets indésirables, car les anions superoxydes sont extrêmement toxiques et peuvent s'accumuler dans le corps.la détermination du statut antioxydant enzymatique dans le cadre de notre étude comprend la mesure de l'activité de SOD, qui est une sorte d'enzyme antioxydant endogène, peut éliminer les radicaux libres et avoir un effet protecteur sur les cellules (Leadon et al., 1988).

Les variations de l'activité enzymatique de SOD cytosolique cérébrale chez des souris traitée par le B(a)p 100mg/kg), et la propolis (25mg/kg ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours sont présentées dans la figure 20 ci-dessous :

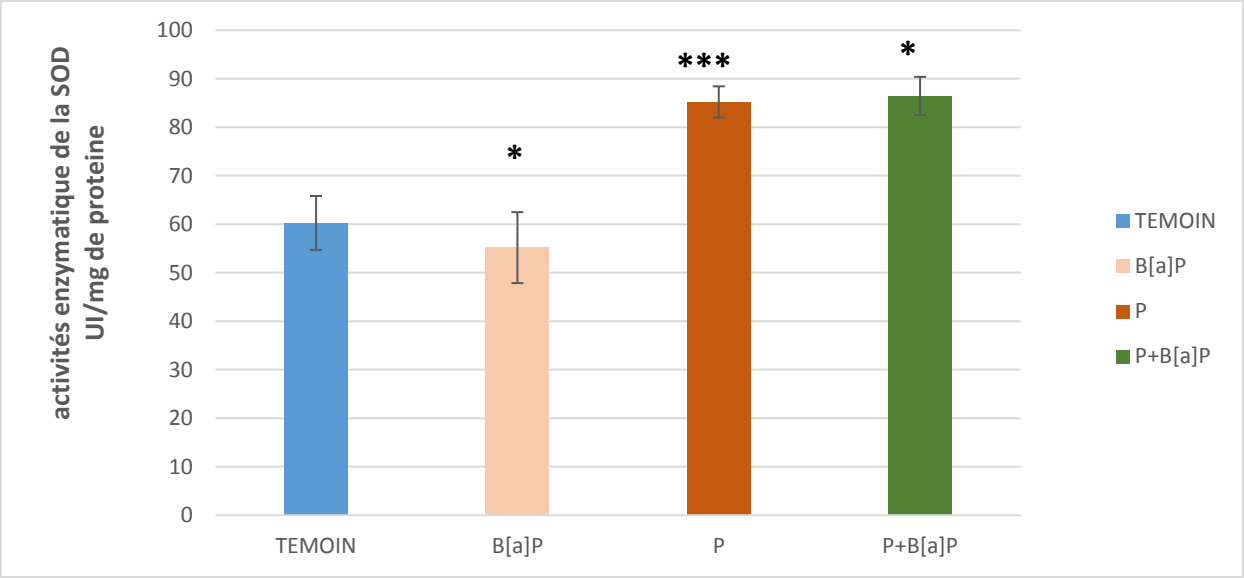


Figure 20: Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu cérébrale, après un traitement par le B(a)p seul (100mg/kg), en cas de prétraitement par la propolis (25mg/kg) seul et en cas de la combinaison propolis + B(a)P.

(* : Significative relatif au témoin, ** : hautement significative, *** : très hautement significative, # : significative relatif au benzopyrène, ## : hautement significative, ### : très hautement significative).

Selon la figure22 on constate que l'administration de l'EEP chez les souris entraine une augmentation très hautement significative ($p<0.001$) avec un taux (85.22±3.20 UI/mg de protéine) par rapport au groupe témoin avec un taux (60.265 ±9.63 UI/mg de protéine).et par conséquent on observe dans le groupe traitée par le B (a)P une diminution significative ($p<0.05$)de l'activité Enzymatique de la SOD a un taux bas de (55.30.30 ±4.5 UI/mg de protéine) par rapport au Groupe témoin (60.26±5.63UI/mg de protéine), Et pour le groupe prétraité par le B (a)P+P, on observe une augmentation bien claire du taux de la SOD de maniéré significative ($p<0.05$) arrivant à (86.44± 3.94 UI/ mg de protéine) Par rapport au groupe de B(a)P (74.30± 4.5 UI/mg de protéine). Ces résultats montrent l'évaluation de diminution des niveaux d'activité de SOD du cerveau dans Le groupe traité par le B (a)p, et les niveaux variables d'activité de SOD évaluées dans le tissu pourrait être lié au taux de réparation des dommages causés à l'ADN et la production des radicaux libres dans ce travail ont été rapportée que les activités de SOD dans le cerveau des souris étaient inversement associées à l'augmentation des dommages oxydative de l'ADN et des protéines, et la diminution de l'activité de SOD pourrait être causée par l'accumulation de radicale Super oxyde et H2O2, ce qui entrainerait la consommation de la SOD (Kim et Lee 1997).Et l'augmentation de la SOD chez les souris par l'EEP montre que la propolis a inversé de manière significative tous les changements induits par le B(a)P, de nombreux rapport indiquent que la propolis et ses composants phénoliques sont des protecteurs de la mort neuronal au moins en partie par la

médiation de leurs activités antioxydants .Les flavonoïdes contenus dans la propolis augmentent l'activité de la SOD et représentent potentiellement la capacité de mort cellulaire neuronale. En ce qui concerne les effets de la propolis sur le système nerveux des preuves montrant que la propolis et / ou ses composants sont neuroprotecteurs contre diverses agressions cérébrales in vivo ou que des lésions neuronales in vitro se sont accumulées rapidement. Par exemple, le CAPE et les composants hydrosolubles de la propolis sont des neuroprotecteurs contre les lésions excitotoxiques lors de lésions d'ischémie reperfusion(Bankova,2005).

Dans cette étude, l'augmentation de la MDA et la diminution de la SOD dans le groupe exposé au B (a) P (100 mg / kg) suggéré que le B (a) P induit une toxicité neurocomportementale en augmentant le niveau de MDA et en inhibant l'activité de la SOD. Il peut avoir un lien avec l'inhibition d'antioxydant scavenging system (Saunders et al., 2006).

V.2.4. Variation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique cérebrale

La catalase est l'un des antioxydants enzymatiques et éléments qui permettent le maintien de l'état normal dans la cellule, elle agit en synergie avec la **SOD** puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en H2O et en O2 moléculaire (Marfak, 2003). Elle joue un rôle important dans la protection contre les effets délétères de la peroxydation lipidique, des **ROS** et des radicaux hydroxyles suite l'administration des anthracyclines (Vardi et al., 2010).

Les variations de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique cérébrale chez des souris traitée par le B(a)p 100mg/kg), et la propolis (25mg/kg ou en cas de prétraitement par le B(a)p +P pendant 7 jours sont présentées dans la figure 21 ci-dessous

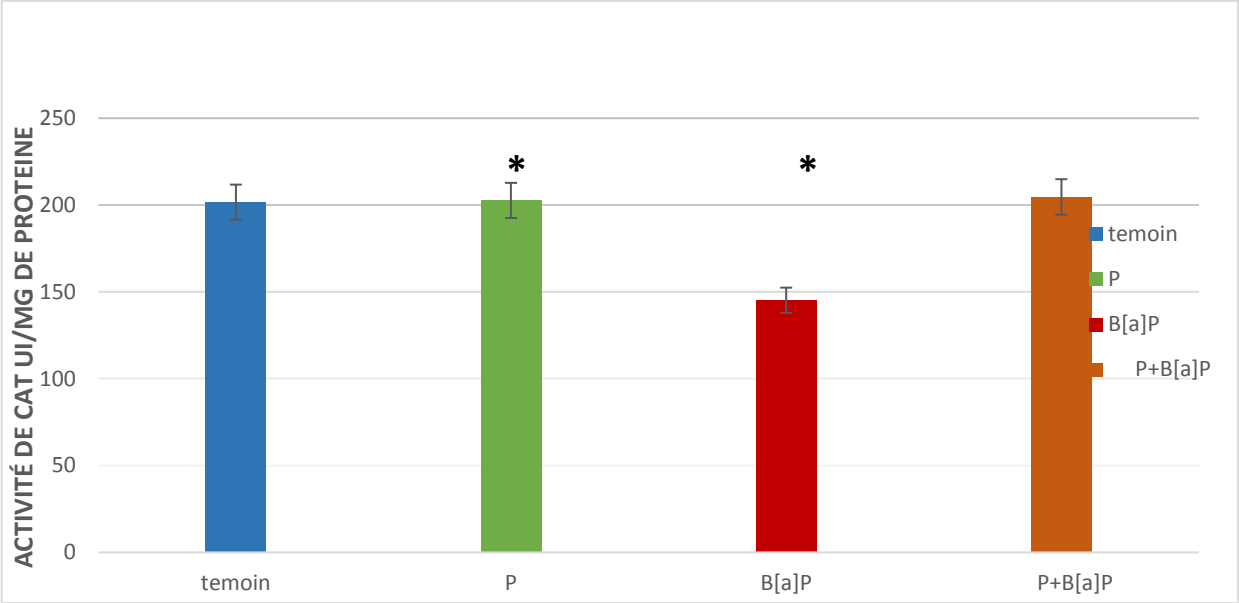


Figure21 : Variation de l'activité enzymatique de la CAT dans le tissu cerébrale, après un traitement par le B(a)p seul (100mg/kg), en cas de prétraitement par la propolis (25mg/kg) seul et en cas de la combinaison propolis + B(a)P.

(* : Significative relatif au témoin, ** : hautement significative, *** : très hautement significative, # : Significative relatif au benzopyréne, ## : hautement significative, ### : très hautement significative).

Les mêmes constations ont été enregistrée pour l'effet du B(a)P sur l'activité de la catalase à celle de la SOD Concernant la CAT, nos résultats (figure23) montrent une inhibition de l'activité catalasique Chez les souris traitée par le B (a)P (145.18± 7.33UI/mg de protéine).par rapport au groupe Témoin (201.68±16.164UI /mg de protéine), cependant cette diminution est significative .ceci Expliquerait par une faible production de ROS, Ces données suggèrent fortement que le B (a)P et les HAP associés peuvent provoquer des altérations de la fonction du système nerveux (Das et al., 1985).

Selon les résultats on constate que l'administration des souris traitée par l'EEP entraine une augmentation significative de la CAT (202.65±26.4 UI/mg de protéine) par rapport au groupe témoin (201.68±16.164UI /mg de protéine). Dans le groupe de souris traités par la B(a)P + propolis, l'augmentation de taux de la CAT été bien claire arrivant à (204,658 ± 7.33 UI/mg de protéine) par rapport au groupe de B(a)P de 145.1844 ± 7.331 UI/mg de protéines). La propolis a inversé de manière significative tous les changements induits par le B(a)P grâce aux flavonoïdes qui constituent d'importants composants de la propolis et qui peuvent montrer une augmentation de l'activité CAT dans le cerveau d'animaux d'expérience (Kasaï et al., 2011), et par conséquent

La catalase est l'un des antioxydants enzymatiques, elle existe en forte concentration dans le cerveau. elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en H2O et en O2 moléculaire (Marfak, 2003). La diminution significative des activités enzymatiques de la catalase et la superoxyde dismutase. chez les animaux traités par le B(a)p peut être due à la production excessive de H2O2 au cours du métabolisme par les HAP.

V .3. Etude histologique microscopique

Les figures ci-dessous montrent les résultats de l'étude histologique microscopique de tissus cérébrale. Après traitement par le B(a) p par voie intra-péritonéale à une dose de 100 mg/kg et le traitement préventif par l'EEP à une dose de 25 mg/kg par voie oral pendant 5 jours, le jour du sacrifice, nous avons préparé les coupes histologiques visualisés par microscope optique après coloration hématoxyline/éosine, des modifications histologiques induites au niveau du cerveau.

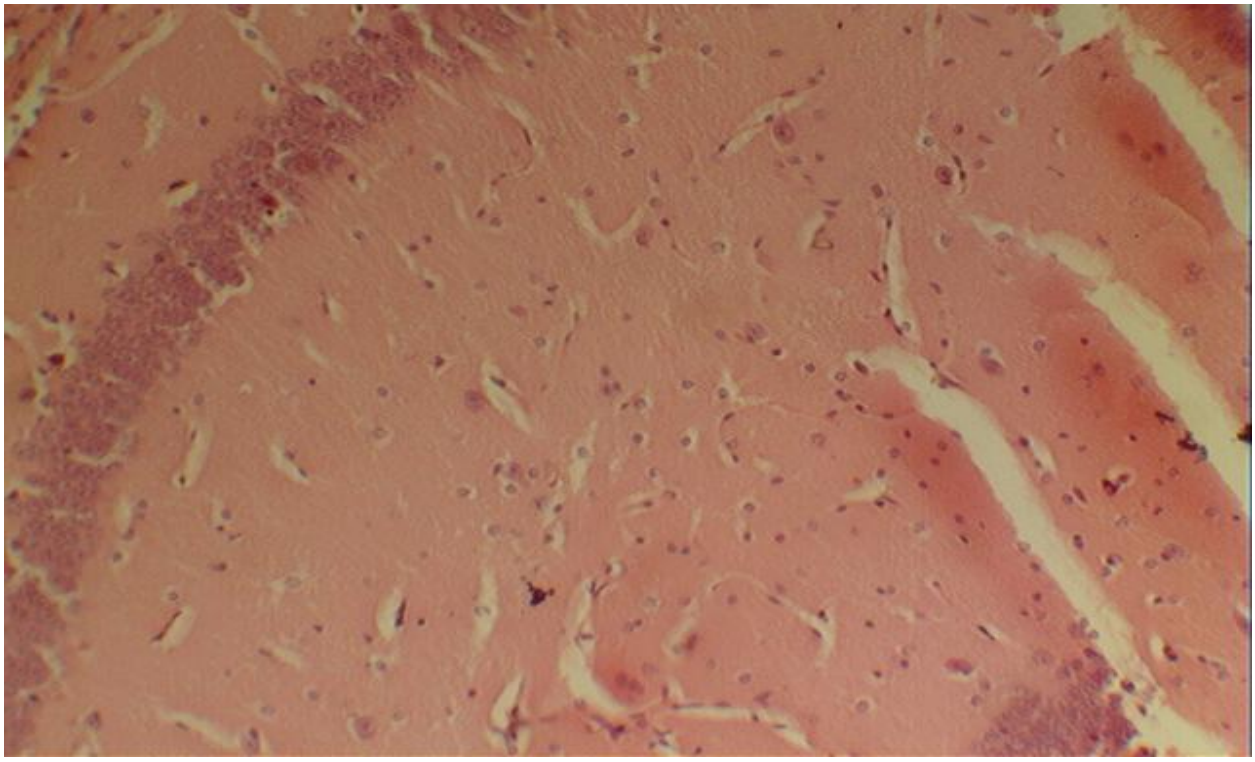


Figure.22 Coupe histologique du cerveau de souris vue au microscope optique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E) dans le groupe témoin (10x10).

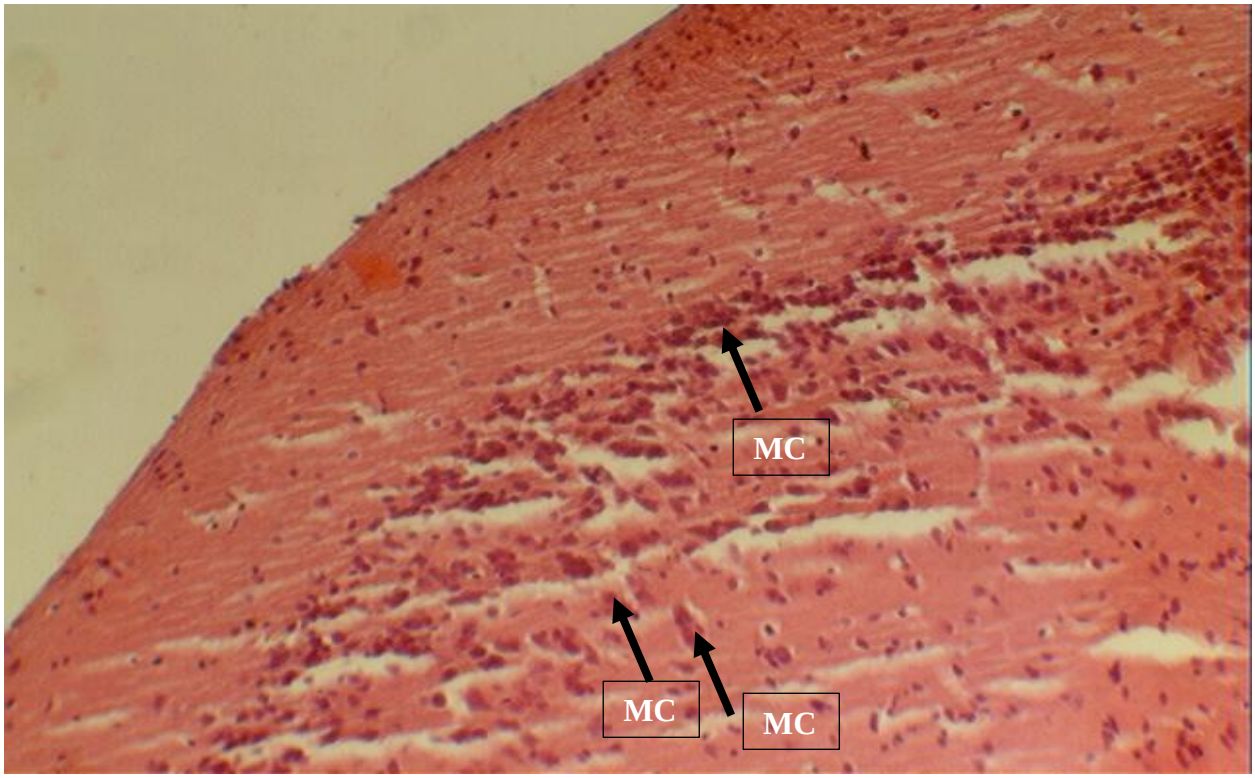


Figure.23 Coupe histologique du cerveau de souris vue au microscope optique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E) dans le groupe traitée par B(a)p (10 x10).

MC : mort cellulaire

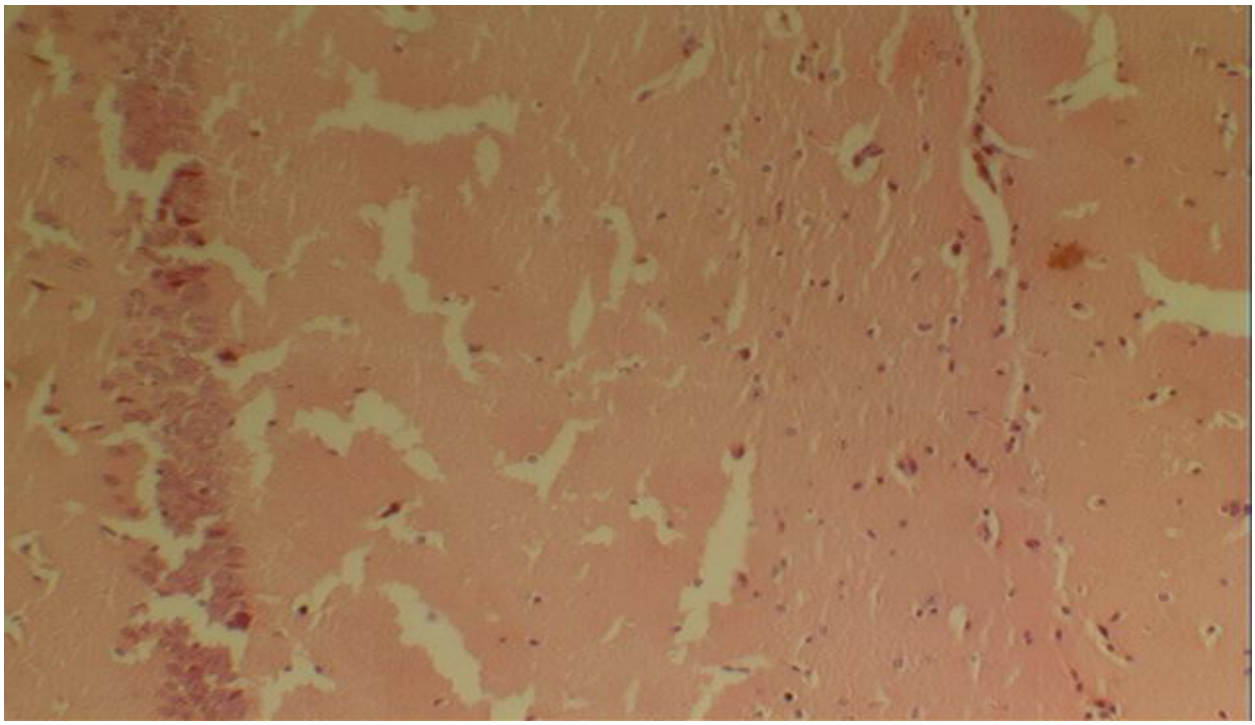


Figure.24 Coupe histologique du cerveau de souris vue au microscope optique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E) dans le groupe traitée par (EEP +B(a)p) (10 x10).

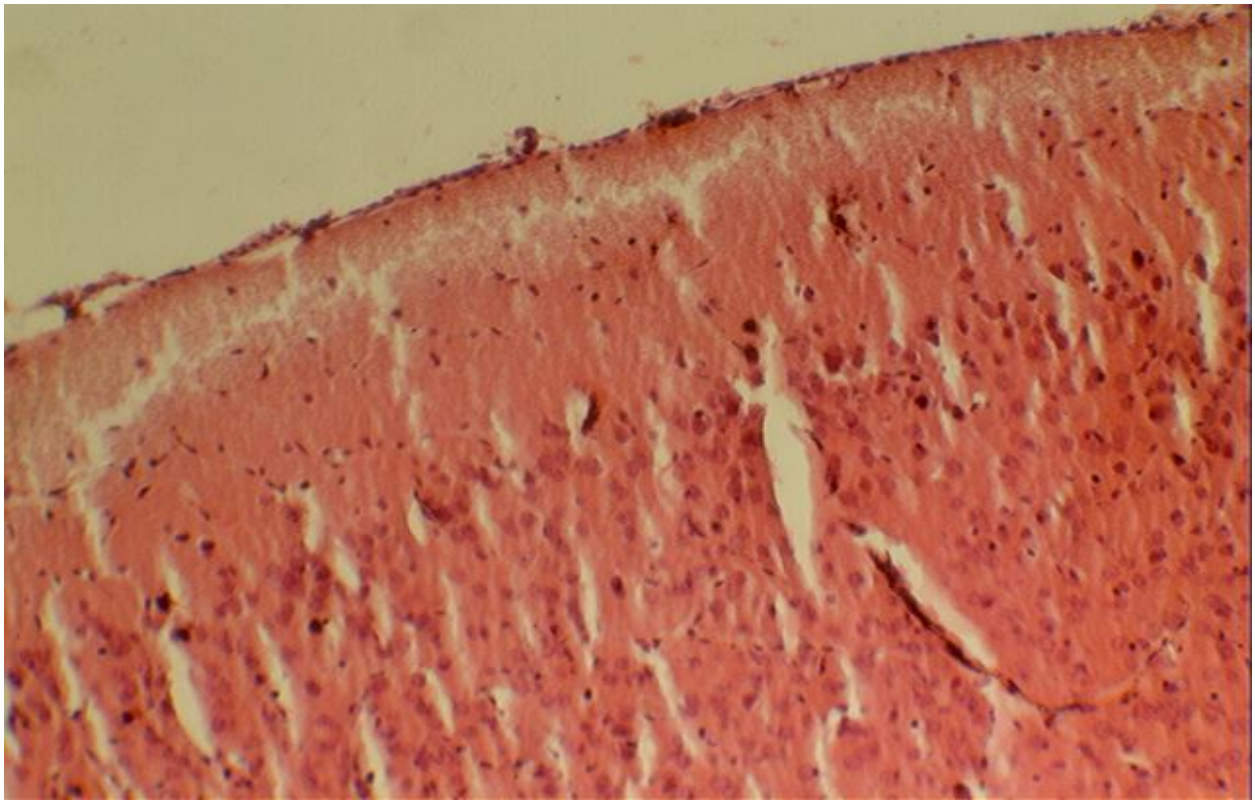


Figure.25 Coupe histologique du cerveau de souris vue au microscope optique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H & E) dans le groupe traitée par (EEP) (10 x10).

Chez le témoin, nous avons observé la région de l'hippocampe du cerveau présente une architecture condensée (figure 22). Le rôle de l'hippocampe est essentiel pour la formation de l'apprentissage et de la mémoire (Patri et al., 2013; Chengzhi et al., 2011).
Et nous avons montré que l'analyse histopathologique révèle que l'exposition aiguë au benzo(a)pyrène chez les souris traités avec une dose de 100 mg/kg par voie intra-péritonéale, Le B (a) P pouvait favoriser une perturbation dans l'hippocampe du cerveau. Les lésions histopathologiques ont montré un léger phénomène de mort cellulaire dans l'hippocampe du cerveau induit par B(a)P. Les flèches en noir (figure 23) indiquent un début de mort cellulaire des neurones endommagés. Cela peut être dû au fait que B (a) P traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et provoque une neurotoxicité (Saunders et al., 2006; Lee et al., 2005).
Nous avons observé la région de l'hippocampe du cerveau présente une architecture condensée (figure 24). Nous avons observé que l'architecture cérébrale (l'hippocampe) est semblable au témoin. EEP à la dose de 25mg/kg a un effet neuroprotecteur au cours d'un prétraitement (figure 24).

Chez le groupe traité par EEP seul (figure 25), nous avons observé que l architecture cérébrale est semblable a seule du témoin, la propolis exerce des effets neuroprotecteur contre la neurotoxicité induite par le B(a)P.

L’étude histologique confirme les résultats biochimiques du stress oxydant cytosolique mésuré lors de la neurotoxicité aigue du B (a) P et l’effet préventif de la propolis.

Notre étude a démontré que le stress oxydatif dans le SNC dû à la génération d'espèces réactives de l'oxygène et à la répression des antioxydants peut être un mécanisme essentiel dans les effets comportementaux aigus induits par le B(a)P chez la souris.

La propolis possédée des activités antioxydantes importantes due à sa richesse en flavonoïdes. Notre étude avait comme un objectif d'évaluation de l'effet neuro-protecteur de l'extrait éthanolique de la propolis de Jijel contre la neurotoxicité aigüe du benzo(a)pyrène chez la souris. Les résultats obtenus dans notre études établie a permet de montrer que : La propolis de Jijel de la région de Chekfa est riche en polyphénol et en flavonoïdes.

Le B(a)P à la dose de 100mg/kg a un effet pro-oxydant au niveau du cerveau, exprimé par l'augmentation de la peroxydation lipidique et l'activité des enzymes anti-oxydantes SOD et CAT et une déplétion en glutathion (GSH). Ceci est confirmé par l'apparition des modifications tissulaires sévères.

EEP a la dose de 25mg/kg a un effet neuroprotecteur au cours d'un prétraitement, exprimé par un renforcement des anti-oxydantes enzymatique SOD et CAT et non enzymatique glutathion(GSH) et la protection des membranes contre la peroxydation lipidique.

Cette étude reste préliminaire. Il serait souhaitable de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres du statut antioxydant/pro-oxydant, elle nécessite d'autres études à l'échelle moléculaire pour développer le mécanisme neurotoxique du B(a)P et mieux connaître le mécanisme neuro-protecteur des polyphénols de la propolis.

Alencar, S. M., Oldoni, T. L. C., Castro, M. L., Cabral, I. S. R., Costa-Neto, C. M., Cury, J. A., ... & Ikegaki, M. (2007). Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of ethnopharmacology*, *113*(2), 278-283.

Alyane M, Benguedouar L, Kebsa W, Boussenane HN, Rouibah H, Lahouel M.(2008) Cardioprotective effects and mechanism of action of Polyphenols extracted from Propolis against Doxorubicin toxicity. *Pak J Pharm Sci*, 21:201-9.

Anderson, T. J. (1997). Oxidative stress, endothelial function and coronary atherosclerosis. *Cardiologia (Rome, Italy)*, *42*(7), 701-714.

Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)*, *70*(2), 200-214.

Annabi, B., Vaillancourt-Jean, E., Weil, AG et Beliveau, R. (2010). Le ciblage pharmacologique des fonctions des récepteurs β-adrénergiques annule la signalisation du NF-κB et la sécrétion de MMP-9 dans les cellules de médulloblastome. *3* , 219.

Aouacheri, W., Saka, S., Djafer, R., & Lefranc, G. (2009, November). Effet protecteur du diclofénac contre le stress oxydatif induit par la toxicité du paracétamol chez le rat. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 67, No. 6, pp. 619-627).

Arain, S., Miyazaki, S., Iwamoto, T., Takasaki, M., Tomoda, A. (2004**).** Metabolism of

autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European.*

Awoyinka T, Huang Z, Jiang S.(2007). Apoptose dans l'hypertrophie cardiaque induite par la surcharge de pression est médiée, en partie, par adénine nucléotide translocator-1. *Science et analyse clinique de laboratory*.; 36 (1): 88-95.

Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. Evid.-Based Compl Alt, 2, 29−32.

Benguedouar L, Lahouel M, C Gangloff S, Durlach A, Grange F, BernardP, and Antonicelli F. (2016). Ethanolic extract of Algerian propolis and galangin decreased murine melanoma T. *Anti-Cancer Agents in Med.Chem*. 16(9):1172-1183.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, *5*(1), 9.

Bollinger, CE, McCallister, M., Clark, R., Rhoades, R., Maguire, M., Savage, RE, ... et Hood, DB (2015**)**. Hydrocarbures aromatiques polycycliques: implications pour la neurotoxicité développementale, moléculaire et comportementale. Dans le *Manuel de toxicologie des agents de guerre chimique* (p. 249-265). Presse académique.

Boström, CE, Gerde, P., Hanberg, A., B. Jernström, C., Johansson, C., Kyrklund, T., & Westerholm, R. (2002). Évaluation du risque de cancer, indicateurs et lignes directrices pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'air ambiant. *Environmental health perspectives* , *110*(suppl. 3), 451-488.

Boutabet K, Banskota AH, Tezuka Y, et al.(2011). Liquid analyse de la propolis spectrométrie chromatographie masse. *Analyse phytochimique*., ; 12 (6) : 366-373.

Boutabet, K., Kebsa, W., Alyane, M., & Lahouel, M. (2011**)**. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian journal of nephrology*, *21*(2), 101.

Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E., Katsarov, N., ... & Krastev, Z. (2005**).** Activity of Bulgarian propolis against 94 Helicobacter pylori strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of medical microbiology*, *54*(5), 481-483.

Bradford, M. (1976**).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic. biochemy*. *J.* 72(1-2): 248-254.

Bareau, G. (2006**).** *Deux phyto-estrogènes, le resvératrol et la quercétine, réduisent la mort neuronale induite par le stress oxydatif et l'inflammation* (Doctoral dissertation, Université du Québec à Trois-Rivières).

Cardinault, N., Cayeux, M. O., & du Sert, P. P. (2012**).** La propolis: origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*, *10*(5), 298-304.

Castaldo, S., & Capasso, F. (2002**)**. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, *73*, S1-S6.

Chen, H.J., Chung, F.L.(1996). Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chem Res Toxicol* 9, 306-12.

Chepelev, N. L., Moffat, I. D., Bowers, W. J., & Yauk, C. L. (2015). Neurotoxicity may be an overlooked consequence of benzo [a] pyrene exposure that is relevant to human health risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, *764*, 64-89.

Chung, T. W., Moon, S. K., Chang, Y. C., Ko, J. H., Lee, Y. C., Cho, G., ... & Kim, C. H. (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal*, *18*(14), 1670-1681.

Cini, M., Fariello, R. G., Bianchetti, A., & Moretti, A. (1994**).** Studies on lipid peroxidation in the rat brain. *Neurochemical research*, *19*(3), 283-288.

Clairborne A.(1985) Catalase activity. In Greenwald R.A.(Ed). CRC handbook of methods for oxygen radical *research.CRC Press, Boca Raton, FI.*, pp:283-284.

Cuzzolin, L., Zaffani, S., & Benoni, G. (2006). Safety implications regarding use of phytomedicines. *European journal of clinical pharmacology*, *62*(1), 37-42.

Das, S. P., Mazenko, G. F., Ramaswamy, S., & Toner, J. J. (1985). Hydrodynamic theory of the glass transition. *Physical review letters*, *54*(2), 118.

da Silveira CCS. de M., Fernandes LMP., Silva ML., Luz DA., Gomes AQ., Monteiro MC., Machado CS., Torres YR., de Lira TO., Ferreira AG., Fontes-Júnior EA. and Maia CSF. (2016**).** Neurobehavioral and Antioxydant Effects of Ethanolic Extract of Yellow Propolis. Oxid Med Cell Longev.; 2016: 2906953.

De Mendonça I.C.G, Parolia A, Barreto F.S, Mousinho K.C et *al.* (2015). Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.15: 1-12.

Demir S., Aliyazicioglu Y., Turan I., et al.(2016). Antiproliferative and pro-apoptotic activity of Turkish propolis on the human lung cancer cell line. *Nutrition and cancer*. 68 (1): 165-172.

Desport, J. C., & Couratier, P. (2002**).** Oxidative stress and neurodegenerative diseases. *Clinical nutrition and metabolism*, 16(4), 253-259.

Dewanto V , Wu X, Adon K, Liu R.H.(2002**).** Thernal proccessing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxydant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(10), 3010-3014.

Durand, D., Damon, M., & Gobert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente: principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, *48*(5), 218-224.

Dutta, K., Ghosh, D., Nazmi, A., Kumawat, K. L., & Basu, A. (2010). A common carcinogen benzo [a] pyrene causes neuronal death in mouse via microglial activation. *PLoS One*, *5*(4), e9984.

Echtay, K. S., Esteves, T. C., Pakay, J. L., Jekabsons, M. B., Lambert, A. J., Portero-Otín, M., ... & Brand, M. D. (2003**)**. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *The EMBO journal*, *22*(16), 4103-4110.

Ellman C.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem.Biophys. 82*: 70-77.

Faraci, F. M., & Didion, S. P. (2004**)**. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *24*(8), 1367-1373.

Farooqui, T., & A Farooqui, A. (2010). Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. *Current Nutrition & Food Science*, *6*(3), 186-199.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*. P. 108-115.

Fedorova A M, Kuleva N, Hoffaman.R.(2009**).** Reversible and irreversible modifications of skeletal muscle proteins in a rat model of acute oxidative stress. *BBA – Mol. Basis Dis.*, 2009, 1792, 1185-1193.

Fernandes Júnior, A., Balestrin, E. C., Betoni, J. E. C., Orsi, R. D. O., Cunha, M. D. L. R. D., & Montelli, A. C. (2005**).** Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *100*(5), 563-566.

Fontanilla, C. V., Ma, Z., Wei, X., Klotsche, J., Zhao, L., Wisniowski, P., ... & Du, Y. (2011**).** Caffeic acid phenethyl ester prevents 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration. *Neuroscience*, *188*, 135-141.

Gallo, G., Martino, G., & Carino, A. (2013). Spinning, oxidative damage and hemolysis in athletes. *Free Radicals and Antioxidants*, *3*(2), 61-66.

Genestra, M. (2007**).** Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular signalling*, *19*(9), 1807-1819.

Ghedira, K., Goetz, P., & Le Jeune, R. (2009**).** Propolis. *Phytothérapie*, *7*(2), 100-105.

Grandjean, D. (2005). Comprendre le stress oxydatif cellulaire chez le chien. *Le Nouv Prat Vét*, *22*, 11-15.

Gregus, Z., Fekete, T., Halaszi, E., & Klaassen, C. D. (1996**)**. Lipoic acid impairs glycine conjugation of benzoic acid and renal excretion of benzoylglycine. *Drug Metabolism and Disposition*, *24*(6), 682-688.

Guichardant, M., Bacot, S., Moliere, P., & Lagarde, M. (2006). Hydroxy-alkenals from the peroxidation of n-3 and n-6 fatty acids and urinary metabolites. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, *75*(3), 179-182.

Halliwell, B. (1990**)**. How to characterize a biological antioxidant. Free radical research communications, 9(1), 1-32.

Hazmiri, F. E., Boukis, F., Benali, S. A., Ganouni, N. C. I. E., & Rais, H. (2018**).** Brain tumors in children: about 136 cases. *The Pan African medical journal*, *30*, 291-291.

Heredia-Ortiz R, Bouchard M, Marie-Desvergne C, Viau C, Maître A. (2011) Modeling of the internal kinetics of benzo(a)pyrene and 3-hydroxybenzo(a)pyrene biomarker from rat data. *Toxicol. Sci. Aug*.122(2): 275-87.

Hong, S., Leroueil, P. R., Janus, E. K., Peters, J. L., Kober, M. M., Islam, M. T., ... & Banaszak Holl, M. M. (2006**).** Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjugate chemistry*, *17*(3), 728-734.

Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G., & Hu, F. L. (2014**).** Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, *19*(12), 19610-19632.

Hulbert, A. J. (2005**).** On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of theoretical biology*, *234*(2), 277-288.

Husain, K., Dube, S. N., Sugendran, K., Singh, R., Gupta, S. D., & Somani, S. M. (1996). Effect of topically applied sulphur mustard on antioxidant enzymes in blood cells and body tissues of rats. *Journal of Applied Toxicology*, *16*(3), 245-248.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2010**).** Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, *92*.

Iqbal M, Som D.S, YasumasaO, Masayoshi F et Shigero Dietary.(2003).supplementation of curcumin enhances antioxydant and phase II metabolizing enzymes in ddy male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. Pharmacology and toxicology,; 92:33-38.

Izuta, H., Shimazawa, M., Tazawa, S., Araki, Y., Mishima, S., & Hara, H. (2008**).** Protective effects of Chinese propolis and its component, chrysin, against neuronal cell death via inhibition of mitochondrial apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(19), 8944-8953.

Ji, L. L., Fu, R. O. N. G. G. E. N., & Mitchell, E. W. (1992**)**. Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *Journal of Applied Physiology*, *73*(5), 1854-1859.

Jungbluth G.(2008**).** Reactive oxygen species and their main implications in canine pathophysiology. Thesis Med. Vet., Lyon,, No. 14.

Kasai, M., Fukumitsu, H., Soumiya, H., & Furukawa, S. (2011**).** Ethanol extract of Chinese propolis facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. Evid.- Based Compl Alt, 749627.

Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., & Gogoi, R. (2016). Antioxidant and antitumor efficacy of Luteolin, a dietary flavone on benzo (a) pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *82*, 568-577.

Kasiotis, K. M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A., & Machera, K. (2017). Revisiting Greek propolis: chromatographic analysis and antioxidant activity study. *PloS one*, *12*(1)

.**Kebsa W, Rouibah H, and Lahouel M**. (2014). Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pak. J .Pharm.Sci*. 27(6): 1891-1897.

.**Khayyal, M. T., El-Ghazaly, M. A., El-Khatib, A. S., Hatem, A. M., De Vries, P. J. F., El-Shafei, S., & Khattab, M. M.** (2003). A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundamental & clinical pharmacology*, *17*(1), 93-102.

Kim, J.S., Han, D., Moon, D.K., and Rhee, J.S. (1994). Measesurement of superoxyde dismutase- like Activity of naturel antioxydants. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 59,N° 5 : 882-826.

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 Lett*. 113: 205-212.

KLEBANOFF S.J.(2005**).** Myeloperoxidase: friend and foe. *J. Leukocyte Biol.*, 77, 598-625.

Kolb, B., Whishaw, I. Q., & Teskey, G. C. (2019). *Cerveau et comportement*. De Boeck Supérieur.

Konstandi, M., Johnson, E., Lang, M. A., Camus-Radon, A. M., & Marselos, M. (2000). Stress modulates the enzymatic inducibility by benzo [α] pyrene in the rat liver. *Pharmacological research*, *42*(3), 205-211.

Konstandi, M., Kostakis, D., Johnson, E., Lang, M. A., & Marselos, M. (1998). Evidence of α2-adrenoceptor involvement in B [α] P induction processes of drug-metabolizing enzymes: the effect of stress. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, *23*(4), 491-495.

Koo, H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Park, Y. K., & Bowen, W. H. (2002**).** Effects of compounds found in propolis on Streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *46*(5), 1302-1309.

Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Świerczek-Zięba, G. (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, *19*(1), 78-101

Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food chemistry, 84(3), 329-339.

Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013**).** Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, *46*(5), 244-282.

Lahouel M, Boautabet K, Kebsa W, Alyan M.(2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*,; 4(10):712-720.

Leadon, S. A., Stampfer, M. R., & Bartley, J. (1988). Production of oxidative DNA damage during the metabolic activation of benzo [a] pyrene in human mammary epithelial cells correlates with cell killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(12), 4365-4368.

Lee, S. Y., Lee, D. R., You, C. E., Park, M. Y., & Son, S. J. (2006). Autosensitization dermatitis associated with propolis-induced allergic contact dermatitis. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, *5*(5), 458-460.

Lenzi F.(2011). Contribution à l'étude du stress oxydant cellulaire chez le chien de traineau en course de sprint. Thèse Méd. Vét., Lyon, 2011.

Levine, R. L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *32*(9), 790-796.

Likhachev, A. J., Beniashvili, D. S., Bykov, V. J., Dikun, P. P., Tyndyk, M. L., Savochkina, I. V., & Zabezhinski, M. A. (1992). Biomarkers for individual susceptibility to carcinogenic

agents: excretion and carcinogenic risk of benzo [a] pyrene metabolites. *Environmental health perspectives*, *98*, 211-214.

Lu, L.-C.; Chen, Y.-W.; Chou, C.-C.(2005). Antibacterial Activit y of Propolis against Staphylococcus Aureus. *I nternational Journal of Food Microbiology* , *102*, 213–220.

Machado, B. A. S., Silva, R. P. D., de Abreu Barreto, G., Costa, S. S., da Silva, D. F., Brandao, H. N., ... & Padilha, F. F. (2016). Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One*, *11*(1), e0145954.

Madrigal, J. L., García-Bueno, B., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., & Leza, J. C. (2003)**.** Relationship between cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in rat cortex after stress. *European Journal of Neuroscience*, *18*(6), 1701-1705.

Majchrzak, R., Sroczyński, J., & Chełmecka, E. (1990). Evaluation of the nervous system in workers in the furnace and coal divisions of the coke-producing plants. *Medycyna pracy*, *41*(2), 108-113.

Marfak A.(2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivé avec les radicaux issus des alcools: Formation de Depsides. Thèse de Doctorat Université de Limoges. Spécialité: Biophysique,; pp: 6-34.

Marieb, E. N. (2008)**.** *Biologie humaine: principes d'anatomie et de physiologie*. Pearson Education France.

Marklund S et Marklund G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. of biochem*. 47(3): 469-474.

Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *424*(1-2), 83-95.

Mayati, A., Levoin, N., Paris, H., N'Diaye, M., Courtois, A., Uriac, P., ... & Le Ferrec, E. (2012). Induction of intracellular calcium concentration by environmental benzo (a) pyrene involves a β2-adrenergic receptor/adenylyl cyclase/Epac-1/inositol 1, 4, 5-trisphosphate pathway in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(6), 4041-4052.

Mayati, A., Podechard, N., Rineau, M., Sparfel, L., Lagadic-Gossmann, D., Fardel, O., & Le Ferrec, E. (2017). Benzo (a) pyrene triggers desensitization of β2-adrenergic pathway. *Scientific reports*, *7*(1), 3262.

McMichael, M. A. (2007**).** Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *231*(5), 714-720.

Mendoza-Cozatl, D., Loza-Tavera, H., Hernández-Navarro, A., & Moreno-Sánchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS microbiology reviews*, *29*(4), 653-671.

Minciullo PL., Inferrera A., Navarra M., Calapai G., Magno C. and Gangemi S. (2015). Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia: *a systematic review.* Urol Int.; 94(3): 249–54.

Miranda, M. M., Panis, C., Cataneo, A. H. D., da Silva, S. S., Kawakami, N. Y., de França Lopes, L. G., ... & da Silva, J. J. N. (2015). Nitric oxide and Brazilian propolis combined accelerates tissue repair by modulating cell migration, cytokine production and collagen deposition in experimental leishmaniasis. *PLoS One,* 10(5), e0125101.

Morris-Schaffer, K., Merrill, A. K., Wong, C., Jew, K., Sobolewski, M., & Cory-Slechta, D. A. (2019). Limited developmental neurotoxicity from neonatal inhalation exposure to diesel exhaust particles in C57BL/6 mice. *Particle and fibre toxicology*, *16*(1), 1.

Mortamais, M., Pujol, J., Van Drooge, B. L., Macià, D., Martínez-Vilavella, G., Reynes, C., ... & Alvarez-Pedrerol, M. (2017). Effect of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons on basal ganglia and attention-deficit hyperactivity disorder symptoms in primary school children. *Environment international*, *105*, 12-19.

Murawska-Cia1owicz, E., Jethon, Z., Magdalan, J., Januszewska, L., Podhorska-

N. Grova, A. Valley, J. Turner, A. Morel, C. Muller et H. Schroeder. (2007**).** Modulation of the behavior and expression of NMDA-R1 gene mRNA in adult female mice after subacute administration of benzo (a) pyrene. *Neurotoxicology*,*28* (3), 630-636

.**Nebert, D. W., Shi, Z., Gálvez-Peralta, M., Uno, S., & Dragin, N.** (2013). Oral benzo [a] pyrene: understanding pharmacokinetics, detoxication, and consequences—Cyp1 knockout mouse lines as a paradigm. *Molecular pharmacology*, *84*(3), 304-313.

Nunes, DD, Machado, BAS, Barreto, GDA, Silva, JR, Silva, DFD, Rocha, JLCD, ... et Guez, MAU. (2018). hemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis by classical methods and by supercritical extraction

Ogunleke, A. (2019). *Imagerie chimique 3D de tumeurs du cerveau* (Doctoral dissertation, Bordeaux).

Okado-Matsumoto, A., & Fridovich, I. (2001**).** Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver Cu, Zn-SOD in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(42), 38388-38393.

Okhawa H., Ohishi N. and Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by

thiobarbituric reaction. *Anal Biochem.; 95: 351–358.*

Oko1_ow, M., Zawadzki, M., Soza_nski, T., Dzie Î giel, P.(2011). Effects of melatonin

on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the liver, kidneys and

brain of rats administered with benzo(a)pyrene. Exp. Toxicol. Pathol. 63, 97e103.

Okutan, H., Ozcelik, N., Yilmaz, H. R., & Uz, E. (2005**)**. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry*, *38*(2), 191-196.

Oliveira, ACP, Shinobu, CS, Longhini, R., Franco, SL et Svidzinski, TIE (2006). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, *101*(5), 493-497.

Onlen, Y., Tamer, C., Oksuz, H., Duran, N., Altug, M. E., & Yakan, S. (2007). Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and ciprofloxacin on Pseudomonas keratitis in rabbits. *Microbiological research*, *162*(1), 62-68.

Opara, E. C. (2002**)**. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *The journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, *122*(1), 28-34.

Orsatti, CL, Missima, F., Pagliarone, AC et Sforcin, JM (2010). Expression et production des cytokines Th1 / Th2 par des souris traitées à la propolis. *Journal of ethnopharmacology* , *129* (3), 314-318.

Orsi, RO, Funari, SRC, Soares, AMVC, Calvi, SA, Oliveira, SL, Sforcin, JM et Bankova, V. (2000). Action immunomodulatrice de la propolis sur l'activation des macrophages. *Journal des animaux venimeux et des toxines* , *6* (2), 205-219.

Oršolić, N., Sirovina, D., Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., Jembrek, M. J., & Kosalec, I. (2013). Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice: effects of propolis and epigallocatechin gallate (EGCG). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *757*(1), 36-44.

Pamplona, R., Portero-Otın, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A., & Barja, G. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mechanisms of ageing and development*, *112*(3), 169-183.

Park, J. H., Lee, J. K., Kim, H. S., Chung, S. T., Eom, J. H., Kim, K. A., ... & Oh, H. Y. (2004). Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *International Immunopharmacology*, *4*(3), 429-436.

Pasupuleti, VR, L. Sammugam, N., Ramesh et SH, Gan .(2017). Miel, propolis et gelée royale: un examen complet de leurs actions biologiques et de leurs bienfaits pour la santé. *Médecine oxydante et longévité cellulaire* , *2017* .

Pavilonis, A., Baranauskas, A., Puidokaitė, L., Maželienė, Ž., Savickas, A., & Radžiūnas, R. (2008). Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts. *Medicina*, *44*(12), 977.

Popovici, C.; Saykova, I .; Tylkowski, B.(2009). Evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds by the reactivity with the free radical DPPH. *Journal of Industrial Engineering*, 4, 25-39.

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, *88*(4), 1243-1276.Propolis I nducing Anticancer Effect s: A Review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* .

Pushpakiran, G., Mahalakshmi, K. and Anuradha, C.V(2004)**.** Taurine restores ethanol-induced depletion of antioxidants and attenuates oxidative stress in rat tissues. *Amino Acids* 27: 91-96, 2004.

Raghukumar, R., Vali, L., Watson, D., Fearnley, J., & Seidel, V. (2010). Antimethicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) activity of 'pacific propolis' and isolated prenylflavanones. *Phytotherapy research*, *24*(8), 1181-1187.

Ramakrishnan, K., & Salinas, R. C. (2007)**.** Peptic ulcer disease. *American family physician*, *76*(7).

Ramanathan, K., Contreras, M. A., Perkins, C. L., Asher, S., Hasoon, F. S., Keane, J., ... & Ward, J. (2003). Properties of 19.2% efficiency ZnO/CdS/CuInGaSe2 thin-film solar cells. *Progress in Photovoltaics: research and applications*, *11*(4), 225-230.

Ramesh, A., Inyang, F., Hood, DB, Archibong, AE, Knuckles, ME et Nyanda, AM (2001)**.** Métabolisme, biodisponibilité et toxicocinétique du rat Benzo (α) pyrenein F-344 après administration orale. *Pathologie expérimentale et toxicologique* , *53* (4), 275-290.

Ramesh, A., Walker, SA, Hood, DB, Guillén, MD, Schneider, K. et Weyand, EH (2004). Biodisponibilité et évaluation des risques des hydrocarbures aromatiques polycycliques ingérés par voie orale. *International Journal of toxicology* , *23* (5), 301-333.

Ramos, A. F. N.; Miranda, J. L.(2007). Propolis: A Review of I ts Ant i- Inflammatory and Healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2007, *13*, 697–710.

Ré, D. B., Nafia, I., Nieoullon, A., Le Goff, L. K., & Had-Aissouni, L. (2005, May). Stress oxydatif cérébral: les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate? Implications sur la survie neuronale. In *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* (Vol. 24, No. 5, pp. 502-509). Elsevier Masson.

Rengarajan, T., Rajendran, P., N. Nandakumar, B., Lokeshkumar, P., et Rajendran, I. (2015). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, especially against cancer. *Asia-Pacific Journal of Tropical Biomedicine* , 5(3), 182-189.

Rossi, A.; Ligresti, A.; Longo, R.; Russo, A.; Borrelli, F.; Sautebin, L.(2002). The Inhibitory Effect of Propolis and Caffeic Acid Phenethyl Ester on Cyclooxygenase Activity in J774 Macrophages. *Phytomedicine* 2002 , *9*, 530–535.

Rouibah H, Benguedouer L, Alyane M, Bousnane H.N, Kebsa W, Lahouel M. (2008). The effect of propolis extracts supplementation on the prevention of heart and vascular disease risk. *J. Saudi Soc. For Food and Nut.* 3 (1): 29-35.

Saunders CR, Shockley DC, Knuckles ME. 2001. Depression of locomotor activity in rats after acute exposure to benzo(a)pyrene acute in F-344 rats. Neurotox. Res. 3: 557–579.

Saunders, C. R., Das, S. K., Ramesh, A., Shockley, D. C., & Mukherjee, S. (2006**).** Benzo (a) pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, *26*(5), 427-438.

Saunders, C. R., Ramesh, A., & Shockley, D. C. (2002). Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo (a) pyrene. *Toxicology letters*, *129*(1-2), 33-45.

Saunders, C. R., Ramesh, A., & Shockley, D. C. (2002). Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo (a) pyrene. *Toxicology letters*, *129*(1-2), 33-45.

Sawicka, D.; Car, H.; Borawska, M. H.; Nikliński, J.(2012). The Anticancer Activity of Propolis. Folia Histochemica et Cytobiologica 2012 , 50, 25–37.

Scazzocchio, F., DAuria, F. D., Alessandrini, D., & Pantanella, F. (2006**)**. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological research*, *161*(4), 327-333.

Sedlak, Jozef, and Raymond H. Lindsay.(1968). "Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent." *Analytical biochemistry* 25 (1968): 192-205.

Segueni, N. (2011). Contribution à l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis. *Th doct:* Université de Constantine 1. Algérie. P.321.

Servais, S. (2004). Mitochondrial alterations and oxidative lung stress in response to ozone: effects of age and omega-3 supplementation (Doctoral dissertation).

Sforcin, J. M.(2007**).** Propolis and the Immune System: A Review. *Journal of Ethnopharmacology* 2007 , *113*, 1–14.

Shinmei, Y., Yano, H., Kagawa, Y., Izawa, K., Akagi, M., Inoue, T., & Kamei, C. (2009). Effect of Brazilian propolis on sneezing and nasal rubbing in experimental allergic rhinitis of mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, *31*(4), 688-693.

Sidani, M., Gaud, M., Pagès, X., Morin, O., Gouband, M., Buchoux, J., ... & Galan, V. (2012). Filtration of oil spiked with four polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on plates filled with activated carbon. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, *19*(6), 317-323.

Siegers, C. P. Younes, M. A., &.(1981). Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion in vivo. *Chemico-biological interactions*, *34*(3), 257-266.

Singletary,K.W.(2004), Barnes, S.L. and van Breemen, R.B. Ethanol inhibits benzo[a]pyrene-DNA adduct removal and increases 8-oxodeoxyguanosine formation in human mammary epithelial cells. *Cancer Lett*. 203: 139-144,

Singleton V.I et Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic phosphotugstic acid regents. *America journal of Enology and viticulture*, 16(3) : 144-158.

Speciale A, Costanzo R, Puglisi S, et al. (2006**)** Antibacterial activity of propolis and its active principles alone and in combination with macrolides, beta-lactams and fluoroquinolones against microorganisms responsible for respiratory infections. *Journal Chemother* 18: 164–71

Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R., & Culotta, V. C. (2001). A fraction of yeast cu, zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, ccs, localize to the intermembrane space of mitochondria a physiological role for sod1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(41), 38084-38089.

Tissier, M., & Wschebor, N. (2011). Infrared safe perturbative approach to Yang-Mills correlators. *Physical Review D*, *84*(4), 045018.

Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, *2013*.

Uzel, A., Önçağ, Ö., Çoğulu, D., & Gençay, Ö. (2005**).** Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*, *160*(2), 189-195.

Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L., & Carvalho, M. (2011). Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(1), 86-92.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T. D, Mazur M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.The Intern *J. of Biochem. and Cell. Biol.* 39: 44-84.

Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M et Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interactions*. 160(1): 1-40.

Vardi N, Parlakpinnar H, Cetin A, ErdoganA, OzturkIC.Protective.(2010**).** Effect of –ß Carotene on Methotrexate-Induced Oxidative Liver Damage.*Toxicologie Pathology*,;38:592-597.

Watanabe MAE., Amarante MK., Conti BJ. and Sforcin JM. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharmcy Pharmacology*.; 63: 1378–1386.

Xuan H., Li Z., Yan H. et al.(2014). Antitumor activity of Chinese propolis in MCF-7 and MDA-MB-231 cells of human breast cancer. Complementary and alternative medicine based on evidence. ; 2014: 11. 280120.

Yang, H. Y., Chang, C. M., Chen, Y. W., & Chou, C. C. (2006). Inhibitory effect of propolis extract on the growth of Listeria monocytogenes and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(6), 937-943.

Yildiz, Y., & Nalbant, M. (2008)**.** A review of cryogenic cooling in machining processes. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, *48*(9), 947-964.

Zielinski, S., & Pörtner, H. O. (2000). Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *125*(2), 147-160.

Annexes

Annex I :

I- Gamme d'étalon de polyphénols et flavonoïdes :

A- La courbe d'étalonnage de l'acide gallique :

Après la préparation des solutions de différentes concentrations de l'acide gallique et préparation de la gamme d'étalonnage (répéter 3 fois), nous avons obtenu les valeurs d'absorbances suivantes

Tableau 2 : Densités optiques (DO) de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique

[AG] µg /ml	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	0.39	0.2	0.1	0.005
DO moyenne	3.71	2.11	1.01	0.46	0.29	0.079	0.046	0.024	0.010	0.029	0.0019

La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations utilisées (**annexI** , **figure 1)**. L'équation de la courbe (y = 0,0744x + 0,0043) et le coefficient de corrélation (R^2 = 0,9993) ;

La courbe d'étalonnage exprimée en µg équivalent d'acide gallique par gramme d'échantillon de propolis (µg /g).

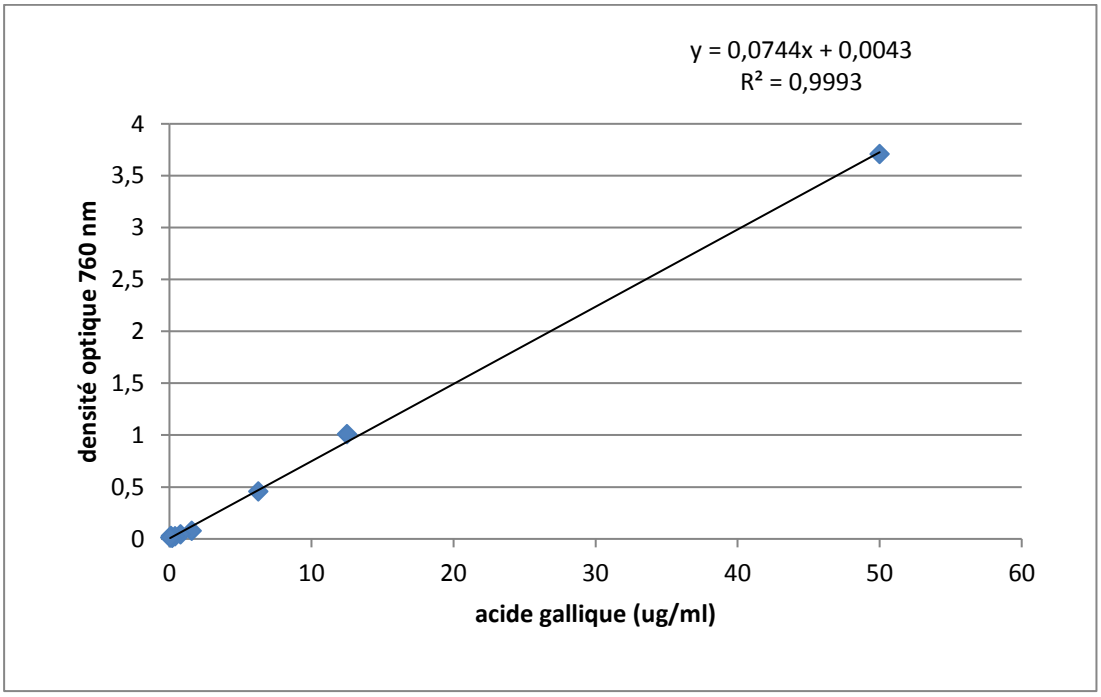


Figure 1 : Courbe d'étalonnage des polyphénols (acide gallique).

B-La courbe d'étalonnage de quercétine :

Après la préparation des solutions de différente concentration de quercétine et préparation la gamme d'étalonnage (répéter 3 fois) nous avons obtenu les valeurs d'absorbances suivantes

Tableau 03: Densités optiques (DO) de la courbe d'étalonnage de la quercétine

[QR]µg/ml	200	100	50	25	12.5	6.5	3.25
DO moyenne	0.34	0.293	0.279	0.269	0.266	0.266	0.261

La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations utilisées

(annex I ,figure 2**)**L'équation de la courbe (y = 0,0008x + 0,0088) et le coefficient de corrélation

(R2 = 95,71 %).

La courbe d'étalonnage exprimée en µg équivalent de quercétine par gramme d'échantillon de propolis (µg /g).

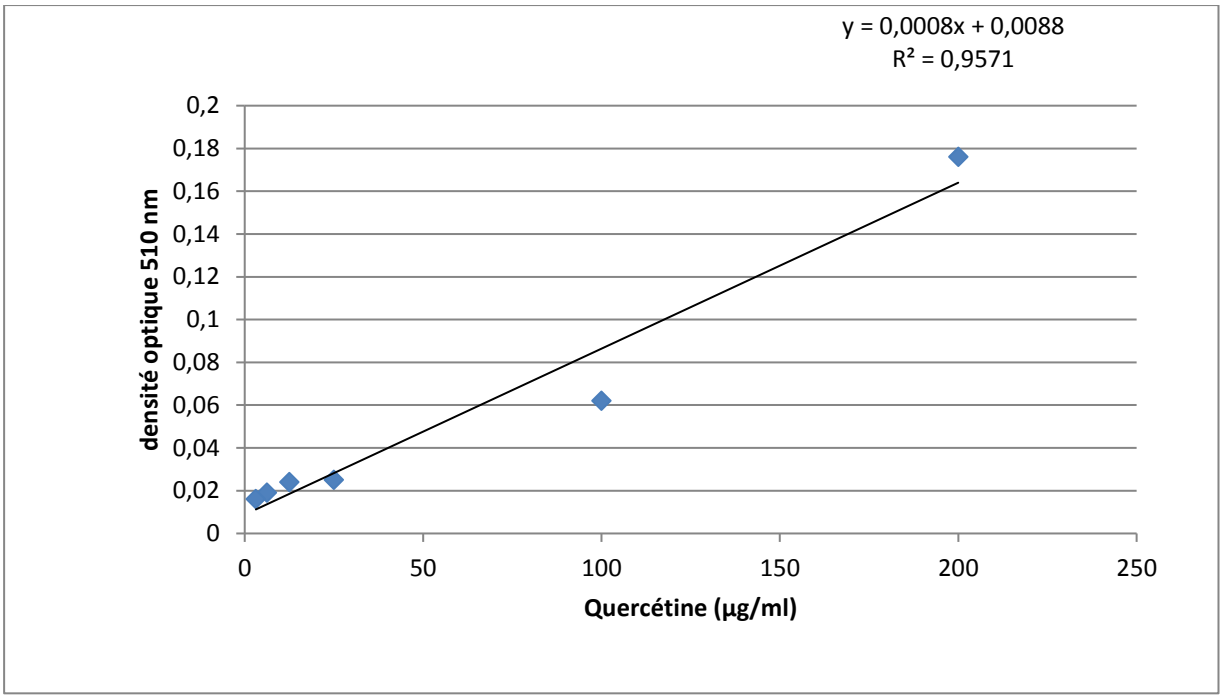


Figure 2: la courbe d'étalonnage des flavonoides(Quercétine).

annexII

Gamme d'etalon de GSH :

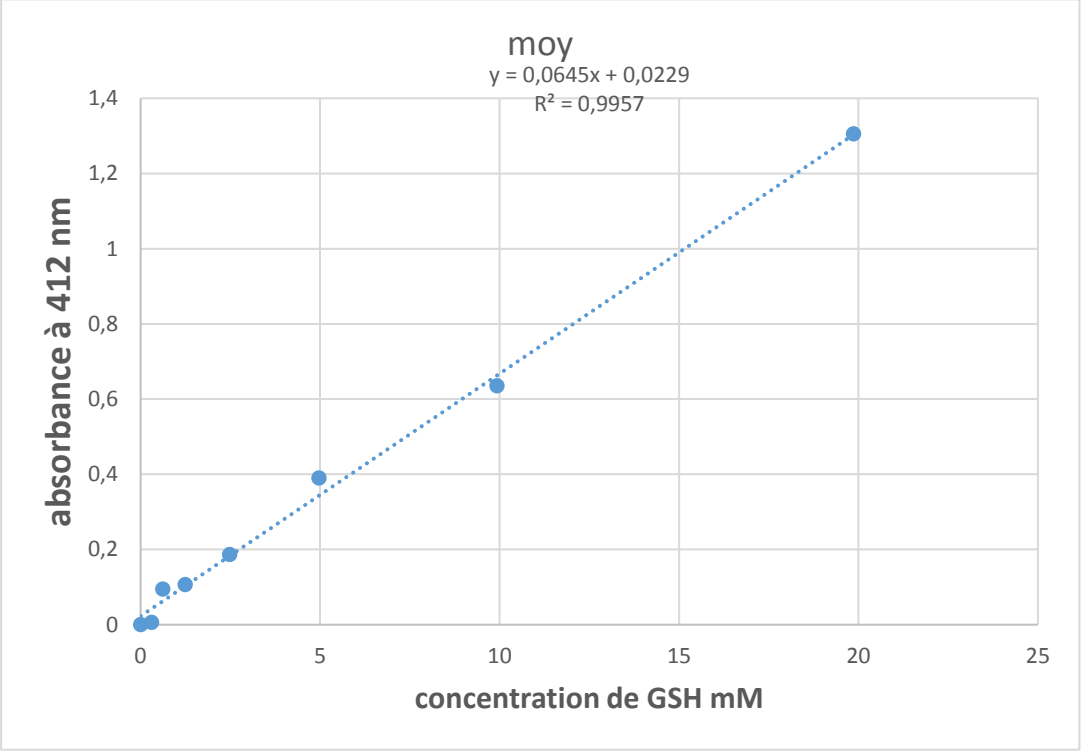


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de GSH avec le réactif DTNB

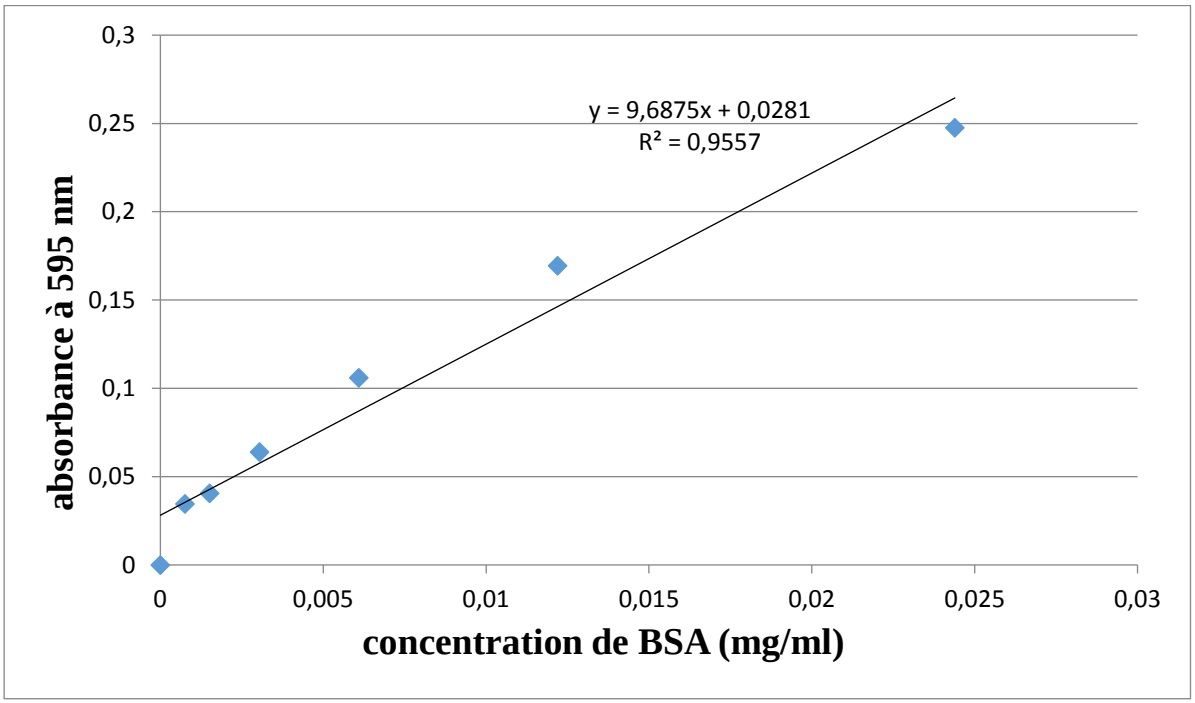


Figure 4 : Courbe d'étalonnage des protéines (sérum albumine bovine).

Annexe III :

Tableau 3 : Variation de l'effet préventif de la propolis sur l'activité des enzymes antioxydant, CAT, SOD, contre la toxicité cérébrale aigue du benzopyréne chez la souris.

Traitement des animaux	L'activité de CAT [UI/mg Pr]	L'activité de SOD [UI/mg Pr]
témoin	201.688±16.164	60.25±9.63
benzopyréne	145.184±7.331 *	55.30±4.5
propolis	202.653±26.29	85.22±3.20. ***
Propolis+benzopyréne	204.658±79.14	68.44±3.9475*

Les valeurs sont données en moyenne ± Ecart type. Comparaisons faites entre les groupes traités et le groupe témoin. * P< 0.05 représente une différence significative ; ** P< 0.01 représente une différence hautement significative ; *** P < 0.001 représente une différence très hautement significative.

Tableau 4 : Variation de l'effet préventif de la propolis sur la peroxydation lipidique MDA, contre la toxicité cérébrale aigue du benzopyréne chez la souris.

Traitements des animaux	Taux de MDA (UM/ mg de protéine)
Témoin	48.249±13.35
Benzopyréne	92.351±2.343 **
propolis	68.578±2.376 ##
Propolis+benzopyréne	49.188±7.803 ###

Tableau 5 : Variation de l'effet préventif de la propolis sur le GSH, contre la toxicité cérébrale aigue du benzopyréne chez la souris.

Traitement des animaux	Taux de GSH (mM/ mg de protéine)
témoin	30.96±15.4026
Benzopyréne	14.99±4.613
propolis	41.48±3.16 #
Propolis +benzopyréne	29.94±6.19

Réalisée par : **Encadré par**

Bedoud Omayma Dr :Benguedouar.L

Boudergui Fatima Zohra

Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de la propolis de jijel contre la toxicité cérébrale aigue induite par le benzo(a) pyrene

Résumé

Le benzo(a)pyrène B(a)P est un polluant cancérigène capable d'induire une neurotoxicité via la génération des radicaux libres et l'induction d'un stress oxydant. La présente étude vise à évaluer l'effet préventif de la propolis de Jijel contre neurotoxicité aigue du B(a)P chez la souris. L'étude phytochimique a montré que la propolis est riche en polyphénols et en flavonoïdes. L'étude in vivo a montré que le B(a)P à 100mg/kg en dose unique par voie intrapéritoniale (IP) présente une toxicité neuronale sévère 48heures après le traitement. Ceci se traduit par une réduction significative de taux du glutathion (GSH) et une augumentation de la peroxydation lipidique (MDA) et l'activité des enzymes anti-oxydantes superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT). Le prétraitement par la propolis à (25mg/kg/j) pendant 5jours a permis de prévenir cette toxicité par diminution des taux du MDA d'une part, et augmentation des taux de GSH et de l'activité de la SOD et de la CAT d'autre part. L'étude histologique a confirmé que la neurotoxicité de B(a)P et l'effet neuroprotecteur de la propolis. Ces résultats recommandent donc l'utilité de la propolis pour atténuer les dysfonctionnements neuronale du B(a)P.

Mots clés : Benzo(a)pyrène, neurotoxicité, stress oxydant, propolis.

Abstract

Benzo (a) pyrene B (a) P is a carcinogenic pollutant capable of inducing neurotoxicity via the generation of free radicals and the induction of oxidative stress. The present study aims to evaluate the preventive effect of Jijel propolis against acute neurotoxicity of B (a) P in mice. The phytochemical study showed that propolis is rich in polyphenols and flavonoids. The in vivo study showed that B (a) P at 100 mg / kg single dose intraperitoneally (IP) showed severe neuronal toxicity 48 hours after treatment. This results in a significant reduction in glutathione levels (GSH) and an increase in lipid peroxidation (MDA) and the activity of antioxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes. Pretreatment with propolis at 25mg / kg / day for 5 days prevented this toxicity by lowering MDA levels and increasing GSH levels and SOD and CAT activity. on the other hand. The histological study confirmed the toxicity of B (a) P and the neuroprotective effect of propolis. These results therefore recommend the usefulness of propolis to attenuate the neuronal dysfunctions of B (a) P.

Key words: Benzo(a)pyrene neurotoxicity, oxidative stress, propolis.

ملخص

البنزوبيران هو ملوث مسرطن قادر على إحداث سمية عصبية عبر توليد الجذور الحرة وتحريض الإجهاد التأكسدي. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التأثير الوقائي لدنج جيجل ضد السمية العصبية الحادة لـ B (a) P في الفئران. أظهرت دراسة الكيمياء النباتية أن البروبوليس غني بالبوليفينول والفلافونويد. أظهرت الدراسة في الجسم الحي أن B (a) P عند 100 مغ / كغ جرعة واحدة داخل الصفاق (IP) أظهرت سمية عصبية شديدة بعد 48 ساعة من العلاج. هذا يؤدي إلى انخفاض كبير في مستويات الجلوتاثيون (GSH)وزيادة في بيروكسيد الدهون (MDA) ونشاط ديسموتاز الفوق أكسيد مضادات الأكسدة (SOD) وإنزيمات الكاتالاز (CAT).منعت المعالجة المسبقة بالبروبوليس بمعدل 25 مغ / كغ / يوم لمدة 5 أيام هذه السمية من خلال خفض مستويات MDA وزيادة مستويات هرمون GSH ونشاط SOD و .CAT من ناحية أخرى. أكدت الدراسة النسيجية سمية B (a) P والتأثير العصبي للدنج. لذلك توصي هذه النتائج بفائدة البروبوليس لتخفيف الاختلالات العصبية لـ البنزوبيران .

الكلمات المفتاحية : البنزوبيران، السمية العصبية ، الإجهاد التأكسدي،البروبوليس