

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم: البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

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 rénale aiguë du
benzo(a)pyrène chez la souris.

Membres de Jury

Présidente: Dr. LARICHE N.

Examinatrice : Dr.BENGUEDOUER L.

Encadreur: M^{me} KEBSA W

Présenté par :

AffaneNour El-houda.

Fantazia Meriem.

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) :.....

Au terme de ce travail

On remercie tout d'abord le bon DIEU tout puissant, maître des cieux et de la terre de nous avoir accordé l'énergie, la force, la volonté et surtout la patience pour mener à bien ce travail.

Nos vifs remerciements sont dédiés aux membres du jury :

À M^{me} Kbsa W. qui a accepté de diriger notre travail. On a apprécié les échanges que nous avons eus lors de la rédaction de ce mémoire. Grâce à elle qu'on a progressé et acquis la rigueur nécessaire pour appréhender ce projet. On l'a remercié pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

A D' Laariche N. merci de nous faire l'honneur de présider ce jury de mémoire.

A D' Benguedouar L. merci d'avoir accepté d'examiner notre travail. Merci également pour la qualité de vos enseignements et votre accessibilité tout au long de ces années d'études. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Aux équipes de laboratoire au sein desquelles on a pu exercer :

A l'équipe de laboratoire de Toxicologie Moléculaire, ainsi qu'à l'équipe de laboratoire de Biochimie, merci pour votre aide, votre disponibilité tout au long de notre travail et surtout pour votre patience et vos conseils, merci pour tout.

Nos remerciements vont également à tous les enseignants et tous les responsables de la faculté de sciences de la nature et de la vie.

A toute la promotion de master « Sciences Pharmacologiques », année 2018-2019.

Enfin nous nous remercions gracieusement toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Merci

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des abréviations.....	iii
Introduction	1

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Le benzo(a)pyrène

1.1. Structure et propriétés du Bap	3
1.2. Voies d'exposition du B(a)P chez l'homme	3
1.3. Métabolisme et toxicocinétique du Bap	4
1.3.1. Absorption.....	4
1.3.2. Distribution	5
1.3.3. Biotransformation	6
1.3.4. Élimination	8
1.4. Toxicité du benzo(a)pyrène	8
1.4.1. Toxicité aiguë.....	8
1.4.2. Toxicité chronique.....	8
1.4.3. Génotoxicité et cancérogénicité du BaP.....	9

Chapitre 2 : Toxicité rénale du benzo(a)pyrène

2.1. Rappel sur le rein	11
2.2. Stress oxydant induit par le benzo(a)pyrène.....	12
2.2.1. Stress oxydant et espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	12
2.2.2. Production de ROS par le BaP.....	15
2.3. Dommages oxydatifs des biomolécules par le benzo(a)pyrène.....	15
2.3.1. Dommages oxydatifs à l'ADN nucléaire et mitochondrial.....	16
2.3.2. Dommages oxydatifs aux lipides : la peroxydation lipidique.....	17
2.3.3. Dommages oxydatifs aux protéines.....	18
2.4. Les systèmes de défenses antioxydants.....	18

Chapitre 3: La propolis

3.1. Origine et composition chimique de la propolis.....	21
--	----

3.2. Activités biologiques et thérapeutiques de la propolis.....	24
3.2.1. Activité anti-oxydante	24
3.2.2. Activité anti-cancéreuse et antiproliférative.....	25
3.2.3. Autres activités de la propolis.....	25
3.3. Toxicité et effet pro-oxydant de la propolis.....	26

Matériel et Méthodes

1. Etude phytochimique et activité anti-radicalaire de la propolis	28
1.1. Récolte de la propolis	28
1.2. Préparation de l'extrait éthanolique de la propolis	28
1.3. Dosage des polyphénols totaux.....	28
1.4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	29
1.5. Evaluation de l'effet anti-radicalaire par le test au DPPH° (2.2. Diphenyl-picrylhydrazyl)..	29
1.6. Evaluation du pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène H₂O₂.....	31
2. Evaluation de l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité rénale du B(a)P <i>in vivo</i>.....	31
2.1. Entretien et traitement des animaux.....	31
2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des reins.....	32
2.3. Dosages tissulaires.....	32
2.3.1. Préparation de la fraction cytosolique.....	32
2.3.2. Dosage des protéines.....	33
2.3.3. Dosage du MDA cytosolique.....	33
2.3.4. Dosage du glutathion (GSH).....	34
2.3.5. Evaluation de l'activité des enzymes anti-oxydantes.....	35
2.3.5.1. Mesure de l'Activité enzymatique SOD.....	35
2.3.5.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase.....	36
2.4. Etude histologique.....	36
2.5. Analyse statistique.....	37

Résultats et discussion

1. Etude phyto-chimique et activité anti-radicalaire de la propolis	39
1.1. Teneurs en Polyphénols et en Flavonoïdes	39
1.2. Effet anti-radicalaire d'EEP contre le radical libre DPPH°.....	40
1.3. Variation du pouvoir réducteur d'H₂O₂.....	42
2. Evaluation de l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité rénale du BaP <i>in vivo</i>.....	44
2.1. Evolution pondérale.....	44

2.2.	Effet de la propolis sur les parametres du stress oxydant du tissu rénal.....	45
2.2.1.	Variation des taux de Malondialdehyde cytosolique	45
2.2.2.	Variation du taux de glutathion.....	47
2.2.3.	Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique rénale.....	48
2.2.4.	Evaluation de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique.....	50
2.2.5.	Etude histologique.....	53
Conclusion		56
Référence Bibliographique		57
Annexe		

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure 1	Structure chimique du benzo(a)pyrène et du pyrène.	3
Figure 2	Activation métabolique du BaP.	7
Figure 3	Étapes de la cancérogénicité induite par le benz(a)pyrène.	10
Figure 4	Anatomie du rein.	11
Figure 5	Production de ROS par le B(a)P par la voie des quinones.	15
Figure 6	Spectre des modifications de l'ADN causées par BPQ.	17
Figure 7	Principaux polyphénols et flavonoïdes détecté dans la propolis algérienne.	22
Figure 8	Principe de réaction entre les flavonoïdes et AlCl ₃ .	29
Figure 9	Forme radicalaire et réduite du DPPH°.	30
Figure 10	Principe de dosage de MDA.	34
Figure 11	Principe de dosage de GSH.	35
Figure 12	Teneur en polyphénols et flavonoïdes de l'extrait éthanolique la propolis en mg EAG/g et mg EQ /g de propolis respectivement.	39
Figure 13	Pourcentage de réduction du DPPH de l'EEP.	41
Figure 14	Pourcentage de réduction de peroxyde d'hydrogène de l'EEP.	43
Figure 15	Variations des taux du MDA rénal après traitement par le benzo(a)pyréne seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP seul (25mg/kg), par l'EEP seul (25mg/kg) pendant 5 jours.	46
Figure 16	Variation des taux du GSH cytosolique rénal après traitement par le benzo(a)-pyrène seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP (25mg/kg), ou par l'EEP seul (25mg/kg) pendant 5 jours.	47
Figure 17	Variation de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) dans le tissu rénal après traitement par le benzo(a)pyréne seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP (25mg/kg), ou par l'EEP seul (25mg/kg) pendant 5 jours.	49
Figure 18	Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu rénal après traitement par le benzo(a)pyréne seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP (25mg/kg), ou par l'EEP seul (25mg/kg) pendant 5 jours.	51
Figure 19	Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline et à l'éosine des tissus Rénaux (×40).	53

Liste des Tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Les espèces réactives de l'Oxygène.	13
Tableau 2	Composition chimique de la propolis brute.	21
Tableau 3	Types de propolis les plus répandus : origine des plantes et leurs constituants majeurs.	23
Tableau 4	Pourcentage de réduction du DPPH° par la propolis et l'acide ascorbique.	40
Tableau 5	Le pourcentage de piégeage de H ₂ O ₂ par la propolis et l'acide ascorbique.	42
Tableau 6	Variation de poids corporel (PC) chez les trois groupes de rats au 21ème jour.	44

Liste des Abréviations

AKRs : Aldo -keto réductase
B(a)P : Benzo(a)pyrène
BPD : Benzopyrène-dihydrodiol
BPDE : +-anti-B(a)P-diol-époxyde
BPQ : O-quinone, B(a)P-7,8-dione
BSA : Albumine Sérique Bovine
CAPE : Caffeic Acid Phenethyl Ester
CAT : Catalase
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
DD : Dihydrodiol Déshydrogénase
DL₅₀ : Dose Létale 50
DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl.
DTNB : 5,5'-dithiobis (2-acide nitrobenzoïque).
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acetic
EEP : Extrait Ethanolique de Propolis
EGFR : Epidermal growth factor receptor.
EH : Epoxyde Hydrolase.
ERO : Espèces réactives de l'oxygène.
GPx : Glutathion peroxydase.
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion-S-Transférase.
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HO• : Radical hydroxyle
HOCL : Acide hypochloreux
IARC : International Agency for Research on Cancer
IC50 : Concentration inhibitrice 50
IP : Intra-péritonéale.
IRC : Insuffisance Rénale Chronique
LDH : Lactate déshydrogénase
MDA : Malondialdéhyde
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NO• : Monoxyde d'azote
O₂ -• : Anion superoxyde
ONOO⁻ : Ion peroxydite
ROO• : Radicaux peroxyde
ROS : Reactive oxygen species
SOD : Superoxydes dismutase
TBA : Thiobarbic acid
TCA : Trichloracetic acid.
TNB : Thionitrobenzoic aci

Depuis plusieurs siècles, la pollution atmosphérique ne cesse d’engendrer des effets néfastes sur l’homme et son environnement. Elle est reconnue comme l’un des problèmes majeurs de notre société responsable d’environ 5 à 6 millions de décès par an (Prüss-Üstün et Corvalán, 2006 ; Landrigan, 2017).

Le benzo(a)pyrène B(a)P est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) à cinq cycles aromatiques présent dans l’atmosphère sous forme particulaire et généré lors de la combustion incomplète de la matière organique (Bourgart et *al.*, 2019). La métabolisation du B(a)P entraîne un stress oxydant *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $OH\cdot$. Ainsi, le stress oxydant découlant de cette forte production de ROS, entraîne l'altération de l'intégrité de l'ADN *via* des dommages oxydatifs, à l'origine de différentes mutations et pouvant participer à l'initiation de cancers et aux dommages oxydants au niveau de tous les organes (Bourgart et *al.*, 2019 ; Derakhshesh et *al.*, 2019).

Le benzo(a)pyrène B(a)P constitue la principale substance cancérigène de la fumée de cigarette qui présente une forte toxicité au niveau de l’organisme humain. Il joue un rôle crucial dans la carcinogenèse pulmonaire (Huang et *al.*, 2018). Dans la population générale, le fumé de cigarette riche en B(a)P, augmente la microalbuminurie suggérant une atteinte de l’endothélium qui peut entraîner une accélération du déclin de la fonction rénale (Orth et Schrier, 1997). Or, jusqu’à présent peu d’études ont été consacrées à l’évaluation de la toxicité rénale des hydrocarbures aromatiques polycycliques en générale et du B(a)P en particulier. Aucun mécanisme moléculaire n’a été proposé pour expliquer les dommages oxydatifs du B(a)P au niveau rénal. D’où l’intérêt d’étudier cette toxicité et de chercher de nouvelles substances qui peuvent la réduire.

La propolis est une substance résineuse et gommeuse recueillie par les abeilles ouvrières à partir des bourgeons et des exsudats des plantes. Ses activités thérapeutiques ; anti-inflammatoire, anticancéreuse et anti-oxydante, sont liées directement à sa richesse en polyphénols (Banskota et *al.*, 2001 ; Benguedouar et *al.*, 2008 ; Kebsa et *al.*, 2018 ; Seibert et *al.*, 2019).

Cette étude vise à évaluer la toxicité rénale aiguë du B(a)P d’une part et à établir les mécanismes de l’effet protecteur de la propolis contre cette toxicité. Et ce à travers l’évaluation des paramètres de stress et la visualisation des changements tissulaires sur coupes histologiques.

Chapitre 1. Le benzo(a)pyrène

1.1. Structure et propriétés du Bap

En tant que contaminant environnemental, le benzo(a)pyrène BaP constitué de 5 anneaux aromatiques (Figure1), est un composé représentatif des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui exerce des effets mutagènes et carcinogènes puissantes en possédant une région « baie » et être dissymétrique. Ces substances toxiques sont présentes dans la totalité des compartiments environnementaux (atmosphère, sols, fleuves et rivières, océans...), dans des aliments et aussi dans la fumée de cigarette (Baumard, 1999). Il résulte principalement de la combustion incomplète des composés organiques (ATSDR, 1995).

Le BaP présente une structure cristalline solide de couleur jaune pâle dans la température et la pression ambiante. Il a un poids moléculaire de 252,3 g/mol, un point de fusion de 181,1°C, et une densité de 1,351 g/cm³. Le BaP a une solubilité faible dans l'eau, très soluble dans le chloroforme, soluble dans le benzène, toluène et dans le xylène. Il est constitué de deux régions de grande densité électronique et de haute activité métabolique. La région k est la région comprise entre le quatrième et cinquième carbone et la région baie entre le neuvième et le douzième carbone (Gadouche, 2010).

Le BaP est métabolisé principalement au niveau hépatique en deux phases et permet de produire simultanément des espèces oxygénées réactives, telles que l'anion superoxyde (O₂^{-°}), le radical hydroxyle (OH[°]) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Park et al., 2008).

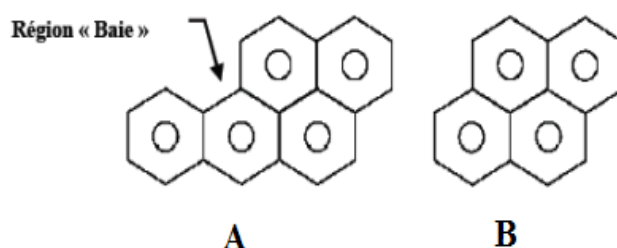


Figure 1. Structure chimique du benzo(a)pyrène et du pyrène (Temime, 2002).
A) Structure du benzo(a)pyrène (cancérogène). B) Structure du pyrène (non- cancérogène)

1.2. Voies d'exposition du B(a)P chez l'homme

L'être humain est en contact permanent avec les HAP qui sont une préoccupation importante en santé publique étant donné les nombreuses sources environnementales, telles

que l'alimentation (viandes et poissons fumés, frits ou cuits sur charbon de bois (Bouchard et Viau, 1999), la suie et les fumées de toutes origines (gaz d'échappements, fumée de cigarette etc.), l'air ambiant de régions à haute densité automobile ou de secteurs industrialisés (Bisson et *al.*, 2006) .

L'alimentation est la voie majeure d'exposition humaine aux HAP (Fiala et *al.*, 2001; Van et *al.*, 1994). Cette exposition est due à la consommation de viandes et poissons fumés ou grillés sur le feu, de graisses et huiles végétales qui va générer des HAP par le phénomène de pyrolyse, ainsi que l'ingestion de produits contaminés par dépôt atmosphérique (végétaux) ou par bioaccumulation (mollusques) (Perez et *al.*, 2002). Les chercheurs sont arrivés à la conclusion que la quantité totale de HAP consommée de façon journalière chez l'humain était de 3,7 µg/d faisant de l'alimentation la voie principale d'exposition aux HAP chez les individus non exposés professionnellement (Phillips, 1999).

En outre, il existe des sources naturelles de HAP qui viennent principalement des feux de forêt ou des éruptions volcaniques (Baek et *al.*, 1991). Toutefois, ce sont les sources anthropiques qui sont considérées comme majeures. Parmi celles-ci, on retrouve : la combustion du charbon et du bois, la combustion des carburants automobile, la production d'énergie (centrale électrique au pétrole ou au charbon) ou encore les incinérateurs et le tabagisme (Wild et *al.*, 1992).

L'industrie demeure, elle aussi, une des principales sources d'émission aux HAP. De nombreuses personnes sont exposées aux HAP en milieu de travail. Les principales industries émettrices de quantités importantes de HAP sont caractérisées par des procédés utilisant des produits dérivés de la houille : goudron et brai de houille. Ces industries sont : les cokeries produisant de la coke à partir de distillation de la houille, la sidérurgie, la production d'électrodes de carbone à partir du brai, les usines d'électrolyse de l'aluminium, les industries du bitume et du goudron et les aciéries. Une augmentation de l'incidence de plusieurs types de cancers (poumons, vessie, reins, mais aussi colon, scrotum et prostate) a été observée chez des travailleurs d'alumineries, de cokeries, de fonderies et de production d'essence notamment (Boffetta et *al.*, 1997; Spinelli et *al.*, 2006).

1.3. Métabolisme et toxicocinétique du BaP

1.3.1. Absorption

Le BaP est peu soluble dans l'eau, c'est une substance lipophile facilement absorbé dans l'organisme animal et humain et ce par différentes voies d'exposition : inhalation, ingestion et

contacte cutané. La vitesse de la fraction absorbée dépend du véhicule utilisé pour l'administration (Brinkmann et *al.*, 2013) :

L'absorption par voie orale est rapide. Kawamura et *al.* (1988) ont démontré que la composition des aliments avec lesquels le BaP était administré avait un grand impact sur son absorption. Ainsi, lorsque le BaP était administré avec des aliments lipophiles, entre 42 et 50% du BaP était absorbé (en référence avec les résultats d'une injection intraveineuse). Pour d'autres types d'aliments, la proportion absorbée diminuait entre 20 et 30%.

L'absorption du BaP par voie cutanée est relativement rapide et la biotransformation *in situ* représenterait un rôle important lors du processus d'absorption selon certains auteurs (Brinkmann et *al.*, 2013; Jacques et *al.*, 2010). Dans une étude *in vivo* réalisée sur des souris, Sanders et *al.* (1984) ont observé l'absorption de 6% du BaP marqué au ¹⁴C dans l'heure qui a suivi l'application. Dans une expérience *in vitro* sur la pénétration du BaP, les chercheurs ont trouvé des différences dans l'absorption du BaP au niveau de la peau dorsale de plusieurs espèces animales. Après vingt-quatre heures, la peau de la souris a permis une pénétration de 10% de la dose appliquée (Kao et *al.*, 1985).

Lorsqu'inhalé, l'absorption du BaP est rapide, cependant, sa vitesse d'absorption dépend de la taille des particules sur lesquelles le B(a)P est adsorbé (IARC, 1983).

1.3.2. Distribution

Le BaP absorbé est rapidement distribué dans les tissus. Or, la quantité de BaP distribué dans chaque tissu dépend de la voie et du véhicule d'administration. Peu importe la voie d'administration, des niveaux détectables de BaP sont retrouvés dans tous les organes et tissus entre quelques minutes et l'heure suivant l'administration (Moir et *al.*, 1998)). Comme le BaP est une substance liposoluble, il est largement distribué dans les tissus adipeux et les glandes mammaires (Agbato, 2007). Des quantités élevées de BaP ont été également trouvées dans le foie (Foth et *al.*, 1988). La distribution importante du BaP dans le foie facilite la biotransformation par cet organe. Dans une étude par voie intra-trachéale, Weyand et Bevan (1986) ont trouvé que la plupart du BaP marqué au ³H se distribue rapidement aux poumons (60%) et dans le foie (13%) cinq minutes après l'administration et qu'environ 14% de la radioactivité étaient quantifiables dans la carcasse à ce temps. Après une heure, la radioactivité a été mesurée principalement dans la carcasse (27%), dans les intestins (24%), dans le foie (16%) et dans les poumons (15%).

1.3.3. Biotransformation

Le BaP est principalement métabolisé par le foie, notamment par les cytochromes P450 1A1, 1A2 et 1B1 (Foth et al., 1988). Cependant, il peut être également métabolisé par d'autres tissus tels que la peau, les poumons et le tractus gastro-intestinal (Autrup et al., 1982). Le système d'oxydases à fonction mixte du cytochrome P-450 est fortement impliqué dans la transformation du BaP (Lee et al., 2003). Dans une première étape (phase I) impliquant des processus oxydatifs et hydrolytiques, le BaP est activé par les cytochromes CYP1A1 et CYP1B1. Par la suite, ces dérivés réactifs sont conjugués, durant la phase II, aux acides glucuroniques, aux sulfates et au glutathion pour leur élimination.

Avant qu'il ne puisse exercer une quelconque toxicité, le benzo(a)pyrène doit être métaboliquement activé. Trois parcours ont été proposés pour son activation métabolique (Palackal et al., 2002; Caino et al., 2007; Jiang et al., 2007; Park et al., 2008) :

La première voie : implique la formation de B(a)P-dihydrodiol (BPD) à partir du parent B(a)P sous l'action combinée des CYP1A1/1B1 et de l'époxyde hydrolase (EH). Une seconde époxydation catalysée par les CYP1A1/1B1 a pour conséquence la formation de régions baies transformant le métabolite proximal du BaP (BPD), en métabolite ultime de B(a)P (+)-*anti*-benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzopyrène (Philpot et Smith, 1984), plus couramment appelé (+)-*anti*-B(a)P-diol-époxyde (BPDE) qui est un métabolite hautement mutagène et tumorigène car il forme des adduits covalents avec l'ADN, en position exocyclique N2 des résidus guanines et en N6 des adénines (Smith et al., 2000), ce qui aboutira à l'apparition de transversions G-T.

La seconde voie : Met en jeu une dihydrodiol déshydrogénase (DD), membre de la superfamille des aldo-keto réductases (AKRs) qui oxyde le BPD pour générer l'o-quinone, B(a)P-7,8-dione (BPQ) (Penning, 2004). Le BPQ forme des adduits stables et hydratés en N2-dG, N6-dA ainsi que des adduits apuriques en N7-dG. Les adduits de type N7-dG donnent lieu à des transversions G-T observées dans le proto-oncogène ras et aussi dans le suppresseur de tumeur p53. Le BPQ est capable de générer des cycles redox futiles, sources d'espèces réactives oxygénées (ERO) délétères (Jiang et al., 2007).

La troisième voie : Repose sur la formation d'un radical cation catalysé par la P450 peroxydase. Ces radicaux forment des adduits à l'ADN, dont la conséquence est la création de sites abasiques. Le radical cation très réactif et alkyle l'ADN, les radicaux cations de B(a)P génèrent des adduits apuriques comprenant B(a)P-6-C8-Guanosine, B(a)P-6-N7-guanoine et

B(a)P-N7-Adenine. La formation de ces adduits cause des transversions G-T, notamment dans le proto-oncogène ras. Les métabolites dérivés des radicaux cations, B(a)P-1,6- et B(a)P-3,6-dione peuvent aussi activer l'EGFR (epidermal growth factor receptor) *via* la génération de peroxyde d'hydrogène conduisant à l'augmentation de la prolifération cellulaire, ce qui suggère un rôle potentiel dans la promotion tumorale (Jiang *et al.*, 2007).

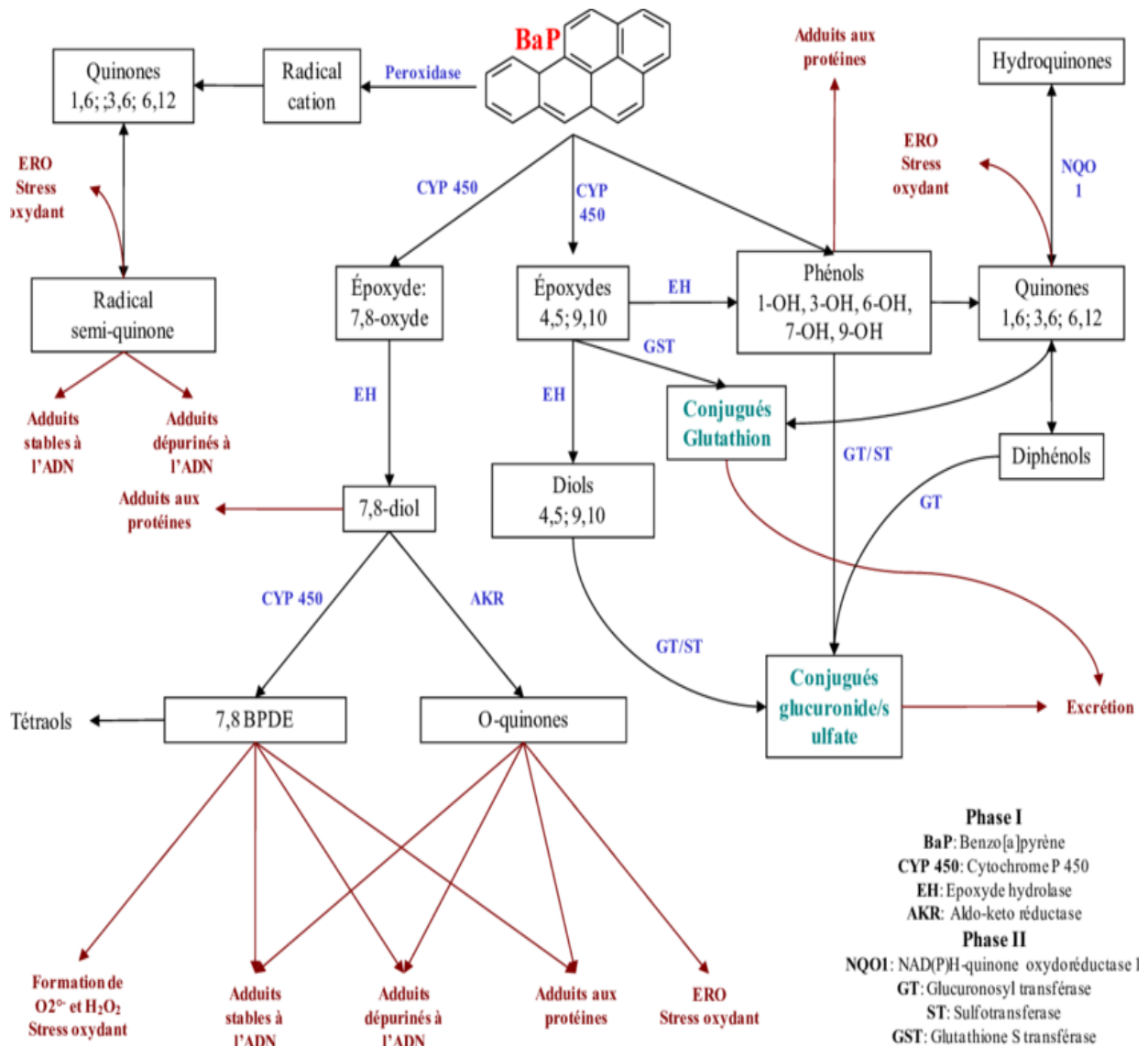


Figure 2. Activation métabolique du BaP (Wessel, 2010).

1.3.4. Élimination

Dépendamment de la voie d'exposition, le système hépatobiliaire et le tractus gastro-intestinal sont les principales voies d'élimination du B(a)P (Bonnard *et al.*, 2007). Après une

administration orale de 100 mg/ kg de BaP chez le rat, Ramesh et *al.*, (2001) ont montré que 45% de la dose est excrétée dans les urines et les fèces après 24h. Comparativement aux diols, un taux élevé de métabolites hydroxylés est détecté dans les urines et les fèces. La majorité de métabolites sont éliminées dans les fèces (70 à 75% d'une dose sous-cutanée chez la souris), Cependant, la voie d'excrétion urinaire dans ce cas est mineure (Ramesh et *al.*, 2001). Les métabolites polaires et phénoliques représentent respectivement 60 et 20% de la radioactivité détectée dans les urines. Il est estimé que 80 % du BaP métabolisé (métabolites polaires et dérivés phénoliques) est éliminé par la voie urinaire. La forme non métabolisée de B(a)P reste cependant très faible. L'élimination est moins rapide dans les tissus faiblement perfusés comparée à ceux richement perfusés. Il n'y a pas d'élimination via l'air expiré (Bonnard et *al.*, 2007).

1.4. Toxicité du benzo(a)pyrène

1.4.1. Toxicité aiguë

Les études de toxicité aiguë décrivent les effets néfastes de la substance qui résulte d'une exposition unique et a fortes doses et apparait au bout de 72heure. Lors d'une exposition cutanée au BaP, une hypersensibilité au contact et une immunosuppression de glandes sébacées ont été observés chez les animaux d'expériences. Tandis que l'administration intrapéritonéale du BaP 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 (WHO, 1998). Finalement, seulement une étude par inhalation aiguë a été documentée. Dans cette étude, les rats n'ont présenté aucune lésion dans les cavités nasales ni dans les poumons (Wolff et *al.*, 1989).

Les HAP contribuent fortement à une pigmentation locale de la peau. Les HAP peuvent aussi être à l'origine d'irritations pulmonaires et d'eczéma et de troubles de l'immunité avec en particulier une diminution des immunoglobulines G et A sériques qui a été rapportée chez des salariés travaillant dans une fonderie (Szczeplik, 1994).

1.4.2. Toxicité chronique

Les études de toxicité chronique ont pour objectif la caractérisation des effets toxiques sur un organisme vivant exposé à de faibles doses d'une substance toxique de façon continue (exposition prolongée) ou répétée. À part la cancérogénicité, l'exposition au BaP produit principalement des effets immunosuppresseurs, reproductifs et hématologiques. Il a été démontré que, chez des animaux, l'exposition *in vitro* et *in vivo* des lymphocytes à des doses

élevées de BaP avait une incidence sur la production de cellules T (Blanton et *al.*, 1986; Wojdani et Alfred, 1984). Shubik et *al.* (1960) ont également montré des effets hématologiques létaux après une seule dose intra-péritonéale de BaP sur des souris. Robinson et *al.* (1975) ont documenté que le décès des souris suite à une exposition par voie orale au BaP résulte d'une hémorragie, d'une anémie aplasique et/ou d'une pancytopenie.

Des études épidémiologiques ont montré une association entre des niveaux d'expositions professionnelles élevés aux HAP chez les salariés de certains secteurs industriels (cokerie, fonderie, utilisation de dérivés de houille...) et une augmentation des risques de cancer du poumon, de la vessie et de la peau (Bosetti, 2007 ; Chen, 2008 ; Gaertner, 2002).

1.4.3. Génotoxicité et cancérogénicité du BaP

Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) classe le benzo(a)pyrène comme cancérogène (groupe 1) reconnu pour l'être humain (IARC, 2010), du fait de son action à tous les niveaux du processus de la cancérogenèse : initiation, promotion et progression (figure 3) (Pitot, 1993).

Comme nous l'avons vu précédemment, le B[a]P, subi une activation métabolique générant des métabolites électrophiles capables de lier l'ADN mais également des métabolites capables de générer des espèces réactives de l'oxygène. La formation de ces dommages génotoxiques a un rôle dans la phase d'initiation du processus de cancérogenèse. Le BaP a des effets génotoxiques qui se résument en interactions directes avec l'ADN, compromettant ainsi l'intégrité du génome. Mais il peut aussi agir par l'intermédiaire de mécanismes épigénétiques, tout en influençant la régulation des gènes, accroissant ainsi la prolifération et la progression des tumeurs (Sadikovic et Rodenhiser, 2006).

Cette substance cancérigène intervient dans l'initiation de cancers en contribuant à la formation de molécules pouvant réagir avec l'ADN. Le BaP intervient également dans la promotion de cancers en influençant la prolifération des tumeurs par une hyper-méthylation ou hypo-méthylation de l'ADN (Sadikovic et Rodenhiser, 2006). En outre, si des mécanismes de réparation ne se mettent pas en place ou s'avèrent inefficaces, le BaP dans ce cas peut conduire à l'apoptose (la mort cellulaire programmée). De plus, le BaP agit aussi au niveau de la progression en altérant la communication entre les cellules, un processus essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire (Lee et *al.*, 2013). En agissant au niveau des jonctions adhérentes et lacunaires qui permettent les échanges entre les cellules, le BaP perturbe la

diffusion de molécules de signalisation qui contrôlent la prolifération cellulaire, l'arrêt du cycle, la survie des cellules ou leur apoptose (Tekpli et *al.*, 2010).

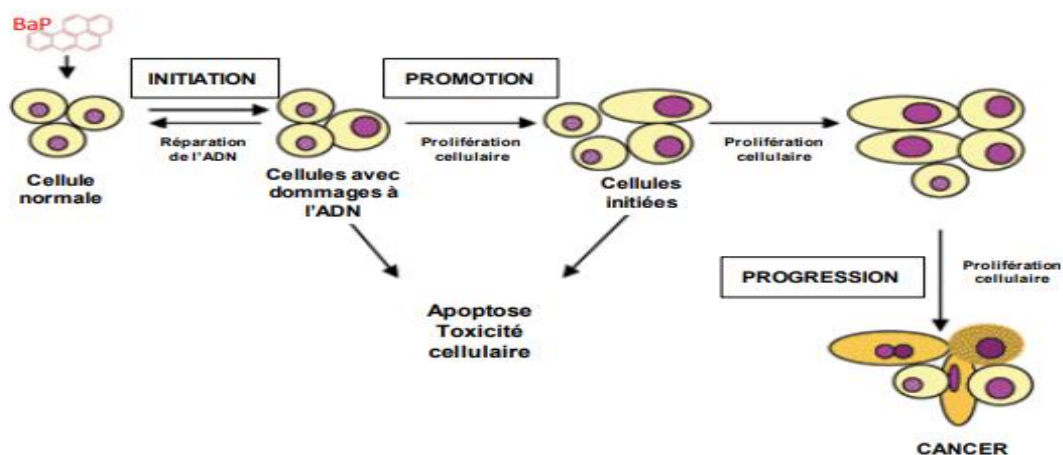


Figure 3. Étapes de la cancérogénicité induite par le benz(a)pyrène (Oliveira et *al.*, 2007).

L'exposition humaine au BaP a été associée à un risque accru de cancer dans divers tissus, notamment les poumons, la vessie, l'estomac et la peau (IARC, 2006). Ainsi, le BPDE, qui est capable de former des adduits à l'ADN entraînant des mutations permanentes, des ruptures de brin d'ADN ou d'autres modifications génétiques qui contribuent au processus de cancérogenèse (Kasala et *al.*, 2015).

La fumée de cigarette est un facteur de risque bien connu de la cancérogenèse pulmonaire. Il est également associé à la progression des cancers du poumon (Yang et *al.*, 2018). D'après Yoshino et *al.* le tabagisme était un facteur pronostique significatif pour l'adénocarcinome pulmonaire de stade I (Yoshino et *al.*, 2006). Ainsi, l'exposition au BaP peut favoriser la migration et l'invasion du cancer du poumon: Zhang et *al.*, (2016) ont démontré que le BaP favorisait la migration et l'invasion des cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 en régulant positivement l'expression de la cytokine IL8 et des chimiokines CCL2 et CCL3.

Chapitre 2. Toxicité rénale du benzo(a)pyrène

2.1. Rappel sur le rein

Les reins (figure 4. A et B), au nombre pair, sont des organes vitaux situés de part et d'autre de la colonne vertébrale, en dessous du diaphragme : Le rein droit se trouve sous un organe volumineux ' le foie', tandis que le rein gauche est situé sous la rate, ainsi le rein droit est localisé légèrement plus bas que le rein gauche (Bonsib, 2014).

Le cortex et la médullaire (figure 4.C) sont deux régions distinctes qui forment le rein : La première s'agit d'une zone superficielle de couleur brun rougeâtre tandis que la deuxième est une partie profonde et plus pâle (Chaaya, 2010).

Cet organe en forme d'haricot fait partie de l'appareil urinaire, il est d'une structure complexe organisée en un ensemble d'unités fonctionnelles nommée néphron (figure 4.D). Ce dernier est constitué d'une unité de filtration, le glomérule, suivi par un tubule dans lequel s'effectuent les remaniements de l'urine en cours de formation (Klein, 2009).

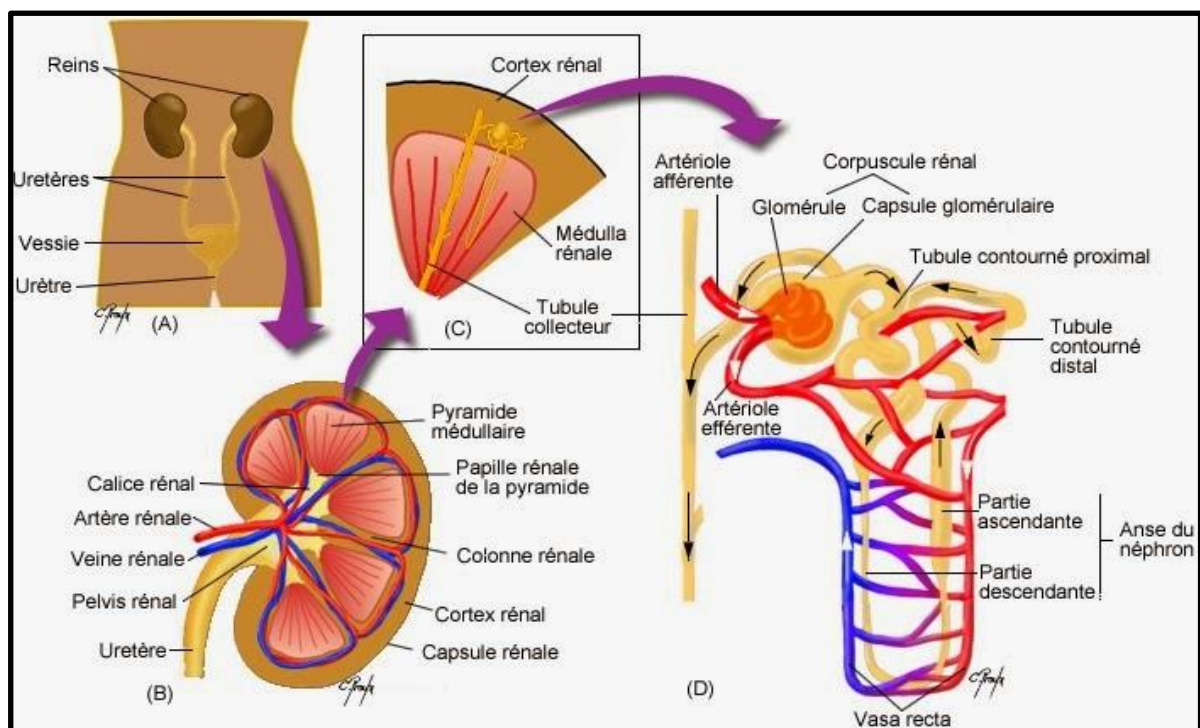


Figure 4. Anatomie du rein

4. A. Position des reins dans le corps humain. 4. B. Coupe longitudinale d'un rein.

4. C. Pyramide médullaire et néphron. 4. D. Néphron (Chaaya, 2010)

Le rein est indispensable à l'homéostasie du milieu intérieur. Ses fonctions primordiales correspondent à la régulation du volume sanguin, le maintien de l'osmolarité plasmatique et l'élimination des déchets de l'organisme ainsi que les produits de dégradation des molécules

endogènes et/ou exogènes (toxines, médicaments). L'élimination des pertes se produit via trois processus permettant d'épurer le plasma sanguin et les déchets métaboliques de l'organisme (urée, créatinine, Acide urique) tout en garantissant la recapture des éléments utiles tels que les nutriments, l'eau et certains ions. Ces trois phénomènes se résument en: la filtration glomérulaire pour filtrer le sang des capillaires glomérulaires et la former l'urine primitive, la réabsorption tubulaire qui permet l'obtention de l'urine définitive et la sécrétion tubulaire pour l'élimination dans l'urine les substances non filtrées par le glomérule. Ces processus sont généralement considérés comme un moyen pratique pour effectuer beaucoup de fonction du corps (Sylvie *et al.*, 1977 ; Chaaya, 2010).

Un rein, dans son état physiologique normal, peut assurer ses fonctions pendant très longtemps puisqu'il lui suffit d'avoir seulement 20% de ses néphrons pour fonctionner. Lorsque les lésions rénales touchent plus de 80% du rein, l'insuffisance rénale chronique (IRC) s'installe. Cette dernière représente aujourd'hui un problème majeur de santé publique qui se définit par une diminution du nombre d'unités fonctionnelles, estimé par la réduction du débit de filtration glomérulaire et se traduit par un ensemble d'anomalies rénales structurelles et de troubles cliniques (Joly, 2002).

2.2. Stress oxydant induit par le benzo(a)pyrène

Le stress oxydatif joue un rôle essentiel dans la physiopathologie de plusieurs maladies rénales. De nombreuses complications de ces maladies sont dues au stress oxydatif (Ozbek et Emin, 2012). De ce fait, lorsque la génération rénale de ROS dépasse les capacités de défense anti-oxydante naturelle de l'organisme, elle peut provoquer des lésions tissulaires rénales importantes (Hamza, 2014). L'implication du stress oxydant dans les pathologies rénales a été démontrée par un modèle d'insuffisance rénale. En effet, les patients atteints d'insuffisance rénale chronique présentent une activité anti-oxydante réduite de plasma. L'augmentation du stress oxydant est attestée par l'augmentation du malondialdéhyde (MDA) dans les érythrocytes et par la diminution des formes réduites du glutathion (Whitin *et al.*, 1998; Kaysen *et al.*, 2000).

2.2.1. Stress oxydant et espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre profond de la balance entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défense antioxydants, en faveur de leur production conduisant à des dommages potentiels cellulaires irréversibles (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer,

artériosclérose, arthrite, maladies neurodégénératives) (Durackova, 2008; Evans et Halliwell, 1999).

Les radicaux libres sont omniprésents dans notre corps, générés par des processus physiologiques normaux y compris le métabolisme aérobie et de réponses inflammatoires, pour éliminer les microorganismes pathogènes envahisseurs (Govindarajan et *al.*, 2005). Il existe majoritairement deux grandes familles d'espèces réactives: les espèces réactives de l'oxygène ROS (Reactive Oxygen Species) et les espèces réactives d'azote RNS (Reactive Nitrogen Species) (Wu et *al.*, 2013).

Les espèces réactives peuvent être d'origine endogène ou exogène. Actuellement, le terme « espèces réactives de l'oxygène » est employé pour désigner un ensemble de deux familles d'espèces: radicalaires et non radicalaires (tableau1) (De lizorieux, 2013).

Tableau 1. Les espèces réactives de l'Oxygène (Migdal, 2011).

Espèces Radicalaires		Espèces Non Radicalaires	
Anion superoxyde	O_2°	Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical hydroxyle	HO°	Acide hypochloreux	HOCl
Monoxyde d'azote	NO	Peroxynitrite	$ONOOO^{\circ}$
Grande instabilité : stabilisation par réaction avec les constituants cellulaires.		Éléments de décomposition pour la détoxification par les systèmes de défense enzymatique.	

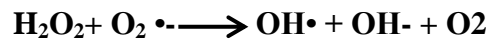
➤ Les espèces oxygénées réactives radicalaires

L'anion radical superoxyde (O_2°) est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Il est considéré comme le type le moins réactif des ERO et le radical le plus fréquemment produit dans l'organisme (Scheibmeir et *al.*, 2005), généré par la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire (Lacolley et *al.*, 2007), selon une réaction :

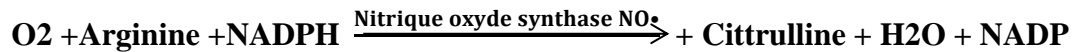


Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe^{3+}), l'ascorbate et surtout le superoxyde dismutase (Rezaire, 2012).

Plus réactif que le précédent, le radical perhydroxyle (HO_2°). C'est la forme protonée de l'anion superoxyde (Marusawa et *al.*, 2002). Ce dernier peut être alors transformé soit spontanément, soit par le superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la réaction :

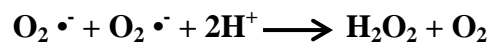


Le monoxyde d'azote (ou oxyde nitrique) ($\text{NO}\cdot$), est un radical libre ubiquitaire synthétisé dans la cellule endothéliale à partir de l'arginine et l' O_2 grâce à l'action d'enzymes appelées NO synthase (Bonfont et *al.*, 2003; Vincent et Martin, 2008)



➤ Les espèces oxygénées non radicalaires

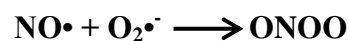
Ce sont des espèces non radicalaires qui acceptent deux électrons pour donner des produits non radicaux. Ils peuvent être des précurseurs de radicaux libres par réaction avec un métal de transition (fer et cuivre). C'est le cas du **peroxyde d'hydrogène** (H_2O_2) qui peut être formé secondairement à la dismutation de $\text{O}_2 \cdot^-$ par le superoxyde dismutase ou produit par réduction bivalente de l'oxygène grâce à un grand nombre de déshydrogénases (Winterbourn, 2015).



Comme le peroxyde d'hydrogène, l'**acide hypochloreux** (HOCl) ne rentre pas dans la définition stricte du radical. Cependant, au cours de l'inflammation, la métabolisation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux par l'enzyme, la myéloperoxydase est élevée (DebyDupont et *al.*, 1999). L'acide hypochloreux est un agent chlorant et un oxydant fort.



Le peroxynitrite (ONOO^-), une molécule au fort pouvoir oxydant générée par le $\text{NO}\cdot$ qui interagit rapidement avec l'anion superoxyde et produit du peroxynitrite beaucoup plus réactif et délétère que ses précurseurs (Murphy et *al.*, 1998).



Le paradoxe de ces radicaux libres en biologie est qu'ils constituent des espèces extrêmement dangereuses, susceptibles d'engendrer un nombre considérable de maladies, tout en étant des espèces indispensables à la vie. En effet ils ont des rôles physiologiques très importants au sein des cellules en agissant sur le fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes et à la destruction par apoptose des cellules tumorales (Ardestani et Yazdanparast, 2007; Touafek, 2010; Marfak, 2011).

2.2.2. Production de ROS par le BaP

La métabolisation du B[a]Pdiol par les dihydrodiol déhydrogénases (DD), produit un catéchol qui subit deux oxydations à un électron avec la production concomitante d'espèces réactives de l'oxygène pour former des HAP *o*-quinones (Figure 5) (Smithgall, 1988).

La première oxydation produit un anion *o*-semiquinone et du peroxyde d'hydrogène suivi par une deuxième oxydation qui conduit à la formation de *o*-quinone et d'un anion superoxyde. En présence d'équivalents réducteurs cellulaires (ex: NADPH), les HAP *o*-quinones peuvent aussi être réduites en catéchols entraînant des cycles rédox supplémentaires qui amplifient la production d'espèces réactives de l'oxygène H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ (Penning, 1996). En présence de métaux rédox tels que Fe^{2+} ou Cu^+ , H_2O_2 peut donner $\cdot OH$.

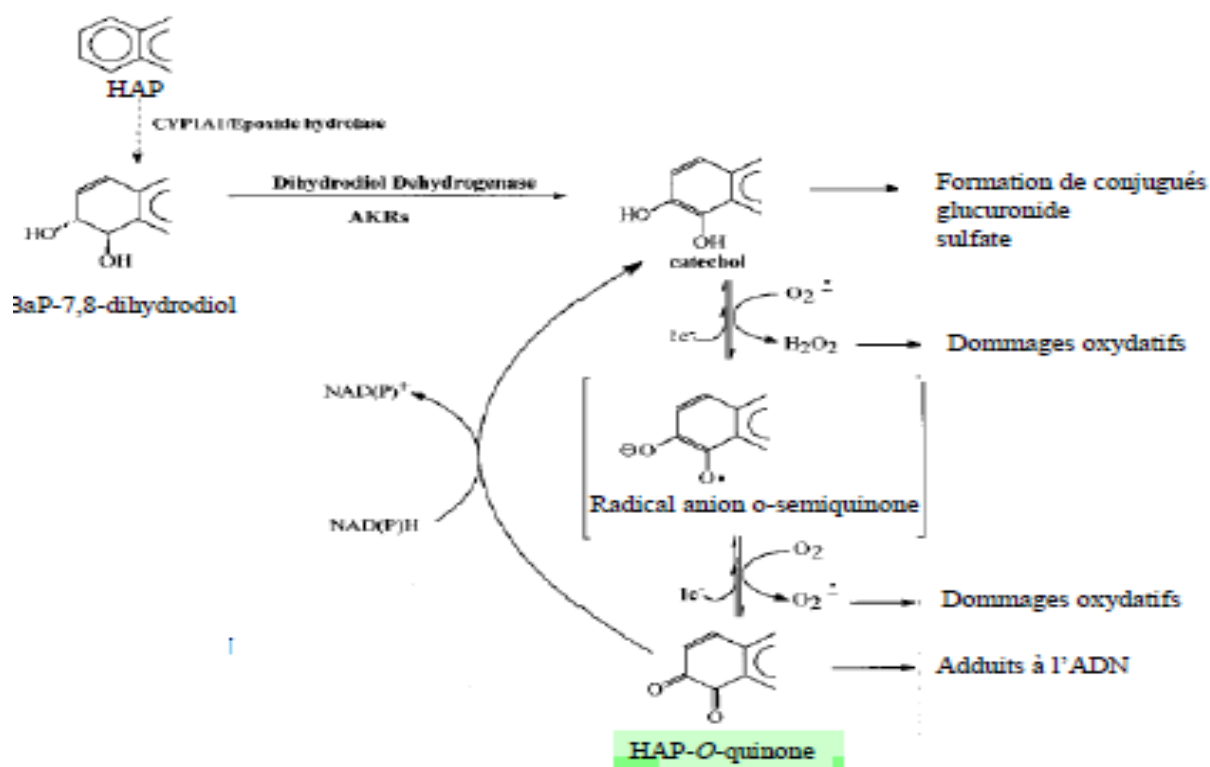


Figure 5. Production de ROS par le B(a)P par la voie des quinones (Smithgall, 1988).

Ces espèces réactives conduisent à la génération de bases oxydées dans l'ADN, notamment au niveau de la guanine (7,8-dihydro-8-oxo-guanine). De plus, $\cdot OH$ est à l'origine de cassures de brins et d'une augmentation de la peroxydation lipidique membranaire (Penning, 1999).

2.3. Dommages oxydatifs des biomolécules par le benzo(a)pyrène

Le benzo(a)pyrène a été identifié comme un facteur de risque majeur du stress rénal. En effet, les radicaux libres qui se forment à partir de la synthèse du métabolite réactif 7,8-diol-9,10-époxyde-benzo(a)pyrène par le cytochrome P450, ont la capacité d'initier la

peroxydation des acides gras, les dommages aux membranes et la perte d'activité des enzymes anti-oxydantes (Asha, 2011).

2.3.1. Dommages oxydatifs à l'ADN nucléaire et mitochondrial

La molécule de l'ADN constitue une cible cellulaire importante pour les attaques radicalaires. Les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des purines pyrimidines et du squelette désoxyribose provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques. Ces altérations peuvent aboutir soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à l'implication des erreurs de réplication ou encore à une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogenèse (Valko *et al.*, 2006).

Le BPDE se lie préférentiellement aux groupes amino exocycliques de la dGuo et dAdo de l'ADN. Les adduits principaux du BPDE se forment sur les atomes N2 de la dGuo, N6 de la dAdo (Marie, 2008).

Les adduits de la voie du radical cation ne peuvent être produits que si le radical cation est produit à proximité de l'ADN ou de nucléosides. Ce sont les adduits dépurinants B[a]P-N7-Gua, B[a]P-C8-Gua ainsi que les adduits stables B[a]P-C8-dGuo, B[a]P-N2-dGuo et B[a]P-N3-dGuo. En présence de dAdo l'adduit B[a]P-N7-Ade est formé.

Les HAP o-quinones peuvent réagir avec les groupes amino de la dGuo en position N2 ou en position N6 de la dAde pour former des adduits stables. Elles peuvent également former des adduits dépurinants en position N7 de la Gua ou N7 de l'Ade. Des adduits dépurinants en position C8 de la Gua mais aussi C8 et N3 de l'Ade sont également possibles (figure 6) (Penning, 1999).

Les ERO résultants de la métabolisation du Bap entraînent des cassures simple brins, double brins ainsi que des modifications au niveau des purines ou pyrimidines ou du désoxyribose. Parmi ces ERO, le radical hydroxyl (OH°) peut attaquer la liaison entre la base et le sucre générant un site abasique ou réagir avec le 2-désoxyribose ce qui conduit à la formation de cassures de chaînes d'ADN par arrachement d'un atome d'hydrogène (Klaunig, 2004).

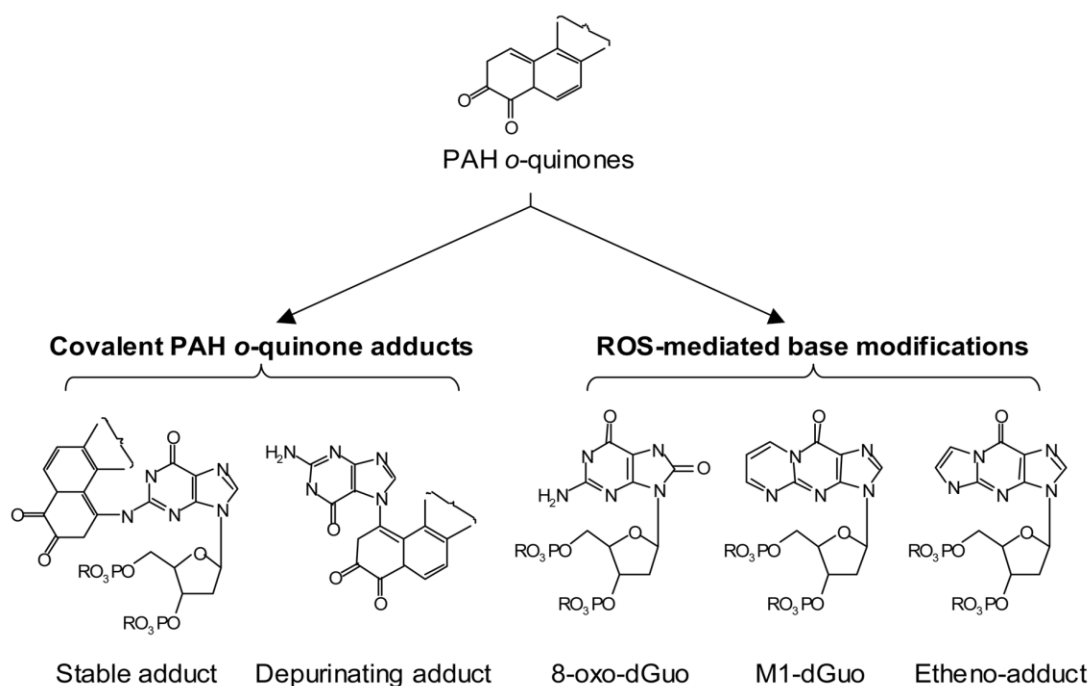


Figure 6. Spectre des modifications de l'ADN causées par BPQ (Park et al., 2006)

Cet OH° ainsi que d'autres ERO sont à l'origine d'oxydation de bases. La plus fréquente survient en position 8 de la guanine, donnant naissance à la 8-oxo-7,8-dihydro-2'déoxyguanosine (8-oxodGuo). Ce produit de l'oxydation de l'ADN peut être facilement dosé dans les urines et est considéré comme un marqueur de carcinogénèse (Valko et al., 2006).

2.3.2. Dommages oxydatifs aux lipides : la peroxydation lipidique

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque oxydatives. Les membranes sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle HO° . Ce radical libre est capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde (ROO^\bullet). Cette réaction de peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Ce processus génère des hydro peroxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques, le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonéal. Ainsi un unique évènement oxydatif peut altérer de nombreuses molécules lipidiques et induire une accumulation d'hydro peroxydes dans les membranes ce qui réduira leur fluidité ainsi que l'activité des protéines

transmembranaires (Valko et *al.*, 2006). Une augmentation de la peroxydation lipidique est observée sous l'effet du B(a)P. Le MDA peut réagir avec les bases G, A, et C de l'ADN et former des adduits M1G, M1A, et M1C(3-(2'-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)pyrimido[1,2-*a*]purin-10(3H)one) respectivement, qui sont des lésions mutagènes (Valko et *al.*, 2006).

2.3.3. Dommages oxydatifs aux protéines

Les protéines sont les constituants cellulaires les plus abondants et sont par conséquent des cibles importantes des radicaux libres (Thannickal et Fanburg, 2000). Une altération structurale mineure d'une protéine peut induire une modification dans le fonctionnement de celle-ci. Comme pour les lipides, c'est le radical hydroxyle qui est le plus réactif responsable des altérations oxydatives des protéines introduisant de nouveaux groupes fonctionnels telles que les fonctions hydroxyles ou carbonyles qui contribuent aux altérations de la fonction des protéines, la modification de leur conformation et de leur fragmentation. L'oxydation des protéines peut également induire des réticulations inter- et intra-protéines par addition d'un groupement lysine sur le groupement carbonyle d'une protéine oxydée, par oxydation d'un groupement sulfhydryle (-SH) des résidus cystéine formant ainsi des ponts disulfures ou par oxydation des résidus tyrosine formant des ponts Tyr-Tyr. De plus, la nitration des protéines par addition du peroxy-nitrite sur les fonctions tyrosine peut induire de sévères modifications fonctionnelles (Baudin, 2006). En effet, la tyrosine est un acide aminé particulièrement impliqué dans les voies de signalisation, en particulier par les réactions de phosphorylation/déphosphorylation. Ainsi le stress oxydant peut avoir un effet sur la fonction propre d'une protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire (Valko et *al.*, 2006). Le BPQ possède un profil toxicologique indésirable par la formation d'adduits avec les protéines et le glutathion en plus des adduits avec l'ADN et l'ARN (Burczynski et Penning, 2000).

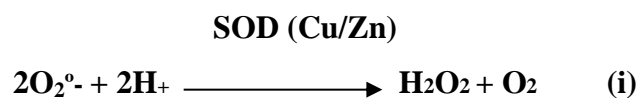
2.4. Les systèmes de défenses antioxydants

Notre organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques développés au cours de l'évolution (Hennebelle, 2006). La molécule ou le microconstituant capable d'interférer avec les radicaux libres est appelée antioxydant qui englobent toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Park et *al.*, 2001).

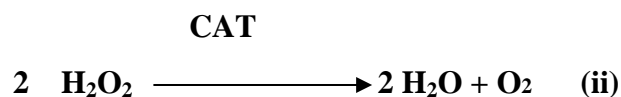
➤ **Les antioxydants enzymatiques**

L'organisme se défend contre les radicaux en synthétisant des enzymes qui les neutralisent. Parfois ces enzymes nécessitent des oligo-éléments (Cu, Zn, Mn, Se, Fe) comme cofacteurs pour pouvoir exercer leur activité enzymatique (Auberval, 2010). Les enzymes principales sont :

- (i) les superoxydes dismutases (SOD) qui catalyse la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène selon la réaction :

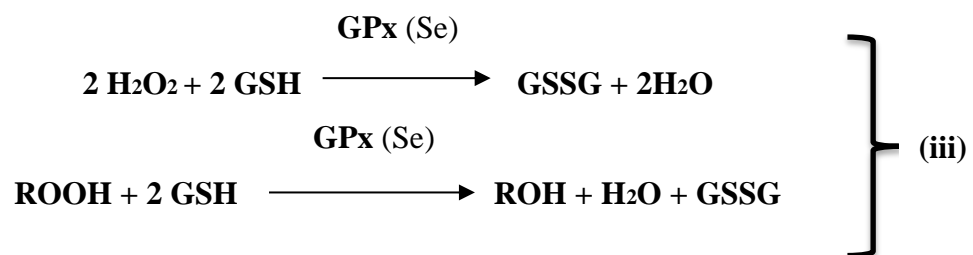


- (ii) la catalase (CAT) qui est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire :



- (iii) les Glutathion peroxydases (GPx), correspond à une sélénoenzyme qui en présence de glutathion réduit (GSH), qui est utilisé comme donneur d'hydrogène, elle réduit l' H_2O_2 en H_2O et les hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH). il s'en suit la formation du glutathion oxydé (GSSG) :

- (iv)



- (v) Et les glutathion S-transférase (GST), qui réduisent les hydroperoxydes en alcools mais ne réduit pas H_2O_2 (Vincent et *al.*, 2004).

L'exposition au B(a)P diminue le statut antioxydant enzymatique et non enzymatique (GPx, SOD, CAT et glutathion) qui protègent les cellules rénales des dommages oxydatifs (Sinha, 2008).

➤ **Les antioxydants non enzymatiques**

Contrairement aux enzymes antioxydantes, ce système fait appel à des molécules non enzymatiques d'origine endogène ou exogènes (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux composés réducteurs d'origine métabolique. Ces composés antioxydants sont produits dans les cellules de l'organisme comme l'acide lipoïque, L-arginine, Ubiquinone, l'acide urique, la mélatonine, la transferrine mais aussi le glutathion qui est largement présent sous forme réduite. Ce dernier est capable de réagir avec les radicaux HO•, RO₂•, RO•, HO₂, ONOO-, et l'acide hypochloreux HOCl (Favier, 2003; Masella et *al.*, 2005; Pham-Huy et *al.*, 2008).

L'organisme peut tirer profit de nombreux antioxydants exogènes naturels présents dans son alimentation (Pham-Huy et *al.*, 2008 ; Kalam et *al.*, 2012). Les antioxydants chimiques exogènes, eux, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques. En effet leur rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des EOR, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (Christelle, 2006).

Chapitre 3. La propolis

3.1. Origine et composition chimique de la propolis

La propolis, appelée aussi colle d'abeille, est le nom générique d'une substance naturelle, complexe, synthétisée à partir d'une série de substances résineuses et gommeuses collectées, par les abeilles ouvrières, sur de différentes parties de végétaux (les bourgeons, blessures, écorces, et arbres), et rapporté à la ruche afin de la modifier en la mélangeant avec certains de leurs propres sécrétions salivaires (Donadieu, 2008 ; Valcic *et al.*, 1999).

Le sens étymologique de la propolis, « pro » (devant) et « polis » (cité), résume bien ses rôles, qui incluent, le maintien de la ruche exempte de bactéries et de champignons pathogènes, servant de support structurel pour sceller les fissures et les trous, régulant la température à l'intérieur de la ruche et empêcher l'entrée d'autres organismes (Boisard, 2014).

La propolis est une substance résineuse, de nature lipophile, de consistance dure et qui, une fois chauffée, devient souple, gommeuse et très collante (Marcucci *et al.*, 1998 ; Bankova *et al.*, 2000). La propolis brute est composée principalement de résines, de cire et d'acides gras et d'huiles essentielles (tableau 2).

Tableau 2. Composition chimique de la propolis brute (Pietta *et al.*, 2002).

Composition en ordre	Composition par groupes	Quantité
Résines et baumes	Flavonoïdes, acides phénolique+ester	45-55%
Cire et acides gras	La cire d'abeille et des plantes	25-35%
Huiles essentielles volatiles	Anéthol et eugénol +++	10%
pollen	Protéines (6acides aminés libre > 1%) Arginine et proline jusqu'à 45% du total	5%
Autre composés organiques et substance minérales diverses	Cétone, lactones, quinones, stéroïdes, acides benzoïque, vitamine A/B, sucre ; 14traces de minéraux, silice et zinc sont les plus connus.	5%

Les résines contiennent principalement des flavonoïdes (figure 7) qui contribuent grandement aux activités pharmacologiques de la propolis. Parmi eux, on cite la galangine et la pinocembrine qui sont des substances antimicrobiennes et antifongiques, la quercétine et la kaempféride qui ont une action antispasmodique et antioxydante. Ces substances ont un large

spectre de propriétés biologiques, telles que les effets antibactériens, antiviraux et anti-inflammatoires. Ainsi la quantité de flavonoïdes est utilisée comme critère pour évaluer la qualité de la propolis (Huang et *al.*, 2014).

De plus des acides phénoliques et leurs esters, qui semblent être les plus dominants dans la composition de la propolis. En effet ce sont les principaux composés responsable des activités biologiques, ainsi que des composés organiques possèdent un ou plusieurs noyau aromatiques, aux quel sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles libre ou engagé dans une fonction ester, ether ou hétéroside (Branen et *al.*, 1980). Parmi ces polyphénols on trouve principalement : l'acide caféique et ses dérivés (figure 7) au fort pouvoir antioxydant et antalgiques, l'acides cinamique (antiseptique et antifongique), l'acides et l'alcool benzoïque, ainsi que l'acide férulique (puissant antioxydant et anti- inflammatoire) (Cuvillier, 2015).

En outre, la propolis contient de la cires, des huiles essentielles, de pollen et divers composés organiques en outre des minéraux tels que le magnésium, calcium, fer, zinc, le cuivre, et certains vitamines comme D, C, E, H, B1, B6 et la provitamine A (Park et *al.*, 2002; Pietta, 2002).

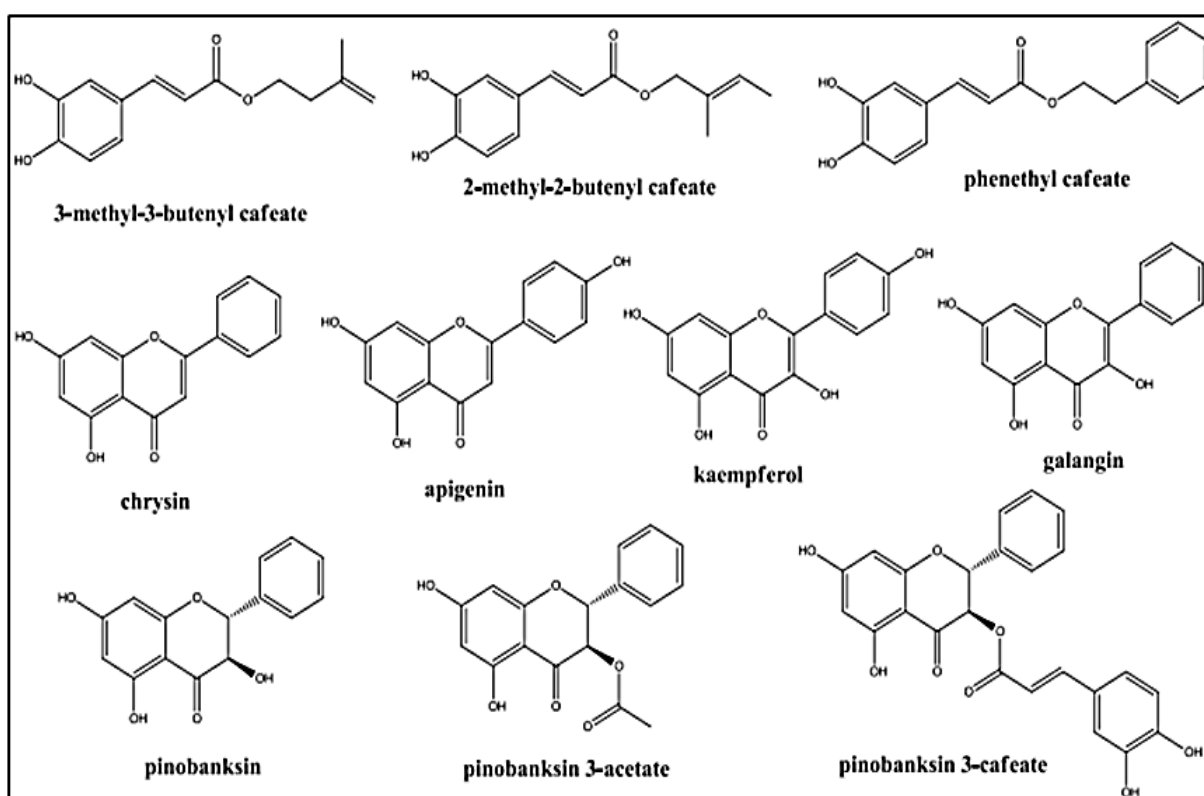


Figure 7. Principaux polyphénols et flavonoïdes détecté dans la propolis algérienne (Baghdad, 2018).

La composition chimique de la propolis varie selon l'origine botanique (flore botanique qui se situe à proximité de la ruche), l'espèce d'abeille, le temps de la récolte et la zone géographique (Tableau 3) (Negri et al, 2000 ; Popova et al., 2002).

Tableau 3. Types de propolis les plus répandus : origine des plantes et leurs constituants majeurs (Sforcin et al., 2011).

Type de propolis	Origine géographique	Origine Botanique	Principaux constituants
Peuplier	Europe, Amérique du Nord, régions non tropicales de l'Aisie,N	<i>Populus ssp.</i> <i>P.nigra L.</i>	Flavones, flavonones, acides cinnamiques et ses esters
Verte du Brésil	Brésil	<i>Baccharis spp.</i> Principalement <i>B.dracunculifolia</i> <i>DC.</i>	Dérivés prénylés de l'acides coumarique, acides diterpéniques
bouleau	Russie	<i>Betula verrucosa</i>	Flavones, flavonols, flavonones, sesquiterpènes
Propolis rouge	Cuba, Brésil, Mexique	<i>Dalbergia spp.</i>	Isoflavonoïdes (isoflavanes, pterocarpanes)
Méditerranéenne	Sicile, Grèce, Grète, Malte	Famille : cupressaceae	Acides diterpéniques principalement de type labdane
Clusia	Cuba, Venezuela	<i>Clusia spp.</i>	Benzophénones polyisoprénylées
Pacifique	Région du pacifique (Okinawa, Taiwan, Indonésie)	<i>Macaranga tanarius</i>	Prényl – flavonones

L'Algérie possède un riche patrimoine naturel et une grande variété de paysages et de zones écologiques en allant des zones côtières au désert et à la montagne. Ces régions tempérées possèdent de la propolis à activités biologiques considérables (Amirat, 2014 ; Soltani et al., 2017).

Dans ce contexte, des études comparatives, dans quatre régions algériennes (Tlemcen, Guelma, M'sila et Tzi-Ouzou) ont révélé que la propolis est récoltée à 80% sur les bourgeons de peuplier (*Populus sp*). En effet, les résultats d'analyse des composants des échantillons ont été identiques et confirmaient que le peuplier était la principale source de cette précieuse substance, sauf pour l'échantillon de tizi ouzou qui comportait des composants différents (Moudir, 2004).

3.2. Activités biologiques et thérapeutiques de la propolis

La propolis est un produit, vert brunâtre, naturel utilisé en médecine traditionnelle depuis l'Antiquité en raison de ses divers effets attribués à ces composés, en particulier les flavonoïdes (Soltani et *al.*, 2017).

3.2.1. Activité anti-oxydante

L'effet antioxydant d'un composé ou d'un extrait correspond à sa capacité à diminuer ou à limiter les réactions d'oxydation. Ainsi, La propolis possède un potentiel antioxydant, provient de la double liaison avec l'Ether d'énol ciblée par diverses espèces d'oxygène réactif. Cette activité est positivement corrélée avec sa teneur en polyphénols, tels que l'acide phénylique d'acide caféique (CAPE) et les acides cinnamiques, susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules (Bonvehí et Gut, 2011 ; Kumazawa et *al.*, 2004).

L'étude de Gülçin et al (2010) a démontré que la propolis peut chélater les ions ferriques (Fe^{3+}), cuivriques (Cu^{2+}) et ferreux (Fe^{2+}), piéger la DPPH° et inhiber la peroxydation lipidique. Plus spécifiquement, l'étude de Mouhoubi-Tafinine et *al.*, (2016) sur l'effet antioxydant de la propolis algérienne, estimé par la méthode de réduction du ferricyanure de potassium, a révélé que les échantillons de cette propolis sont riches en antioxydants (polyphénols, flavonoïdes, vitamine C et caroténoïdes) et que les composés phénoliques sont responsables du pouvoir réducteur et donc de l'activité anti-oxydante. Et Suivant les résultats obtenus par l'étude de Ferhoum (2010), la propolis du Sahara présente une meilleure activité antioxydant. Aussi, l'étude d'Alyane et *al.* (2008) a démontré l'effet bénéfique de la propolis algérienne, précisément celle de la Wilaya de Jijel, comme antioxydant contre la toxicité de la doxorubicine. Les mêmes résultats ont été obtenus par Kebsa et *al.* (2014), qui ont montré que La fraction poly-phénolique de la propolis récoltée de la wilaya de Jijel protège le tissu hépatique du stress oxydatif en protégeant les fonctions mitochondriales et en renforçant les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques. Par rapport aux études *in vivo*, Sobočanec et *al.* (2006) et Okutan et *al.* (2005) ont démontré que la propolis réduit significativement la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumons, cerveau) avec une modulation de l'expression des enzymes antioxydants (catalase, SOD, GPx).

L'effet protecteur de la propolis est en étroite corrélation avec ses propriétés anti-oxydantes (Banskota et *al.*, 2000). Dans ce contexte, la propolis, en particulier ses composés phénoliques, sont connus pour avoir un effet hépato-protecteur (Lin et *al.*, 1997 ; Ramirez et *al.*, 1997 ;

kebsa et *al.*, 2014), cardioprotecteur (alyane et *al.*, 2008) et réno-protecteur (Boutabet et *al.*, 2011 ; Aldahmash et *al.*, 2016).

3.2.2. Activité anti-cancéreuse et antiproliférative

Les propriétés anti-carcinogènes de la propolis sont dues à leurs richesses en flavonoïdes. Toutefois cette action ne se limite pas seul à ces composants, la quercétine, dérivé de l'acide caféique, est aussi identifié comme étant inhibiteur tumoral (Banskota et *al.*, 2002 ; Huleihel et Ishano, 2001).

De très nombreuses études ont été réalisées sur l'activité anti-tumorale de la propolis et de ses principaux constituants. Valente et *al.* (2011) ont signalés l'activité anti-tumorale de la propolis portugaise, à l'aide de cellules rénales normales et cancéreuses dérivées de patients atteints d'un carcinome à cellules rénales humaines (RCC), et ont montré que l'extrait méthanolique de la propolis portugaise présentait une toxicité sélective contre les cellules malignes par rapport aux cellules normales et que la croissance du RCC in vitro était fortement inhibée. De leur côté, Said et *al.* (2010) ont montré que des extraits de propolis brutes inhibent le développement de la carcinogenèse mammaire et réduit le développement de tumeurs pulmonaires chez les souris.

Basé sur sa forte concentration en flavonoïdes et en composés phénoliques, la propolis a été l'objet de plusieurs études pour la mise en évidence des effets antiprolifératifs sur divers modèles in vivo et in vitro. La propolis, plus spécialement la propolis verte (l'Artepelline C) et la propolis du peuplier (CAPE), réduisent l'angiogenèse par la limitation de la néo-vascularisation, l'inhibition de la prolifération et de la migration cellulaires, tout en modulant l'expression de certains facteurs tels que VEGF, TNF ou TGF, et ce, de manière dose-dépendante (Izuta et *al.*, 2009; Song et *al.*, 2002; Ahn et *al.*, 2007 ; Ahn et *al.*, 2009; Keshavarz et *al.*, 2009). De plus l'analyse chimique de la propolis algérienne a montré la présence de divers composés, comme la galangine et l'acide (+)-chicorique, à effet antiprolifératif (Boutabet et *al.*, 2011; Segueni et *al.*, 2011).

3.2.3. Autres activités de la propolis

De nombreuses autres propriétés biologiques et pharmacologiques sont attribuées à la propolis, y compris la régénération des tissus qui a été confirmé par une étude de Oztürk et *al.* (1999). Des effets cardio protecteurs (Chopra et *al.*, 1995 ; Alyane et *al.*, 2008), et des effets immuno-modulatrices (Sayed et *al.*, 2009). La propolis exerce également une action

antiulcéreuse (Tossoun et *al.*, 1997; Boyanova et *al.*, 2005). Une activité antimicrobienne, attribué à la sommes des composants de la propolis (Kujumgiev et *al.*, 1999), une activité antibactérienne, contre les deux types de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, à la fois aérobies et anaérobies, (Bankova, 2005; Bankova et *al.*, 2007). Une activité antifongique, dirigée contre de nombreuses levures, (Koc et *al.*, 2011) et une activité anti-inflammatoire, sur différents modèles *in vivo* d'arthrite, d'œdème de la patte ou d'inflammation chronique ou aiguë (Ramos et Miranda, 2007) ont également été rapportés.

3.3. Toxicité et effet pro-oxydant de la propolis

La toxicité de la propolis est très faible, son utilisation dans la pathologie humaine et vétérinaire démontre d'une manière générale sa parfaite innocuité pour l'organisme humain ou animal aux doses raisonnables: chez le rat la DL₅₀ d'un extrait ethanologique de la propolis a été évalué à 15g/kg (Castaldo et Capasso, 2002; Cardinault et *al.*, 2012). Cependant, Hrytsenko et *al.* (1977) ont reporté une DL₅₀ de 2050 mg/kg, Avrouest-Grand et *al.*, (1994) l'ont rapporté à une valeur de 7340 mg/kg. L'administration orale de 200 à 1220 mg/kg/j de l'extrait éthanologique de la propolis (EEP) pendant 7-10 jours, n'a entraîné aucun effet nocif selon Higashi et De Castro, (1995). De plus, l'extrait ethanologique de la 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 respectivement, n'a montré aucun effet toxique (Segueni, 2011). L'étude de kebsa et *al.* (2007), a montré que d'administration quotidienne de l'extrait éthanologique de la propolis de Jijel à 100mg/kg/j pendant 60jours n'a aucun effet toxique sur les rats, par contre elle permet de renforcer les capacités et les défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques de l'organismes.

Cependant, les effets indésirables les plus fréquentes de la propolis sont des réactions allergiques, principalement chez les personnes possédant déjà un terrain allergique de contacts (dermatose, eczéma) avec un allergène bien identifié : le caféate de prényle et aussi des allergies aux piqûres d'abeilles (Burdock, 1998; Gardana et Simonet, 2011).

Il est bien connu que la propolis présente des effets anti-oxydants grâce à sa teneur en flavonoïdes. En revanche, ces flavonoïdes sont susceptible d'avoir des effets pro-oxydants (Kessler et *al.*, 2002). Cette activité résulte de leur capacité d'auto-oxydation et de génération des initiateurs de l'oxydation, comme le peroxyde d'hydrogène (Laughton et *al.*, 1989 ; Yen et *al.*, 1997). Cependant, l'étude de Sobočanec et *al.* (2006) a démontré que la propolis peut être pro-oxydante à la dose de 300 mg/kg.

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de toxicologie moléculaire, à l'université de Jijel. Notre étude porte sur l'évaluation, *in vivo*, de l'effet protecteur de la propolis Algérienne contre la toxicité rénale aigue du benzo(a)pyrène.

Partie 1. Etude phytochimique et activité anti-radicalaire de la propolis

1.1. Récolte de la propolis

La propolis utilisée dans cette étude a été récoltée pendant la période du printemps 2019, à partir des ruches de la région de *Chekfa (Jijel)* et ce par grattage et raclage des cadres et des parois de la ruche.

1.2. Préparation de l'extrait éthanolique de la propolis

L'extraction des polyphénols de la propolis a été réalisée en se basant sur le protocole décrit par Lahouel et *al.* (2004) et Kebsa et *al.* (2007). Après avoir été coupé en petits morceaux, la propolis est soumise à une extraction par macération dans l'éthanol 96% (20g de propolis pour 100 ml de l'éthanol) sous agitation et à l'abri de la lumière pendant 7 jours. Après filtration sur papier Wattman N°4, pour la séparation des insectes et des résidus de plantes et tout type d'impuretés, le filtrat est évaporé à 80 ° C en utilisant un évaporateur rotatif (évaporateur E100, Heidolph) à 40°C. L'extrait obtenu constitue l'extrait éthanolique de la propolis (EEP).

1.3. Dosage des polyphénols totaux

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par Singleton et Rossi (1965) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. L'interaction entre ce réactif, qui est un acide de couleur jaune, et les résidus phénoliques forme un complexe coloré en bleu dont l'intensité de coloration est proportionnelle avec la concentration des polyphénols dans l'extrait.

A 250µl de l'extrait, 1 ml d'eau distillée et 250µl du réactif Folin-Ciocalteu (5%) sont ajoutés. Après 5 mn de repos, 1ml de Na₂CO₃ (bicarbonate de sodium) (7,5%) sont additionnés, puis le mélange est incubé pendant 60 à 90 mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, et en utilisant un spectrophotomètre de type ultraspec 100 pro, la densité optique (DO) est lue à 760nm.

La détermination de la teneur en composés phénoliques dans l'extrait est basée sur la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (entre 0 et 100µg/ml) (Annexe 1). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent acide gallique par gramme de propolis. Tous les dosages ont été réalisés 3 fois.

1.4. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage des flavonoïdes totaux est basé sur le test colorimétrique utilisant le chlorure d'aluminium, comme décrit par Dewanto et *al.* (2002). Il est basé sur la formation d'un complexe jaune entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium (Figure 8). Pour le dosage, 250 µl de l'extrait sont mélangés avec 75µl de NaNO₂ (5%). Après un repos de 6 mn, 150 µl d'AlCl₃ (2%) et 500 µl de NaOH (1M) sont ajoutés, le volume est complété à 2,5 ml par l'eau distillée. Enfin une lecture de la DO à 510 nm est effectuée.

La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme de propolis, en utilisant une courbe d'étalonnage de la quercétine (entre 0 et 200µg/ml) (Annexe 2). Tous les dosages ont été réalisés 3 fois.

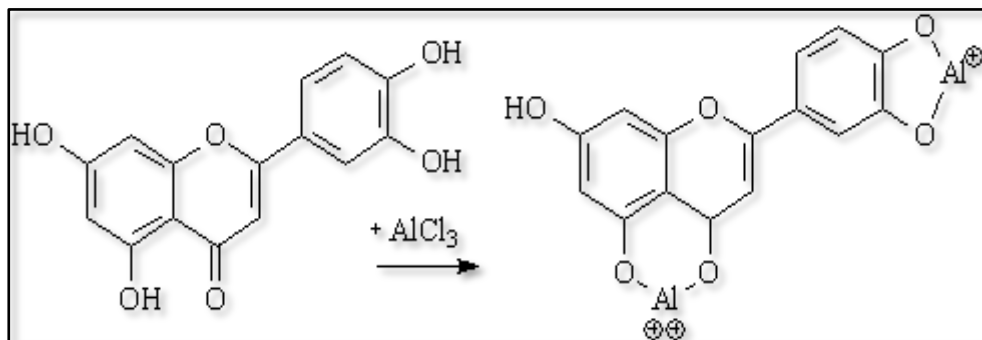


Figure 8. Réaction entre AlCl₃ et flavonoïdes (Lagnika, 2005)

1.5. Evaluation de l'effet anti-radicalaire par le test au DPPH° (2.2. Diphenylpicrylhydrazyl)

La méthode au DPPH°, comme décrite par Ancerewicz et *al.* (1998) a été utilisée pour la détermination de l'effet scavenger ou la capacité de piégeage des radicaux libres de l'extrait éthanolique de la propolis. Il s'agit d'une méthode rapide, simple et peu coûteuse avec la capacité de mesurer l'activité anti-radicalaire des extraits en utilisant le radical libre stable (DPPH°).

Le principe de cette méthode est basé sur la capacité des extraits à réduire le radical DPPH°, le DPPH° est réduit (DPPH-H) et change de couleur, du violet vers le jaune, quand il réagit avec un composé antioxydant qui peut donner les protons hydrogènes, ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 515nm. Les deux formes radicalaires (1) et réduite (2) du DPPH° sont représentées dans la figure 9.

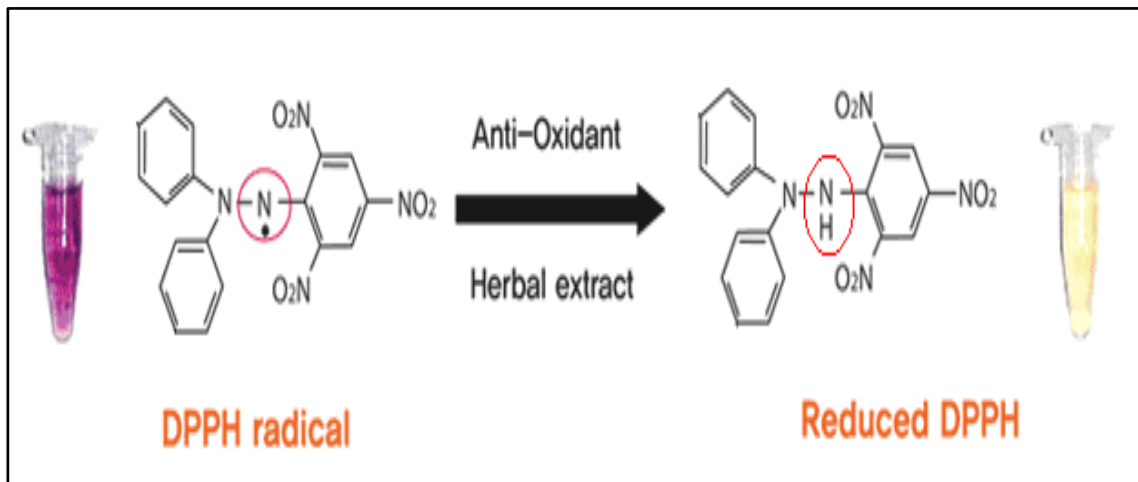


Figure 9. Forme radicalaire et réduite du DPPH° (Brand et al., 1995)

Pour la réalisation de ce test, une cuve de mesure est remplie avec : 1,5 ml de la solution éthanolique du DPPH° (100µM) et 15µl de l'extrait à tester à différentes concentration (0, 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200µg/ml). La mesure de la DO s'effectue à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Ultrospec 100 pro) et ce après 30 mn d'incubation. L'acide ascorbique est utilisé comme standard aux mêmes concentrations utilisées pour la propolis. Tous les dosages ont été réalisés 3 fois. L'effet piègeur est déterminé en pourcentage de réduction en prenant le 100% du control (DPPH seul) selon la relation suivante:

$$\% \text{ de réduction} = \left[\frac{AC - AE}{AC} \right] 100$$

Avec :

- ✓ **AC** : absorbance du contrôle après 30mn.
- ✓ **AE** : absorbance de l'essai après 30mn.

1.6. Evaluation du pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène est un dérivé non-radicalaire de l'oxygène, considéré comme toxique pour les cellules, car il permet la formation des radicaux hydroxyles à l'intérieur de la cellule.

Le piégeage du H₂O₂ est déterminé par la méthode décrite par Ruch et *al.* (1989). Brièvement, une solution de H₂O₂ (10 mM) est préparée dans un tampon phosphate (0.1M, pH=7,4). Le mélange réactionnel est composé de 0.75ml de l' H₂O₂ (10 mM) de et de 1ml de l'EEP à différentes concentrations (0, 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 et 200µg/ml). Les valeurs de l'absorbance sont mesurées à 240nm après 30 min d'incubation à l'abri de la lumière et à température ambiante contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. Tous les dosages ont été réalisés 3 fois. L'acide ascorbique est utilisé comme standard aux mêmes concentrations utilisées pour la propolis. Le pourcentage de piégeage de H₂O₂ par l'extrait est calculé selon la formule suivante:

$$\text{H}_2\text{O}_2 (\%) = \left[\frac{\text{A}_0 - \text{A}_1}{\text{A}_0} \right] \times 100$$

Avec :

- ✓ **A₀** : absorption de H₂O₂.
- ✓ **A₁** : absorbance de H₂O₂ en présence de l'extrait.

Partie 2 : Evaluation de l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité rénale du B(a)P *in vivo*

2.1. Entretien et traitement des animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris male de souche *Wistar* (Institut Pasteur, d'Alger-Algérie-) pesant environs 30g. Dès leur réception, les souris sont maintenues dans l'animalerie de la faculté des sciences de l'université de Jijel, répartis en 4 lots, dans des

conditions standard : température ambiante (22 ± 2) °C, humidité relative de 60% et à un cycle de lumière/obscurité de 12/12h. Avec un accès libre à la nourriture et à l'eau.

L'extrait éthanolique de la propolis et le benzo(a)pyrène ont été administrés aux souris selon le protocole suivant:

Lots 1 (Témoin): les souris, au nombre de trois, reçoivent quotidiennement 0.2 ml du véhicule de la propolis (Ethanol+ eau distillée) par voie orale pendant 5 jours. Le 6^{ème} jour, ils reçoivent 0.2ml d'huile d'olive par voie intra-péritonéale (*ip*).

Lots 2 (B(a)P): Les souris, au nombre de trois, reçoivent 0.2ml du véhicule de la propolis (Ethanol+ eau distillée) par voie orale pendant 5 jours. Le 6^{ème} jour, ils reçoivent 0.2ml de benzo(a)pyrène à la dose de (100mg/kg) par voie *intra-péritonéale*. Le B(a)P est préparé dans l'huile d'olive.

Lots 3 (Propolis + B(a)P): Les souris, au nombre de cinq, reçoivent 0.2ml de propolis par gavage à la dose de 25mg/kg/j pendant 5 jours. Le 6^{ème} jour, ils reçoivent 0.2 ml du benzo(a)pyrène par voie intra-péritonéale (IP) à la dose de (100mg/kg).

Lots 4 (Propolis): Les souris, au nombre de cinq, reçoivent quotidiennement 0.2 ml d'extrait de propolis par voie orale (25mg/kg/j) pendant 5 jours.

2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement des reins

Les souris ont été sacrifiées 48h plus tard, les reins ont été prélevés et pesés: une partie de chaque rein a été plongée dans le formol tamponné pour la fixation et la réalisation des coupes histologiques, et l'autre partie a été congelée pour la préparation de la fraction cytosolique. Pour évaluer l'évolution pondérale, les souris ont été pesées le jour du début des traitements et juste avant le sacrifice.

2.3. Dosages tissulaires

2.3.1. Préparation de la fraction cytosolique

La fraction cytosolique est préparé selon la méthode décrite par (Iqbal et *al.*, 2003). Pour cela, 0.5 g du rein sont coupés et homogénéisés avec trois volumes de tampon phosphate (0,1 M à pH 7,4) contenant du KCl 1,17 % à l'aide du broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à 2000 tours pendant 15 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires; le

surnageant est ensuite centrifugé à 9 600 tour/min pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant final est utilisé pour réaliser les différents dosages tissulaires.

2.3.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué selon la technique de Bradford (1976). Cette méthode est rapide et reproductible, elle repose sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du bleu de Coomassie à 595 nm, après complexation avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la solution. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié donc à la concentration en protéines dans l'échantillon.

Pour cela, 4 ml de Bleu de Coomassie est ajouté à 2ml de l'échantillon. Ensuite une incubation du mélange est effectuée à température ambiante pendant 5 min et la DO est lu à 595nm.

La concentration en protéines est déterminé à partir d'une gamme étalon réalisé dans les mêmes conditions avec de l'albumine sérique bovine (BSA) aux concentrations (0-1mg/ml) (Annexe 3).

2.3.3. Dosage du MDA cytosolique

Le malondialdehyde (MDA) est dosé par la méthode colorimétrique d'acide thiobarbiturique (TBA) décrite par Okhawa et *al.* (1979). Le principe de ce dosage est le suivant: le MDA réagit avec deux molécules de TBA dans un milieu acide (pH 2 à 3) et à chaud 100°C pour donner un pigment coloré en rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le n- butanol (Figure 10).

Pour commencer, 0.5ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA 0.67%) sont ajoutés à 0.5ml de la fraction cytosolique. Ensuite, le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-Butanol. Après le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 rpm, enfin la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm.

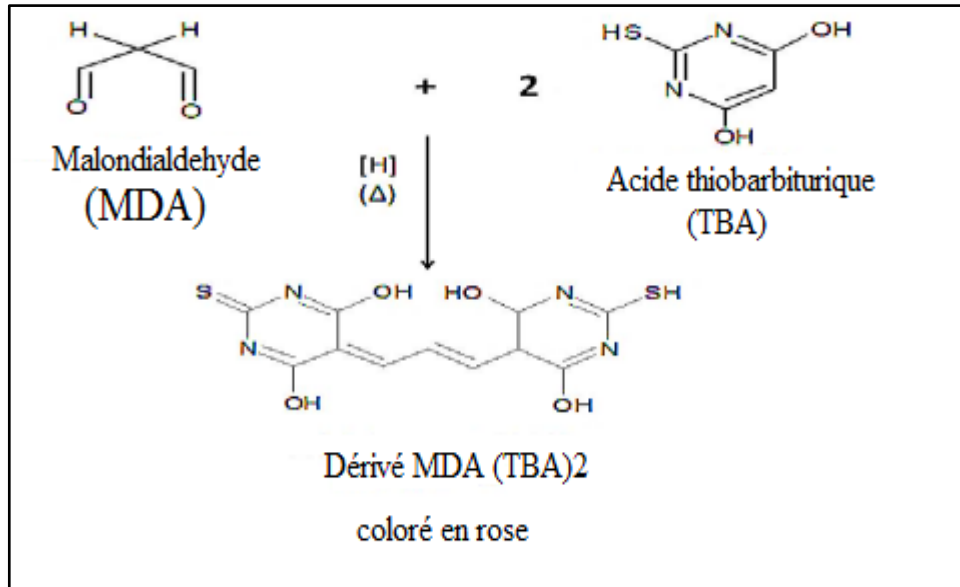


Figure 10. Principe de dosage de MDA (Ohkawa et al., 1979).

Le taux du MDA est exprimé en nmoles/g de protéines à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec du Tetra Ethoxy Propane (TEP) (Annexe 4).

2.3.4. Dosage du glutathion (GSH)

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine) qui joue un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Lushchak, 2011). Le dosage de cet antioxydant non enzymatique est réalisé selon la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) utilisant le réactif DTNB. Le principe de la réaction est basé sur l'oxydation du GSH par le DTNB, qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412nm selon la réaction présentée dans la figure 11.

Pour cela 50 μ L du TCA (5%) est ajoutés à 50 μ l de la fraction cytosolique. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 3000 rpm à 4°C. Ensuite, 25 μ l du surnagent est mélangé avec 5ml du tampon (0.1M, pH=8). 20 μ l du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution, Après 15 min d'incubation une lecture de la densité optique est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

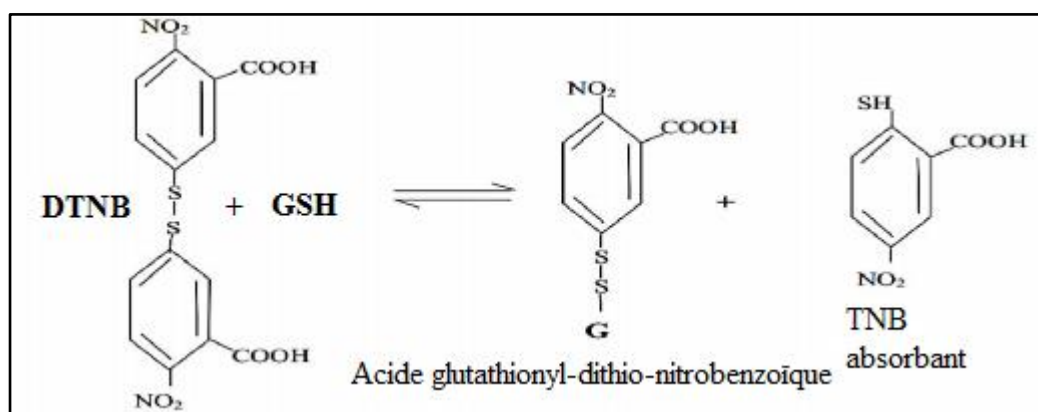


Figure 11 : Principe de dosage de GSH (Ellman, 1959)

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparée dans les mêmes conditions que le dosage (Annexe 5). La concentration du GSH est exprimée en $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéines.

2.3.5. Evaluation de l'activité des enzymes anti-oxydantes

2.3.5. 1. Mesure de l'Activité enzymatique SOD

Le superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme anti-oxydante ubiquitaire. Elle représente une des premières lignes de défense contre le stress oxydant.

L'activité enzymatique de cette enzyme est déterminée selon la méthode de Marklund (1974), connu par la méthode d'auto-oxydation du pyrogallol en présence d'EDTA, qui sera inhibé par la SOD. Le principe de ce dosage est basé sur la compétition entre la réaction d'oxydation du pyrogallol par l' O_2^- (produit une couleur jaune) et la dismutation d' O_2^- par la SOD.

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

L'activité enzymatique de la superoxyde dismutase est exprimée en UI/mg de protéines selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(\text{DO de control} - \text{DO de l'essai}) / \text{DO de control}] \times 100$$

$$\text{SOD (UI /mg de protéines)} = \text{Inhibition total (\%)} / (n \times 50).$$

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

2.3.5.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase

L'activité de la CAT est déterminée selon la méthode décrite par Clairbone (1985). Le principe est basé sur la disparition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de la source enzymatique à 25° C. Un mélange constitué de 1ml du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0,1M, pH=7,2), 975 µl du peroxyde d'hydrogène (0,019M) et 25µl 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 :

$$\text{UI/mg} = (2,303 / T) \times \log (A_1 / A_2) / [\text{protéines}]$$

Sachant que :

- ✓ **2,303** : Constante de vitesse de la réaction.
- ✓ **A1** : absorbance au temps 0mn.
- ✓ **A2** : absorbance au temps 1mn.
- ✓ **T** : intervalle de temps en mn.

2.4. Étude histologique

Le prélèvement des échantillons est effectué aussitôt que possible après le sacrifice des animaux. Dans ce contexte, un morceau de rein des souris de chaque lot rincé par l'eau physiologique froid est immédiatement fixé dans le formol 10% pour une fixation et conservation morphologique des structures tissulaires et cellulaires.

Pour la préparation des coupes histologiques, les biopsies rénales sont préalablement déshydratées par passage, de chaque prélèvement, dans une série de bains d'alcool de concentration croissante. L'imprégnation des tissus dans la paraffine a été effectuée grâce à un distributeur automatique de paraffine (Shander Citadel, 2000, thermo scientific, Germany). Les coupes des blocs de paraffine effectués au microtome ont permis la réalisation des coupes fines de 2 microns d'épaisseur. Les coupes ainsi obtenues sont déposées et collées sur des lames en verre.

Les coupes histologiques sont déparaffinées au xylène et réhydratées dans des bains d'alcools de concentration décroissantes. Pour permettre la mise en évidence des différents structure tissulaire et cellulaire, les coupes obtenues sont colorées à l'hématoxyline/éosine; technique de coloration usuelle associant un colorant nucléaire hématoxyline et une colorante cytoplasmique éosine. Enfin, l'examen au microscope optique et la lecture des coupes histologiques permettent l'évaluation des changements tissulaires au niveau du rein.

2.5. Analyse statistique des résultats

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous forme de moyenne \pm écartype calculés à l'aide du programme Microsoft Excel 2007. Nos résultats sont vérifiés par le test de student avec un seuil de signification supérieur à 95% ($p < 0.05$) :

- ($p > 0.05$), effet non significatif ns
- ($p < 0.05$), désigne effet significatif * (comparaison avec le témoin) ou # (comparaison avec le lot B(a)P)
- ($p < 0.01$), désigne effet très significatif ** (comparaison avec le témoin) ou ## (comparaison avec le lot B(a)P)
- ($p < 0.001$), désigne effet hautement significatif *** (comparaison avec le témoin) ou ### (comparaison avec le lot B(a)P)

Cette étude réalisée au niveau du laboratoire de toxicologie moléculaire a pour but d'évaluer l'effet protecteur de la propolis de Jijel contre la toxicité rénale aigue du benzo(a)pyrène *in vivo*.

1. Etude phytochimique et activité anti-radicalaire de la propolis

Les résultats de l'étude phytochimique et de l'activité anti-radicalaire sont représentés ci-dessous.

1.1. Teneur en polyphénols et flavonoïdes

La quantité des composés phénoliques, exprimée en mg équivalent acide gallique/g de propolis (mg EAG/g), et des flavonoïdes, en mg équivalent quercétine/g de propolis (mg EQ/g propolis), dans l'extrait éthanolique de la propolis de la région de Chekfa (Jijel) est illustrée dans la figure 12 ci-dessous.

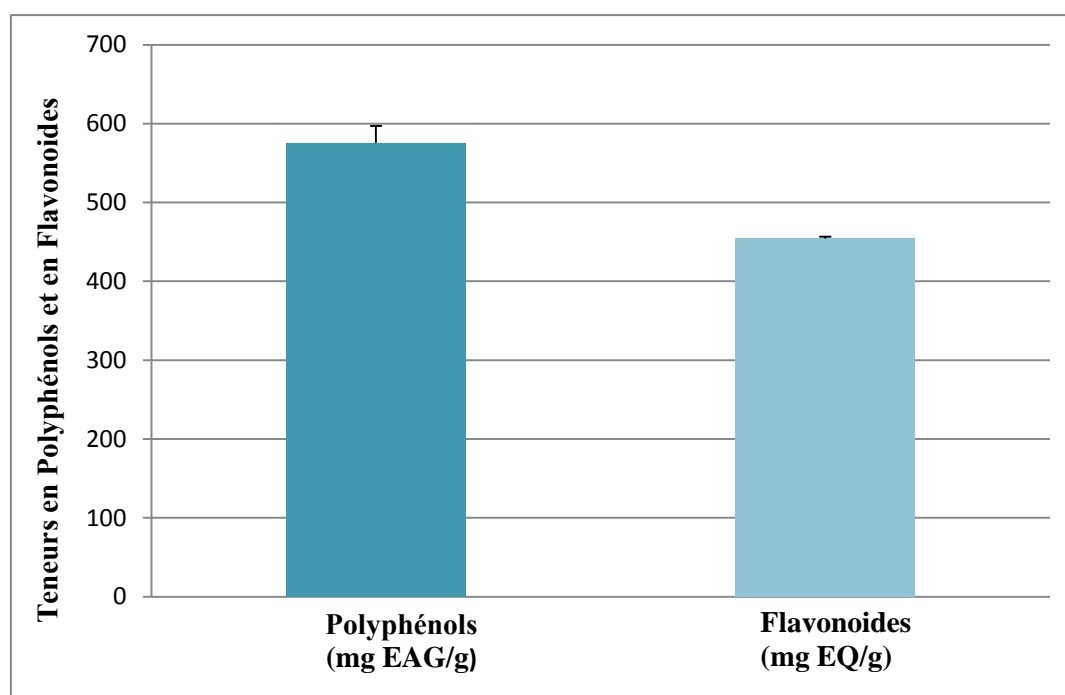


Figure 12. Teneur en Polyphénols et Flavonoïdes de l'extrait éthanolique la propolis en mg EAG/g et mg EQ /g de propolis respectivement.

A partir des résultats obtenus, on constate que l'extrait éthanolique de la propolis de Jijel est très riche en polyphénols ainsi qu'en flavonoïdes (575.61± 21.45 mg EAG/g de propolis et 454.25 ± 2.5 mg EQ/g de propolis respectivement). De ce fait, cette propolis semble être riche en flavonoïdes, qui sont considérés comme étant la classe la plus abondante des polyphénols. Dans notre extrait, environ 78% des polyphénols sont représentés par les flavonoides.

En comparant nos résultats avec d'autres études, on constate que notre échantillon contient un taux supérieur à celui obtenu par Ferhoum (2010) dans la propolis algérienne de la région de Yakouren (206.11 ± 4.98 mg EAG/g de propolis), et de la région du Sahara (247.58 ± 3.80 mg EAG/g de propolis).

En ce qui concerne les taux des flavonoïdes, les résultats obtenus dans la même étude de Ferhoum (2010) sont plus bas que nos résultats, ces teneurs en flavonoïdes oscillent entre 30.90 et 159.21 mg EQ/g de propolis. La propolis de chine utilisée pendant l'étude d'Ahn *et al.* (2007) a montré des résultats qui varient entre $8,3 \pm 3,7$ et $188 \pm 6,6$ mg EQ/g de propolis, inférieur à ceux obtenue dans notre propolis.

Selon l'étude de Boufadi et ses collaborateurs (2014), les taux de polyphénols totaux et des flavonoïdes de la propolis algérienne varient, entre 55 à 279 mgEAG/g et de 10 à 69 mgEQ/gde propolis respectivement. Cette variation dépend principalement des caractéristiques phytogéographiques du site de collecte, l'origine de la propolis, les conditions climatiques et environnementales, la saison de récolte, la localisation géographique et les conditions de conservation. Le solvant d'extraction affecte également les taux des polyphénols et des flavonoides.

1.2. Effet anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis contre le radical DPPH°

Le tableau 4 et la figure 13 montrent les variations de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis et de l'acide ascorbique (vitamine C) à différentes concentrations contre le radical libre DPPH°.

Le pouvoir anti-radicalaire de l'EEP et de l'acide ascorbique (Vitamine C), aux différentes concentrations de 12.5 µg/ml à 200 µg/ml, a été évalué en se basant sur le calcul des pourcentages de réduction du radical libre DPPH°.

Tableau 4. Pourcentage de réduction du DPPH° par la propolis et l'acide ascorbique.

	12.5µg/ml	25µg / ml	50 µg / ml	100 µg / ml	200 µg / ml	IC50 (µg/ml)
EEP	25.58 ±1.4 **	48.13± 4.7 **	69.41± 5.02 **	75.51± 1.7 *	96.2±5.01 **	30.54±3.78
Acide ascorbique	8.62± 2.62	22.05±2.51	42.1±2.21	67.8±2.07	75.2±1.8	55.95 ±4.45

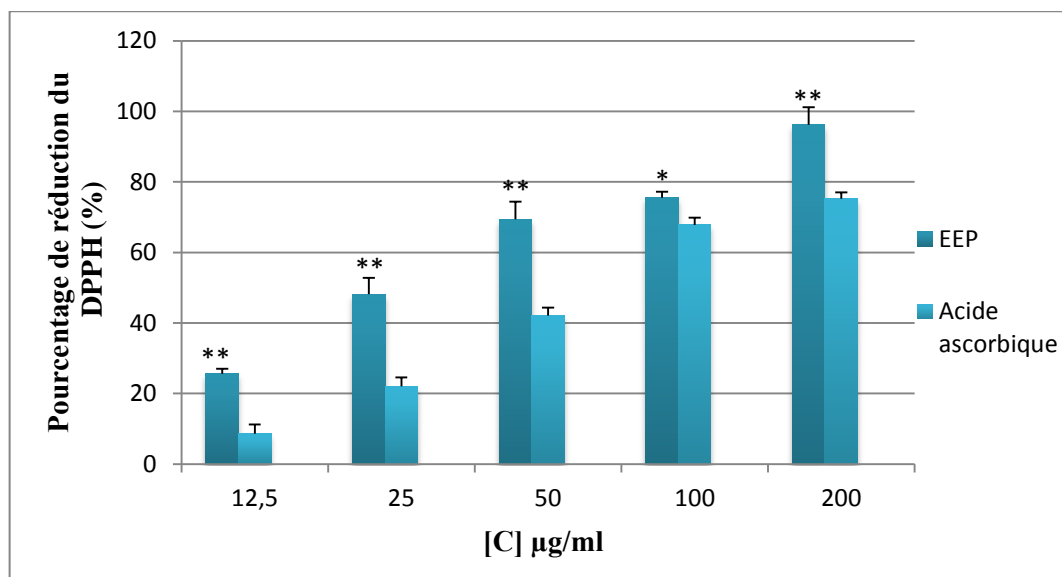


Figure 13. Pourcentage de réduction des radicaux DPPH° par l'EEP et l'acide ascorbique.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de student. Les comparaisons faites vis-à-vis L'acide ascorbique: * $P < 0.05$ désigne un effet significatif; ** $P < 0.01$ désigne un effet très significatif.

Les résultats obtenus ont révélé que l'extrait éthanolique de la propolis et l'acide ascorbique ont un pouvoir anti-radicalaire de façon concentration dépendante vis-à-vis du radical DPPH°. L'effet de la propolis est mieux que celui obtenu avec l'acide ascorbique. A 200 µg/ml, l'extrait de propolis a montré un pouvoir réducteur de 96.2% \pm 5.01 par rapport à l'acide ascorbique avec 75.2 % \pm 1.8. À 12.5µg/ml, le pourcentage de réduction est de l'ordre de 25.58 \pm 1.4% et 8.62 \pm 2.62% avec la propolis et l'acide ascorbique respectivement. A cette concentration, la propolis est deux fois plus efficace que l'acide ascorbique. L'étude de Keba et *al.* (2014) a montré que l'EEP de Jijel exerce un bon effet anti-radicalaire, de même pour les résultats obtenus par Alyane et *al.* (2008) et Lahouel et *al.* (2010).

L'IC50 obtenue avec l'EEP est inférieur à celle obtenus avec la molécule de référence ce qui montre que la propolis de Jijel possède le pouvoir anti-radicalaire le plus puissant avec une IC50 de (30.54 \pm 3.78 µg/ml) contre 55.95 \pm 4.45 µg/ml obtenu avec l'acide ascorbique.

La propolis algérienne est connue pour son effet antioxydant. Parmi ses principaux composants responsables de cet effet, nous retrouvons les polyphénols et les flavonoïdes qui peuvent éliminer des radicaux libres ou empêcher leur formation (Ahn et *al.*, 2007; Keba et *al.*, 2014). L'étude de Mouhoubi-Tafinine et ses collaborateurs (2016) a révélée qu'il y a une corrélation positive entre le taux des polyphénols et le pouvoir réducteur des extraits analysés de la propolis algérienne provenant de (Bejaia et Oued Ghir). En plus de la richesse en flavonoïdes, le degré d'hydroxylation et de méthylation des composés phénoliques et la

présence d'autres composés non phénoliques (vitamines et acides aminés) sont aussi responsables de l'activité anti radicalaires.

Nos résultats indiquent que l'EEP contient des concentrations élevés en polyphénols et en flavonoïdes (575.61 ± 21.45 mg EAG/g de propolis et 454.25 ± 2.5 mg EQ/g de propolis respectivement), ce qui leur confèrent un effet scavenger très puissant suite à la capacité de ces polyphénols à piéger et à neutraliser les radicaux libres.

1.3. Variations du pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est l'un des principaux espèces réactifs d'oxygène non chargée qui traverse les membranes cellulaires facilement, et provoque des dégâts énormes au niveau cellulaire, conduisant à la dégradation des lipides par peroxydation d'acides gras membranaires insaturé (Pisoschi et Pop., 2015).

Le tableau 4 ainsi que la figure 14 représentent les variations de la capacité de réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) de l'extrait éthanolique de la propolis et de l'acide ascorbique aux concentrations de 12.2, 25µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml.

Tableau 5. Variations des pourcentages de réduction du H₂O₂ par la propolis et l'acide ascorbique avec valeurs d'IC₅₀.

	12.5µg/ml	25µg / ml	50 µg / ml	100 µg / ml	200 µg / ml	IC ₅₀ (µg/ml)
EEP	31.87 ±1.89 **	43.02±7.87 **	61.02±8.50 **	82.22±9.6 **	91.02±2.51 **	42.04 ± 2.45
Acide ascorbique	16.98± 2.71	29.54±1.54	40.54.7±2.44	56.01±2.16	65.58±1.91	68.78± 5.48

*Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : **P<0.01 désigne un effet très significatif.*

A partir des résultats obtenus, on constate que les variations de la capacité de piégeage de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) de l'extraits éthanoliques de la propolis et de l'acide ascorbique sont concentration dépendante. A 200 µg/ml, l'EEP a montré un pouvoir de réduction de (91.02±2.51%) supérieur (P<0.01) à celui de l'acide ascorbique (65.58±1.91%). A 12.5µg/ml, le pourcentage de réduction de l'EEP est deux fois supérieures à celui de la molécule de référence avec 31.87 ±1.89% et 16.98± 2.71% respectivement.

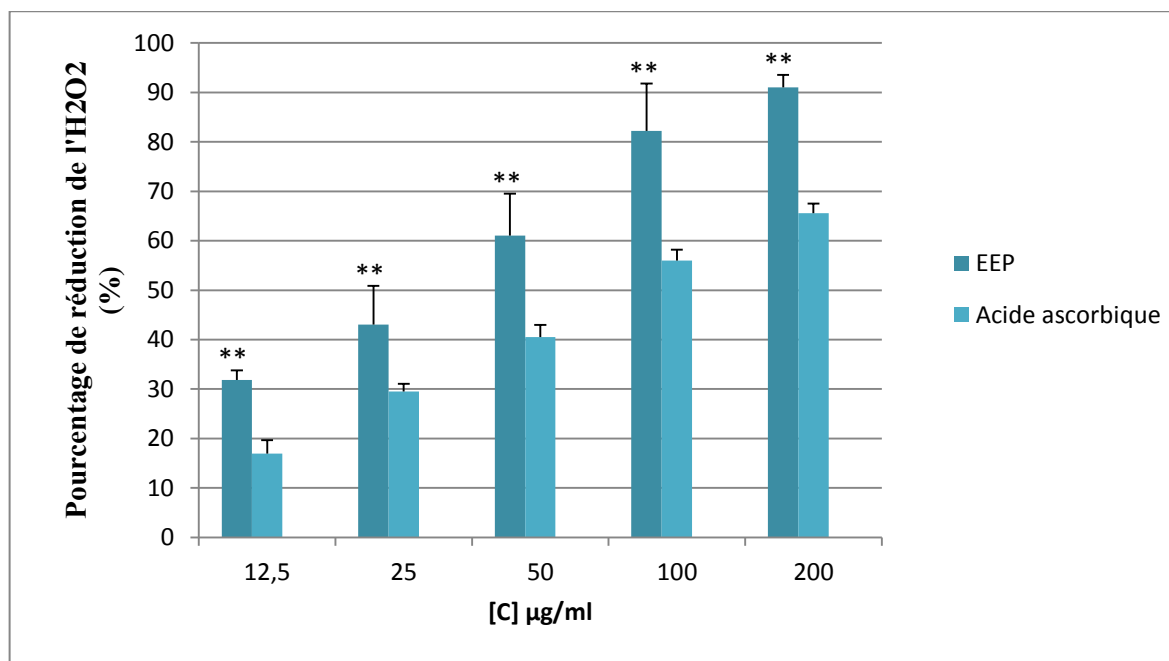


Figure 14. Pourcentage de réduction du peroxyde d'hydrogène par l'EEP et l'acide ascorbique.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de student : ** $P < 0.01$ désigne un effet très significatif.

Selon l'étude statistique, qui montre une augmentation très significative ($P < 0.01$) des pourcentages de réduction de l'EEP par rapport à ceux de l'acide ascorbique aux différentes concentrations, on peut conclure que l'effet de l'EEP est meilleure que celui de l'acide ascorbique. Cette conclusion est confirmée par les valeurs d' IC_{50} ; l'EEP présente une IC_{50} de 42.04 $\mu\text{g/ml}$ contre 68.78 $\mu\text{g/ml}$ obtenu avec l'acide ascorbique.

Une forte capacité de piégeage de l'EEP vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène comme dérivé non radicalaire de l' O_2 , a donc été rapportée par l'EEP. En effet, la présence des polyphénols, à savoir les flavonoïdes, dans l'extrait de propolis a donné à ce produit naturel un potentiel antioxydant. D'après Keser et *al.* (2012), le piégeage de l' H_2O_2 par l'EEP est expliqué par la capacité des antioxydants naturels de la propolis à piéger directement l' H_2O_2 , ou bien par le fait que le peroxyde d'hydrogène lui-même n'a pas une forte réactivité, mais il devient hautement toxique dans la cellule en générant le radical hydroxyle OH° .

2. Evaluation de l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité rénale du B(a)P *in vivo*

Un nombre croissant d'études a montré que des niveaux élevés de polluants atmosphériques entre autre le B(a)P sont associés à de nombreux résultats néfastes pour la

santé (Friesen et *al.*, 2010; Sancini et *al.*, 2014; He et *al.*, 2010). Notre étude a pour but d'évaluer l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité rénale aiguë du benzo(a)pyrène, sur des souris Wistar Albinos et cela *via* l'évaluation de l'état du stress oxydatif et la visualisation des altérations tissulaires au niveau rénal.

2.1. Evolution pondérale

Les poids corporels et organiques des rongeurs sont des considérations importantes en recherche médicale et en zootechnie (Tanaka et *al.*, 2009). Dans la présente étude (Tableau 6), on a constaté que le poids des souris du groupe témoin ayant reçues le véhicule est, plus ou moins, stable pendant les jours du traitement (25.76 ± 0.66). Cependant, une diminution significative du poids est observée au 7^{ème} (24.87 ± 1.17) jour chez les souris traitées par une dose de 100 mg/kg de BaP par rapport au 1^{er} jour (26.16 ± 1.1), et légèrement chez les groupes traité et prétraités par l'extrait de propolis ($34.54 \pm 3.17g$, $35.5 \pm 4.12g$ respectivement) par rapport au premier jour ($35.06 \pm 4.39g$, $37.96 \pm 4.93g$ respectivement).

Concernant le rapport poids du rein/poids corporel, on a trouvé qu'il n'a pas changé de manière significative chez les différents groupes. Que ce soit lorsque on a comparé le groupe traité par le BaP (0.01 ± 0.001) avec le groupe témoin (0.012 ± 0.003), ou le groupe prétraité par la propolis (0.01 ± 0.002) avec le groupe traité par le BaP ou traité par la propolis (0.011 ± 0.002). La similarité de ce rapport entre les quatre groupes reflète qu'il y'a une relation proportionnelle entre le changement du poids de chaque organe et celui de l'organisme entier (Erboga et *al.*, 2015).

Tableau 6 : Variations de s poids corporels et des reins chez les souris traitées par le B(a)P seul à 100mg/kg ou en cas de prétraitement avec la propolis à 25mg/kg.

	Témoin	BaP	Propolis+BaP	Propolis
PC (1er jour)	$25,86 \pm 1.15$	$26,16 \pm 1.1$	$37,96 \pm 4.93$	$35,06 \pm 4.39$
PC (7ème jour)	ns	**	**	*
Poids du rein/PC	$0,012 \pm 0.003$	$0,01 \pm 0.001$	$0,01 \pm 0.002$	$0,011 \pm 0.002$
		ns	ns	ns

Nos résultats sont en accord avec ceux des études de Sumedha et *al.* (2006), Rajendran et *al.* (2008) et Deng et *al.* (2018) qui ont indiqué une diminution significative du poids corporel

chez les animaux de laboratoire après l'administration de BaP aux doses (12.5, 50 et 100 mg/kg).

La diminution du poids corporel chez les souris traitées par le BaP est le résultat de l'effet toxique du BaP sur le fonctionnement des organes de l'organisme. Alors que la diminution légère chez le groupe prétraité et traité par la propolis est due à l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis.

2.2. Effet de la propolis sur les paramètres du stress oxydant du tissu rénal

La propolis présente une forte activité anti-oxydante en rapport avec sa richesse en flavonoïdes et en composés phénoliques qui ont la capacité de donner des ions d'hydrogènes pouvant attaquer les radicaux libres pour empêcher les réactions d'oxydation dans la cellule. De ce fait, elle inhibe la formation des radicaux libres et réduit le stress oxydatif (Nirala et *al.*, 2008 ; El Sohaimy et Masry, 2014). L'efficacité de la propolis en tant que produit chimioprotecteur a été évaluée dans cette étude en mesurant les principaux biomarqueurs du stress oxydatif à savoir le MDA, GSH, SOD et Catalase.

2.2.1. Variations des taux du malondialdéhyde cytosolique (MDA)

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle OH° capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction appelée peroxydation lipidique, forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical. Le radical peroxyde, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonanal (4-HNE). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires (Favier et *al.*, 1995). Le dialdéhyde malonique (MDA) est sans doute le marqueur le plus connu et le plus utilisé (Guichardant et *al.*, 2006).

Les variations des taux du MDA cytosolique rénal après traitement par le benzo(a)pyréne seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP à (25mg/kg/j pendant 5jours) sont illustrées dans la figure 15.

Les résultats obtenus montrent une augmentation très hautement significative du taux de MDA chez les souris traitées par le benzopyréne avec une dose de 100mg/kg qui atteint (12.73 ± 5.47 nmoles/mg de protéines) par rapport au lot témoin (7.71 ± 5.8147 nmoles/mg de

protéines). Le prétraitement avec la propolis à 25 mg/kg administré quotidiennement pendant 5 jours, avant l'administration de benzopyrène, a permis de réduire la peroxydation lipidique se traduisant par la réduction du taux du MDA (8.22 ± 2.8947 nmoles/mg de protéines). Par contre une diminution significative de MDA a été enregistrée chez les rats traités par l'extrait de propolis (6.08 ± 0.847 nmoles/mg de protéines) par rapport au groupe témoin (7.71 ± 5.8147 nmoles/mg de protéines). Ceci est expliquée par l'effet protecteur qu'exerce la propolis au niveaux des membranes cellulaires.

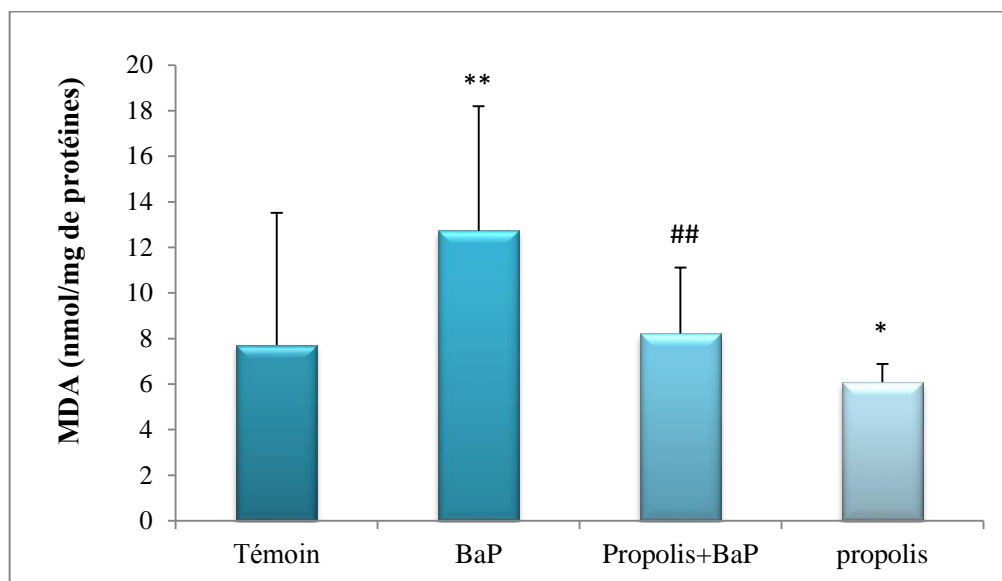


Figure 15. Variations des taux du MDA cytosolique rénal après traitement par le benzo(a)pyrène seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP à (25mg/kg/j pendant 5jours).

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student: comparaison faites entre le groupe traité par le benzo(a)pyrène et Témoin: $**P \leq 0,01$ désigne un effet très significatif. Groupe prétraité comparé au groupe traité par le benzo(a)pyrène : $## P \leq 0,01$ désigne un effet très significatif. Groupe traité par la propolis comparé au groupe témoin : $*P \leq 0,05$ désigne un effet significatif.

La peroxydation lipidique est l'une des principales conséquences des dommages induits par les ROS durant l'exposition au BaP et qui conduit à la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés des membranes biologiques et la génération des aldéhydes réactifs. Elle provoque la formation de nombreux produits de décomposition dont le MDA est le principal marqueur pour leur évaluation (Eugenia et al., 2015).

L'administration du BaP chez les souris par voie IP induit l'augmentation des taux du MDA cytosolique rénal, ce résultat est similaire à ceux obtenus par Eugenia et al. (2011) avec une dose de 10mg/kg du B(a)P. L'augmentation du MDA peut être due à l'accumulation des ROS,

ou à la déplétion des capacités antioxydants (Servais, 2004). Le déséquilibre de la balance redox provoque donc la peroxydation lipidique. Alors qu'un traitement et un prétraitement par l'extrait de propolis a permis une diminution significative du taux de MDA, cette diminution est due à l'effet scavenger des polyphénols de la propolis qui fournit une protection contre les radicaux libres formés pendant le métabolisme de benzopyrène. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Lahouel et *al.* (2010) qui a démontré l'effet préventif des flavonoïdes de la propolis de Jijel à la dose de 100mg/kg contre le stress oxydatif rénal induit par la doxorubine.

2.2.2. Variations des taux du glutathion (GSH)

Le glutathion, antioxydant non enzymatique, joue un rôle important dans la détoxification des métabolites réactifs ainsi qu'à la protection des membranes cellulaires contre l'oxydation. Il constitue la première ligne de défense contre les radicaux libres (El-Demerdash et *al.*, 2012).

Les variations des taux du GSH cytosolique rénal après administration d'une dose unique du B(a)P seul à (100mg/kg), en association avec l'extrait ethanologique de la propolis (25mg/kg) ou avec la propolis seule (25 mg/kg) sont représentées dans la figure (16) ci-dessous.

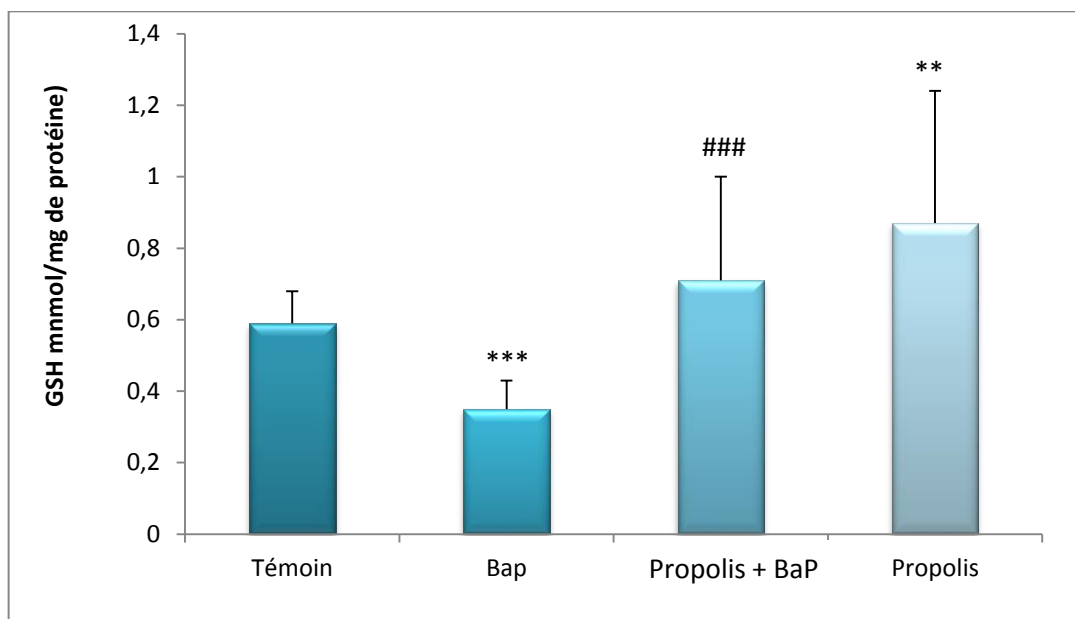


Figure 16. Variation des taux du GSH cytosolique rénal après traitement par le benzo(a)-pyrène seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP (25mg/kg), ou par l'EEP seul (25mg/kg) pendant 5 jours.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : comparaison faite entre le groupe traité par le benzo(a)pyrène et le témoin : *** $P \leq 0,001$ désigne un effet hautement significatif. Groupe prétraité par la propolis comparé au groupe traité par le benzo(a)pyrène : ### $P \leq 0,001$

désigne un effet hautement significatif. Le groupe traité par EEP comparé au groupe témoin : ** $P \leq 0,01$ désigne un effet très significatif.

Les souris ayant reçus le BaP seul ont subi une diminution très significative du taux du GSH qui atteint $0.35 \pm 0,08$ mM/mg de protéines dans le tissu rénal par rapport au groupe témoin avec $0.82 \pm 0,41$ mM/g. Par contre, chez les souris prétraitée par la propolis on a enregistré une augmentation significative de GSH (0.6 ± 0.29) par rapport au groupe BaP seul. De même pour le groupe traité par la propolis dont on a marqué une augmentation de cet enzyme (0.87 ± 0.37) en le comparant au groupe témoin.

Le taux du GSH cellulaire peut être considérés comme indicateur particulièrement sensible du stress oxydant (Taleb-Senouci et *al.*, 2009). En effet, le taux de glutathion enregistré chez les souris traité par le benzopyrène seul (100mg/kg) était plus faible que chez le groupe témoin. Cette diminution est probablement due à l'effet toxique des métabolites réactifs du benzopyrène qui peuvent être fixés et neutralisés par le systèmes de détoxification, entraînant une diminution des taux de GSH ou une dégradation de cet antioxydant par le GST ou par le GPx (Lahouel et *al.*, 2010, Sharma et *al.*, 1997). Ces résultats sont en contradiction avec l'étude de Chun Deng et *al.* (2018) qui ont marqué une augmentation du taux du GSH après un traitement à différentes dose du benzopyrène. Par contre, les mêmes résultats ont été obtenus par Adedara et *al.* (2015) après une administration du benzo(a)pyrène au niveau du rein.

Nous avons enregistré également une augmentation des taux de glutathion chez les groupes traités et prétraités par l'extrait ethanologique de la propolis (25mg/kg), cette augmentation est expliqué par l'effet préventif des de la propolis contre le stress oxydatif rénal par le benzopyrène (Lahouel et *al.*, 2010). Ce produit naturel prévient le stress oxydatif rénal par un mécanisme qui peut inclure une vitesse croissante de GSH, une induction de sa synthèse ou un effet piègeur. Et donc au lieu que les métabolites réactifs toxiques se lient au glutathion et se consomment, ils seront capturés par les flavonoïdes qui ont un effet inhibiteur (Boutabet et *al.*, 2011). Nos résultats sont en lien avec ceux de l'étude de Boutabet et *al.* (2011) qui a montré l'effet préventif des polyphénols de la propolis (100 mg/kg) contre un stress oxydatif rénal causé par la doxorubicine.

2.2.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique rénale

La catalase, localisée principalement dans les peroxysomes, est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques (Niki et *al.*, 2007). Afin d'avoir une vision panoramique des conséquences de

la présence du benzo(a)pyrène dans le rein vis à vis du système de défense anti-oxydant, nous avons entrepris l'analyse de l'activité de cet enzyme.

Les variations de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique rénale après traitement par le benzo(a)pyrène seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP (25mg/kg) ou par l'EEP seul (25mg/kg/j) pendant 5 jours sont représentées dans la figure 17.

L'analyse de nos résultats a montré que l'activité enzymatique de la catalase a diminué de façon significative de l'ordre de 82.35% chez le groupe 2 recevant le benzo(a)pyrène. Cette activité atteint (0.24 ± 0.06 UI/mg de protéines) par rapport à celle mesuré chez les souris du groupes « témoin » mesurée à (0.34 ± 0.08 UI/mg de protéines). Tandis que le traitement des souris par la propolis à 25mg/kg avant l'exposition au BaP a montré une élévation hautement significative de l'activité enzymatique de la catalase (0.42 ± 0.12 UI/mg de protéines) par rapport au animaux traités par le BaP seul. Cette augmentation est de de l'ordre de 50%. Le traitement par la propolis seule a révélé également une augmentation de l'activité de cette enzyme qui atteint (0.47 ± 0.12 UI/mg) par rapport au (0.34 ± 0.08 UI/mg de protéines) obtenu avec le groupe témoin.

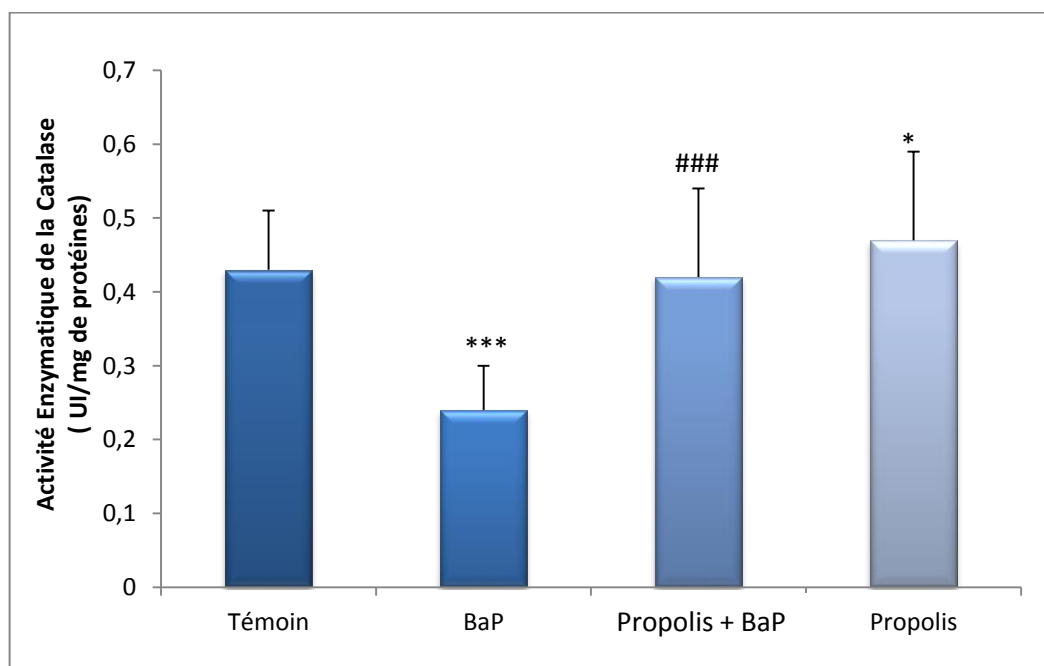


Figure 17. Variations de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) cytosolique rénale après traitement par le benzo(a)pyrène seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP (25mg/kg), ou par l'EEP seul (25mg/kg/j) pendant 5 jours.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe BaP et Témoin : *** $P \leq 0,001$ désigne un effet hautement significatif. Groupe prétraité

comparé au groupe BaP : $###P \leq 0,001$ désigne un effet hautement significatif. Et le groupe traité par la propolis seul par rapport au groupe témoin : $*P \leq 0,05$ désigne un effet significatif.

La catalase est l'une des premières lignes de défense antioxydant importante (Garg et al., 2008). Pour empêcher l'induction d'un état du stress oxydatif, maintenir l'homéostasie des cellules et éliminer les ROS, cet enzyme réduit l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (Manawadi et Kaliwal, 2010). Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux de (Kim et al., 1997 ; Dang et al., 2018).

L'administration du Benz(a) pyrène était capable d'inhiber l'activité de la catalase cytosolique. L'altération de l'activité enzymatique constatée est due à la surproduction des ROS qui attaquent les macromolécules dans les cellules rénales induisant ainsi le dysfonctionnement des enzymes antioxydants y- compris la CAT ou bien à son consommation dans la conversion d' l' H_2O_2 en H_2O et O_2 (Pan et al., 2006).

En revanche le traitement et le prétraitement par la propolis a amélioré l'activité de la catalase, cette augmentation peut être expliqué par le mécanisme de protection que possède ce produit naturel contre la production de radicaux libres et l'initiation de la peroxydation lipidique. Ce mécanisme inclus une action directe sur ces enzymes soit par leur activation, soit par l'induction de leur expression génique, ou bien elle empêche toute altération de leur activité induite par les radicaux libres formés (Kebsa et al., 2007; Benguedouar et al., 2008). Ces résultats confirment de nouveau l'effet antioxydant que possède la propolis.

2.2.4. Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique

Le superoxyde dismutase (SOD) est un élément fondamental qui représente l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. C'est pour cette raison qu'elle fait partie des enzymes les plus conservées du règne vivant qui assurent une réaction de dismutation en éliminant l'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et le transformer en peroxyde d'hydrogène et en oxygène afin de réduire la toxicité dans le corps vivant (Garre et al., 2007).

Les Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique rénale après traitement par le benzo(a)pyrène seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP (25mg/kg/j) pendant 5 jours sont représentées dans la figure 18 ci-dessous.

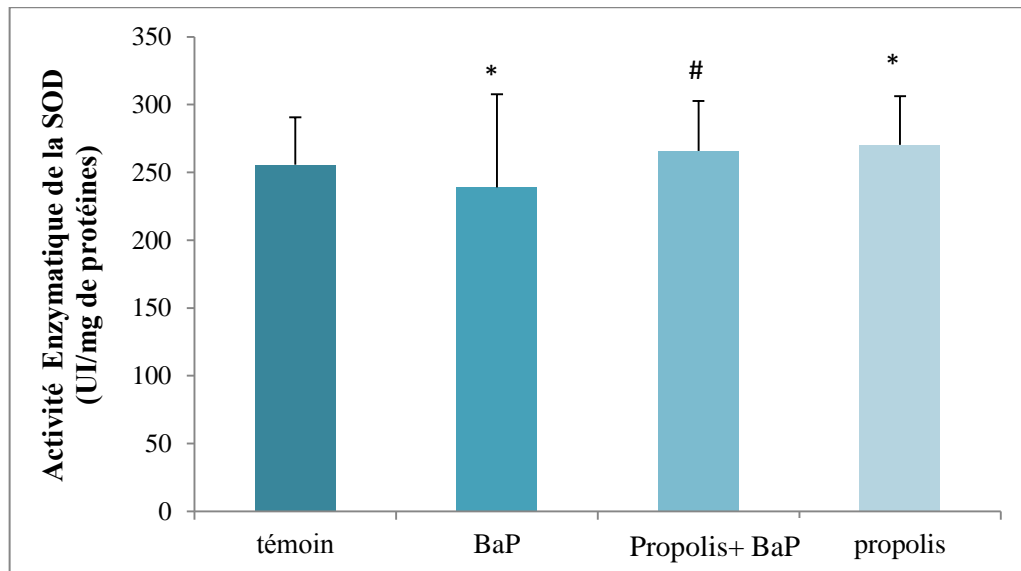


Figure 18. Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique rénale après traitement par le benzo(a)pyrène seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par l'EEP (25mg/kg/j) pendant 5 jours.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : comparaison faites entre le groupe BaP et Témoin : * $P \leq 0,05$ désigne un effet significatif. Groupe prétraité par la propolis comparé au groupe BaP seul: # $P \leq 0,05$ désigne un effet significatif. Et le groupe traité par la propolis seule par rapport au groupe témoin : * $P \leq 0,05$ désigne un effet significatif.

A partir des résultats obtenus, une réduction significative de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique rénale a été enregistrée chez les souris traitées par le BaP, elle atteint (238.923 \pm 68.67 UI/mg de protéines) contre (255.675 \pm 35.06 UI/mg de protéines) enregistrée chez le groupe témoin. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de cosan et *al.* (2008). La diminution de l'activité enzymatique de la SOD après l'administration du BaP est peut être due à la destruction de cet enzyme oxydoréductase suite au stress oxydatif induit par le BaP, à la consommation de cette enzyme dans l'élimination par dismutation des anions superoxydes $O_2\bullet$, résultant de la voie des quinones, en oxygène O_2 et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 ou simplement à leur l'inhibition par les ROS ou les métabolites toxiques du BaP.

Cependant, chez les souris prétraitées par 25mg/kg de l'EEP on a enregistré une augmentation significative de l'activité de la SOD (265.89 \pm 36.66 UI/mg de protéines) par rapport au groupe traité par le BaP seul (238.923 \pm 68.67 UI/mg de protéines). La propolis a permis donc de normaliser l'activité de cette enzyme par rapport à celle du témoin ou cette activité est de l'ordre de (255.675 \pm 35.06 UI/mg de protéines). De même pour les souris traitées par la propolis seule où on a enregistré une augmentation significative de l'activité enzymatique à

(270.434 ± 35.67 UI/mg de protéines) par rapport au témoin. Cette augmentation peut contribuer dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif induit par le BaP, l'amélioration de cette activité enzymatique confirme l'effet antioxydant de la propolis qui dépend des polyphénols et des flavonoides responsables de la réactivation des enzymes antioxydants. Ce mécanisme inclut une action directe sur ces enzymes soit par leur activation, soit par l'induction de leur expression génique, ou bien elle empêche toute altération de leur activité ou leur consommation à travers la réduction et la neutralisation des radicaux libres. Nos résultats sont en accord avec ceux de Tolba et *al.* (2013) qui ont utilisés la propolis mais à une dose de 50 mg/kg.

D'après les résultats de notre étude, nous pouvons proposer le mécanisme par lequel le BaP intervient dans l'induction du stress oxydant rénale d'une part, et d'autre part celui par lequel les polyphénols de la propolis interviennent dans la lutte contre ce stress oxydant.

Le BaP administré par voie intra-péritoniale à la dose de 100 mg/kg, conduit à la formation de métabolites réactifs suite à leur métabolisation, qui induisent la production des espèces réactifs de l'oxygène et mènent de ce fait à la consommation des molécules de défense antioxydant comme le GSH, à la peroxydation des acides gras polyinsaturés membranaires avec libération massive du MDA. Ainsi qu'à la destruction et l'altération des taux et de l'activité des enzymes antioxydantes : CAT, SOD au niveau de tissu rénale. Le changement des paramètres du stress produit suite au déséquilibre de la balance prooxydant- antioxydanT se traduit au niveau tissulaire par des altérations histopathologiques à savoir les pneumopathies interstitielles aiguës, les inflammations interstitiell

L'extrait éthanolique de la propolis a montré une forte activité antioxydante *in vivo* ainsi qu'un effet protecteur puissant contre la toxicité rénale du BaP, à travers la capacité des polyphénols à piéger et à neutraliser les radicaux libres. De plus les polyphénols protègent les membranes cellulaires par inhibition de la peroxydation lipidique que ce soit par captation directe des métabolites et des espèces réactifs, ou par interruption des réactions d'oxydation conduisant ainsi à la conservation des taux de GSH tissulaire et des enzymes antioxydantes, et donc le maintien de l'équilibre entre les pro-oxydants et les antioxydants. Grace à ces mécanismes les polyphénols de la propolis jouent un rôle important comme puissants antioxydants et assurent ainsi la protection des fonctions rénales contre la stress oxydatif induit par le BaP.

2.2.5. Etude histologique

La figure 19 ci-dessous montre les résultats de l'étude histologique microscopique des tissus rénaux des souris traitées par le BaP seul (100 mg/kg), en association avec l'EEP (25 mg/kg), ou l'EEP seul.

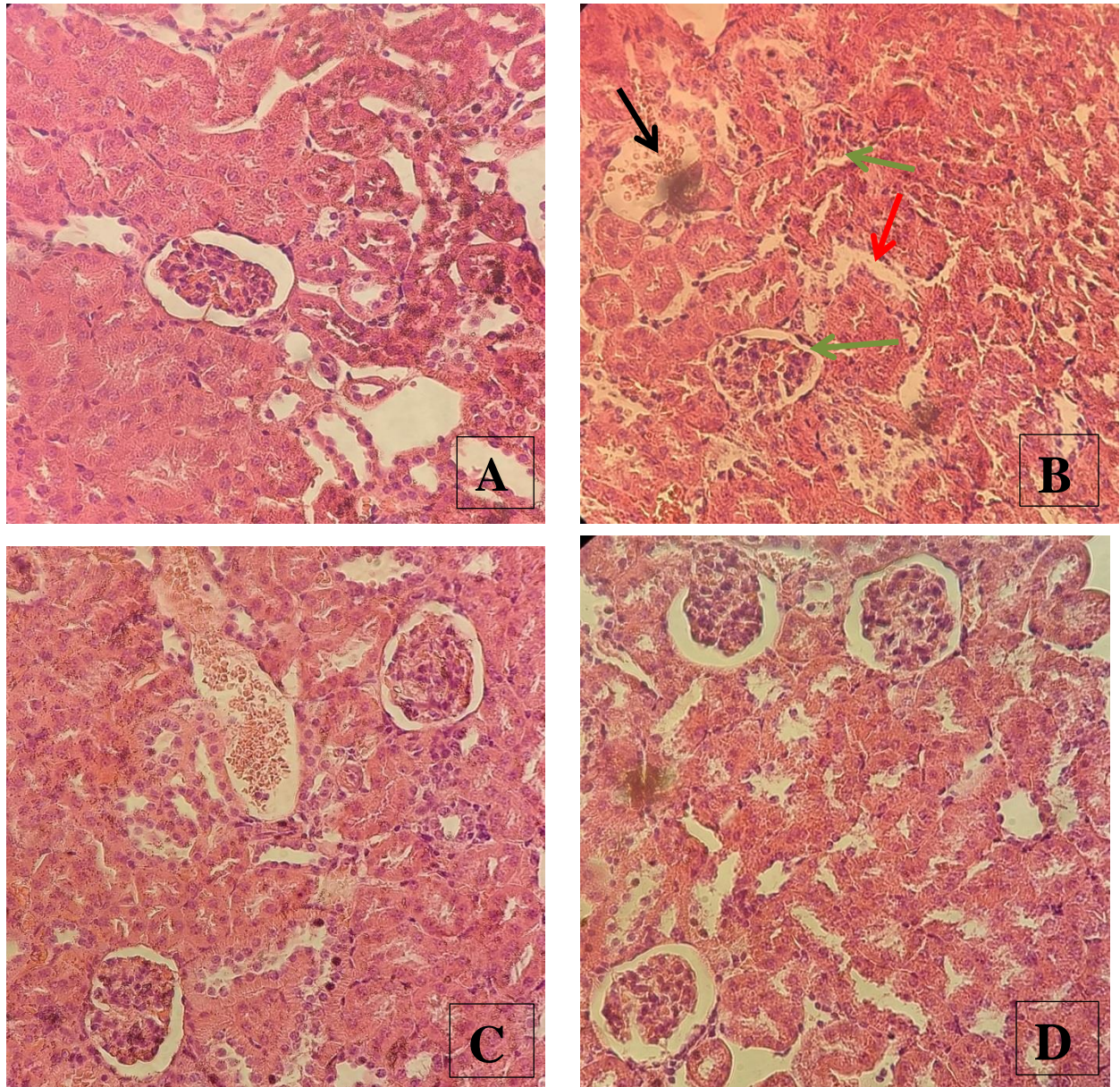


Figure 19. Coupes histologiques (X400) des tissus rénaux des souris : Témoin (A), traitées par le BaP seul (100 mg/kg) (B), EEP (25 mg/kg) + BaP (100mg/kg) (C), ou l'EEP seule à (25mg/kg) (D).

- ➔ Congestion
- ➔ Espace glomérulaire
- ➔ Tubule distaux

Chez le témoin, le tissu rénal a révélé une architecture normale et saine (A) avec conservation nette des glomérules et des tubules rénaux, avec absence de congestion et d'inflammation interstitielle.

Cependant, l'examen histopathologique des reins du groupe traité par le BaP a révélé des dommages rénaux étendus: une congestion (flèches noir) ainsi que des dilatations dans les tubules distaux (flèches rouge) et réduction de l'espace glomérulaire (Flèche verte) (B). ces anomalies sont liées au phénomène de stress oxydatif induit par le BaP et ses métabolites sur l'unité fonctionnelle du rein.

Par contre le prétraitement par l'extrait de la propolis à 25 mg/kg (C) montre une atténuation considérable de ces anomalies histopathologiques en comparaison avec le groupe traité par le BaP seul. Ceci explique l'effet cytoprotecteur de l'EPP contre les dommages tissulaires de cetoxyque.

Le traitement par l'EPP seule (D) répresente un aspect tissulaire comparable à celui du groupe témoin.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Cosan et al. (2008) qui ont montré que le benzo(a)pyréne, à une dose de 10 mg/kg/j par voie orale pendant 40 jours, a provoqué de forts dommages au niveau du tissu rénal. De plus, l'étude de Bhadauria et al. (2008) a signalé la capacité de la propolis, a une dose de 50 mg/kg, à améliorer de manière significative tout altération de l'histo-architecture rénale avec un espace uniforme entre les glomérules et la paroi de la capsule de Bowman.

Les résultats de l'étude histologique sont en accord avec ceux des dosages tissulaires ce qui confirme la toxicité rénale du BaP et l'effet réno-protecteur de la propolis

Dans le domaine de la recherche biologique, beaucoup d'efforts ont été réalisés ces dernières années pour la recherche de nouveaux traitements naturels, l'étude de leurs éléments d'efficacité et la compréhension de leur mode d'action. Au cours des travaux réalisés dans la présente étude, nous nous sommes focalisés sur la propolis l'un des produits les plus complexes de la ruche ainsi l'analyse de l'effet réno-protecteur de cette substance contre une toxicité aigüe induite par le benzo(a)pyrène. Les résultats obtenus nous permis de conclure que :

- La propolis de *Jijel (Chekfa)* utilisée est très riche en polyphénols et en flavonoïdes et présente une forte activité anti-radicalaire et concentration dépendante contre les radicaux DPPH° et contre le peroxyde d'hydrogène mieux que celle de l'acide ascorbique.
- Le BaP à (100mg/kg/ip) possède une forte toxicité rénale et présente un effet pro-oxydant par altération de la balance (antioxydant/prooxydant) rénale. Il induit un déficit dans le système antioxydant cellulaire que ce soit enzymatique (SOD et CAT) ou non enzymatique (GSH) ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique qui se traduit par l'élévation des taux du Malondialdéhyde (MDA).
- Le prétraitement par la propolis à 25mg/kg/j pendant 5jours présente un intérêt réel par son effet protecteur contre la toxicité du B(a)P. Ceci est prouvé par la diminution de l'ampleur de la peroxydation lipidique et l'augmentation de l'activité des enzymes anti-oxydantes et des taux de GSH.

En raison de cette toxicité le recours aux sources naturelles douées d'activité antioxydante s'avère très avantageux et d'actualité. Les activités biologiques observées dans la présente étude tendent dans une certaine mesure à valider les utilisations pharmacologiques de cette précieuse substance.

En effet, ce travail ne représente qu'une étude préliminaire qu'elle est certes prometteuse mais qui nécessite d'autres études complémentaire et plus approfondies pour mieux se concentrer sur les effets révélés. Il serait souhaitable de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres du statut antioxydant et pro-oxydant. Des études à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour apprécier les mécanismes de toxicité du benzo(a)pyrène et ceux de l'effet protecteur de la propolis et pour identifier les molécules bioactives composants l'extrait de propolis responsables de ces effets.



- ❖ **Adedara IA., Daramola YM., Dagunduro JO et al.** (2015). Renoprotection of Kolaviron against benzo(a)pyrene-induced renal toxicity in rats. *Renal failure*. 37(3): 497-504.
- ❖ **Agbato I.** (2007). Établissement de la cinétique d'excrétion urinaire du 3-hydroxy-benzo(a)pyrène suite à l'injection de faibles doses de benzo(a)pyrène chez le rat Sprague-Dawley mâle.
- ❖ **Ahn MR., Kumazawa S., Usui Y et al.** (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*.10(4): 1383-1392.
- ❖ **Ahn MR., Kunimasa K., Kumazawa S et al.** (2009). Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular nutrition & food research*.53(5): 643-651.
- ❖ **Aldahmash BA., El-nagar DM et Ibrahim KE.** (2016). Reno-protective effects of propolis on gentamicin-induced acute renal toxicity in swiss albino mice. *Nefrología (English Edition)*. 36(6): 643-652.
- ❖ **Alyane M., Kebsa W., Benguedouar L., Boussenane HN et al.** (2008). Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 21(3).
- ❖ **Amirat A.** (2014). Contribution à l'analyse physicochimique et pollinique du miel de *Thymus algeriensis* de la région de Tlemcen. *Thèse de doctorat*.
- ❖ **Ancerewicz J., Migliavacca E., Carrupt PA et al.** (1998). Structure–property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 25(1): 113-120.
- ❖ **Ardestani A et Yazdanparast R.** (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food chemistry*. 104(1): 21-29.
- ❖ **Arvouet GA., Vennat B., Pourrat A et Legret P.** (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 4: 462– 468.
- ❖ **Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A et Legret P.** (1994). Standardization d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. *Journal de Pharmacie de Belgique*. 49: 462- 468.
- ❖ **Asha S et Giriya D.** (2011). Benzo[a]pyrene induced liver and kidney cancer in swiss albino mice. *Research in Pharmacy*.
- ❖ **ATSDR.** (1995). (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile For Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Atlanta (USA)*,p. 458.
- ❖ **Auberval N.** (2010). Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. *Thèse de doctorat*. Strasbourg.

- ❖ **Autrup H., Grafstrom RC., Brugh M et al.** (1982). Comparison of benzo(a)pyrene metabolism in bronchus, esophagus, colon, and duodenum from the same individual. *Cancer research*. 42(3): 934-938.

B

- ❖ **Baek SO., Field RA., Goldstone ME., Kirk PW., Lester JN et Perry R.** (1991). A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water, Air, & Soil Pollution*. 60: 279-300.
- ❖ **Baghdad H.** (2018). Etude de la composition chimique et évaluation biologique de la propolis de plusieurs regions de tlemcen algerie. *thèse de doctorat*.
- ❖ **Bankova V.** (2005).Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2(1): 29-32.
- ❖ **Bankova V., Popova M et Trusheva B.** (2007). Plant origin of propolis: latest developments and importance for research and medicinal use. *Apicultura-De la stiinta la agribusiness si apiterapie, Editura Academic Pres.* p. 40-46.
- ❖ **Bankova VS., De Castro SL et Marcucci MC.** (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 31(1): 3–15.
- ❖ **Banskota AH., Nagaoka T., Sumioka LY et al.** (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of ethnopharmacology*. 80(1) : 67-73.
- ❖ **Banskota AH., Tezuka Y et Kadota S.** (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*. 15(7): 561-571.
- ❖ **Banskota AH., Tezuka Y., Adnyana IK., Midorikawa K., Matsushige K., Message D., Huertas AA et Kadota S.** (2000). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil. Peru. the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*. 72(1-2): 239-246.
- ❖ **Banskota AH., Tezuka Y., Prasain JK., Matsushige K., Saiki I et Kadota S.** (1998). Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*. 61(7): 896-900.
- ❖ **Baudin B.** (2006).Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt Cardio*. 2(1): 43-52.
- ❖ **Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., Narbonne JF., Burgeot T., Michel X et Bellocq J.** (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus* sp.) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research*. 47(5): 415-439.
- ❖ **Benguedouar L., Bousenane HN., Kbsa W et al.** (2008). Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats.

- ❖ **Bhadoria M., Nirala SK et Shukla S.** (2008). Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and chemical toxicology*. 46(8) : 2703-2712.
- ❖ **Bisson M., Diderich R., Dujardin R., Hulot C., Lacroix G., Lamy MH., Lefevre JP., Leveque S., Magaud H et Tissot S.** (2006). Benzo(a)pyrène. *NERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques version*. p. (2-3).
- ❖ **Boffetta P., Jourenkova N et Gustavsson P.** (1997). Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*. 8: 444-472.
- ❖ **Boisard S.** (2014). Caractérisation chimique et valorisation biologique d'extraits de propolis. *Thèse de doctorat. Université d'Angers*.
- ❖ **Bonnard M., Brondeau MT., Clavel T., Falcy M., Jargot D., Lafontaine M., Reynier M et Schneider O.** (2007). Benzo(a)pyrène. *INRS fiche toxicologique FT 144*.
- ❖ **Bonnefont RD., Théron P et Delattre J.** (2003). Radicaux libre et antioxydant. In: Delattre, J., Durand, G., Jardillier, JC. *Biochimie pathologique*. Flammarion, Paris. p. 317.
- ❖ **Bonsib SM.** (2014). Atlas of medical renal pathology. *Springer Science & Business Media*.
- ❖ **Bonvehí J et Gut iérrez A.** (2011). Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain) .*Journal of the American Oil Chemists' Society*. 88: 1387–1395.
- ❖ **Bosetti C., Boffetta P et La Vecchia C.** (2007). Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers. *a quantitative review to 2005*.18(3): 431-46.
- ❖ **Bouchard M et Viau C.** (1999). Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: biological monitoring strategies and methodology for determining biological exposure indices for various work environments. *Biomarkers*. 4: 159-187.
- ❖ **Boufadi Y., Soubhye J., Riazi A et al.** (2014). Characterization and antioxidant properties of six Algerian propolis extracts: ethyl acetate extracts inhibit myeloperoxidase activity. *International journal of molecular sciences*. 15(2): 2327-2345.
- ❖ **Bourgart E., Barbeau D., Marques M., Von Koschembahr A., Béal D., Persoons R., Leccia MT., Douki T et Maitre A.** (2019). A realistic human skin model to study benzo[a]pyrene cutaneous absorption in order to determine the most relevant biomarker for carcinogenic exposure. *Arch Toxicol*. 93(1): 81-93.
- ❖ **Boutabet K., Keba W., Alyane M et al.** (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., Mitov I et Krastev Z.** (2005). Activity of Bulgarian propolis against *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *Journal of Medical Microbiology*. 54: 481-483.
- ❖ **Bradford MM.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1-2): 248-254.
- ❖ **Brand WW., Cuvelier ME et Berset CLWT.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*. 28(1): 25-30.
- ❖ **Branen AL., Davidson PM et Katz B.** (1980). Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. *Food Technology (USA)*.
- ❖ **Brinkmann J., Stolpmann K., Trappe S et al.** (2013). Metabolically Competent Human Skin Models: Activation and Genotoxicity of Benzo[a]pyrene. *Toxicological Sciences*.131: 351-359.
- ❖ **Burczynski ME et Penning TM.** (2000). Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer research*. 60(4): 908-915.
- ❖ **Burdock GA.** (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*. 36: 347–363.

τ

- ❖ **Caino MC., Oliva JL., Jiang H., Penning TM et Kazanietz MG.** (2007). Benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol Promotes Checkpoint Activation and G2/M Arrest in Human Bronchoalveolar Carcinoma H358 Cells. *Molecular pharmacology*. 71(3): 744–750.
- ❖ **Cardinault N., Cayeux MO et Du sert PP.** (2012) La propolis: origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*. 10(5): 298–304.
- ❖ **Castaldo S et Capasso F.** (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73(1): 51–56.
- ❖ **Chaaya RY.** (2010). Rôle du stress oxydant induit par les monoamines oxydases dans la fibrose rénale: étude in vivo dans un modèle d'ischémie reperfusion chez le rat. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. *Université Toulouse III-Paul Sabatier*.
- ❖ **Chen MR., Tsai PJ et Wang YF.** (2008). Assessing inhalatory and dermal exposures and their resultant health-risks for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contained in oil mists in a fastener manufacturing industry. *Environment international*. 34(7): 971-5.
- ❖ **Chopra S., Pillai KK., Husain SZ et Giri DK.** (1995). Propolis protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Experimental and molecular pathology*. 62(3): 190-198.

- ❖ **Christelle KR.** (2006). Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition Clinique et métabolisme*. 20: 165–177.
- ❖ **Clairbone A.** (1985). Catalase activity. In: Greenwald, R.A. Edition. Handbook of Methods of Oxygen Radical Research. *CRC Press, Boca Raton*.p. 283-284.
- ❖ **Cosan Di., Basaran A., Gunes HV et al.** (2008). The effect of doxorubicin on rats that received toxic and carcinogenic benzo (a) pyrene. *Folia histochemica et cytobiologica*. 46(3): 367-372.
- ❖ **Cuvillier A.** (2015). Miel, Propolis, Gelée royale: Les abeilles alliées de notre système immunitaire. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. *Université de Lille 2 faculté des Sciences Pharmaceutiques*.

D

- ❖ **De Lizorieux CPM.** (2013). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. Thèse de doctorat. *Université Paris Sud-Paris XI*.
- ❖ **Deby DG., Deby C et Lamy M.** (1999). Neutrophil myeloperoxidase : its role in health and disease. *Intensivmed*. 36: 500-13
- ❖ **Deng C., Dang F., Gao J., Zhao H., Qi S et Gao M.** (2018). Acute benzo[a]pyrene treatment causes different antioxidant response and DNA damage in liver, lung, brain, stomach and kidney. *Heliyon*.4(11): e00898.
- ❖ **Derakhshesh N., Salamat N., Movahedinia A., Hashemitabar M et Bayati V.** (2019). Exposure of liver cell culture from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, to benzo[a]pyrene and light results in oxidative damage as measured by antioxidant enzymes. *Chemosphere*. 226: 534-544.
- ❖ **Dewanto V., Xianzhong WU., Adom KK et al.** (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50(10): 3010-3014.
- ❖ **Donadieu Y.** (2008). La Propolis. Editions Dangles. Paris. p. 90.
- ❖ **Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N et Avimadj M.** (2008). Oxidants, antioxidants and oxidative stress. In: Mitochondrial medicine. 1^{ère} Edition. *Gvozdjakova A*. p.19-4.

E

- ❖ **El Demerdash FM., Attia AA et Elmazoudy RH.** (2012). Biochemical and histopathological changes induced by different time intervals of methomyl treatment in mice liver. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 47(12): 1948-1954.

- ❖ **El Sohaimy SA et Masry SHD.** (2014). Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of Egyptian and Chinese propolis. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences.14*: 1116-1124.
- ❖ **Ellman CL.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 82: 70-77.
- ❖ **Erboga M., Aktas C., Erboga ZF et al.** (2015). Quercetin ameliorates methotrexate-induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats. *Renal failure.* 37(9): 1492-1497.
- ❖ **Evans P et Halliwell B.** (1999). Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 884: 19-40.

F

- ❖ **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
- ❖ **Favier JC., Ireland-Ripert J., Toque C et Feinberg M.** (1995). Répertoire général des aliments: table de composition= composition tables.
- ❖ **Ferhoum F.** (2010). Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales. (*apis mellifica intermissa et apis mellifica sahariensis*). *Thèse de doctorat.*
- ❖ **Fiala Z., Vyskocil A., Krajak V., Viau C., Ettlerova E., Bukac J., Fialova D et Emminger S.** (2001). Environmental exposure of small children to polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Archives of Occupational Environmental Health.* 74: 411-420.
- ❖ **Foth H., Kahl R et Kahl GF.** (1988). Pharmacokinetics of Low-Doses of Benzo[a]Pyrene in the Rat. *Food and Chemical Toxicology.* 26: 45-51.
- ❖ **Frye C., Hoelscher B., Cyrus J et al.** (2003). Association of lung function with declining ambient air pollution. *Environmental health perspectives.* 111(3): 383-387.

G

- ❖ **Gadouche L.** (2010). Identification de médicaments interagissant sur la génotoxicité du benzo(a)pyrène. Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en biologie. *université du Québec à Montréal.* p.3-4.
- ❖ **Gaertner RR et Theriault GP.** (2002). Risk of bladder cancer in foundry workers: a meta-analysis. *Occupational and environmental medicine.* 59(10): 655-63.
- ❖ **Gardana C et Simonetti P.** (2011). Evaluation of allergens in propolis by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* 25(11): 1675-1682.
- ❖ **Gardès AM., Bonnefont RD., Abedinzadeh Z et Jore D.** (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique.* p. 91.

- ❖ **Garg R et Kumar A.** (2008). Possible role of citalopram and desipramine against sleep deprivation-induced anxiety like-behavior alterations and oxidative damage in mice.
- ❖ **Garre C., Ceballos PI., Germain G et Al-Gubory KH.** (2007). Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂α-induced luteal cell death in vivo. *Free Radical Research*. 41: 251-259.
- ❖ **Govindarajan R., Vijayakumar M et Pushpangadan P.** (2005). Antioxidant approach to disease management and the role of 'Rasayana'herbs of Ayurveda. *Journal of ethnopharmacology*. 99(2): 165-178.
- ❖ **Guichardant M., Bacot S., Moliere P et al.** (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.
- ❖ **Gülçin I., Bursal E., Sehitoglu MH., Bilsel M., Görden AC.** (2010). Polyphenols contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2227–2238.

H

- ❖ **Hamza SM et Dyck JRB.** (2014). Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol. *Frontiers in physiology*. 5: 292.
- ❖ **He SX., Nicholson RA et Law FCP.** (1998). Benzo(a)pyrene toxicokinetics in the cricket following injection into the haemolymph. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 6: 81-89.
- ❖ **Hennebelle T.** (2006). Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants. *Chimie Organique et Macromoléculaire Docotrat*. p.303.
- ❖ **Higashi KO et De Castro SL.** (1995). Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacology*. 46: 55-8.
- ❖ **Huang M., Joensson HN et Nielsen J.** (2018). High-throughput microfluidics for the screening of yeast libraries. In: *Synthetic Metabolic Pathways*. Humana Press. New York, NY. p.307-317.
- ❖ **Huang S., Zhang CP., Wang K et al.** (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*. 19(12): 19610-19632.
- ❖ **Huleihel M et Ishano V.** (2001). Effect of propolis extract on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus. *Archives of virology*. 146(8): 1517-1526.

I

- ❖ **IARC.** (1983). Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *IARC, editor. Lyon*. p. 211-24.

- ❖ **IARC.** (2006). *International Agency for Research on Cancer*. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. p. 92.
- ❖ **IARC.** (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures, Lyon, France, Geneva: *IARC Press. Distributed by World Health Organization.*
- ❖ **INSERM.** (2001). Institut national de la santé et de la recherche médicale. Expertise collective - Susceptibilités génétiques et expositions professionnelles. *Paris, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.*
- ❖ **Iqbal Z., Akhtar MS., Sindhu ZUD., Khan MN et Jabbar A.** (2003). Herbal dewormers in livestock-a traditional therapy. *International Journal of Agriculture and Biology.* 2:199-206.
- ❖ **Izuta H., Shimazawa M., Tsuruma K., Araki Y., Mishima S et Hara H.** (2009). Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 9(1): 45.

I

- ❖ **Jacques C., Perdu E., Duplan H et al.** (2010). Disposition and biotransformation of C-14-Benzo(a)pyrene in a pig ear skin model: Ex vivo and in vitro approaches. *Toxicology Letters.*199: 22-33.
- ❖ **Jiang H., Gelhaus SL., Mangal D., Harvey RG., Blair IA et Penning TM.** (2007). Metabolism of Benzo[a]pyrene in Human Bronchoalveolar H358 Cells Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*20 (9): 1331–1341.
- ❖ **Joly d.** (2002). Néphrologie. 3^{ème} Edition. *Vernazobre-Grego.* p.186-189, 212-228.

K

- ❖ **Kalam S., Singh R., Mani A., Patel J., Naem KF et Pandey A.** (2012). Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal.* 1: 18-34.
- ❖ **Kao J., Patterson FK et Hall J.** (1985). Skin penetration and metabolism of topically applied chemicals in six mammalian species, including man: an in vitro study with benzo[a]pyrene and testosterone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 81: 502-516.
- ❖ **Kasala ER., Bodduluru LN., Barua CC et al.** (2015). Benzo(a)pyrene induced lung cancer: role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports.* 67(5): 996-1009.
- ❖ **Kawamura Y., Kamata E., Ogawa Y et al.** (1988). The Effect of Various Foods on the Intestinal-Absorption of Benzo(a)Pyrene in Rats. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan.* 29(1): 21-25.
- ❖ **Kaysen GA.** (2000). Inflammation et stress oxydant dans l'insuffisance rénale terminale. *Flammarion Médecine-Sciences Actualités Néphrologiques.* p. 35-46.

- ❖ **Kebsa W., Lahouel M., Rouibah H., Zihlif M., Ahram M., Abu-Irmaileh B., Mustafa E., J. Al-Ameer H et Al Shhab M.** (2018). Reversing multidrug Resistance in chemo-resistant human lung adenocarcinoma (A549/DOX) cells by Algerian propolis through direct inhibiting the p-gp efflux-pump, G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis induction. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 18(9): 1330-1337.
- ❖ **Kebsa W., Rouibah H et 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.
- ❖ **Kebsa W., Rouibah H., Bousnane HN., Bengueduer L., Alyane M et Lahouel M.** (2007). Effect of a long term treatment by algerian propolis flavonoids on mitochondrial antioxidant-prooxidant balance. *West African J pharm and Drug Research*. 22(1): 16-26.
- ❖ **Keser S., Duzgun S et Aksoy A.** (2012). Application of spatial and non-spatial data analysis in determination of the factors that impact municipal solid waste generation rates in Turkey. *Waste Management*. 32: 359–371.
- ❖ **Keshavarz M., Mostafaie A., Mansouri K et al.** (2009). Inhibition of corneal neovascularization with propolis extract. *Archives of medical research*. 40(1): 59-61.
- ❖ **Kessler M., Ubeau G., Jung L.** (2002). Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* 55: 1-11.
- ❖ **Kim J., Kim S., An KW et al.** (2010). Molecular cloning of *Daphnia magna* catalase and its biomarker potential against oxidative stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology & Pharmacology*. 152(3): 263-269.
- ❖ **Klaunig JE et Kamendulis LM.** (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44: 239-267.
- ❖ **Klein J.** (2009). Le récepteur B1 des kinines dans la fibrose rénale: des mécanismes au potentiel thérapeutique. Thèse de doctorat. *Université de Toulouse, Université Toulouse III- Paul Sabatier*.
- ❖ **Koc AN., Silici S., Kasap F., Hormet-Oz HT., Mavus-Buldu H et Ercal BD.** (2011). Antifungal Activity of the Honeybee Products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. *Journal of Medicinal Food*. 14 (1-2): 128-134.
- ❖ **Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Chritov R et Popov S.** (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*. 64 (3): 235-240.
- ❖ **Kumazawa S., Hamasaka T et Nakayama T.** (2004). Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins. *Food Chemistry*. 84(3): 329–339.

- ❖ **Lacolley P., Babuty D., Boulanger C., Ghaleh B., Loirand G., Pinet F et Samuel JL.** (2007). Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux. *Edition John Libbey Eurotext*. Paris. p. 312, 316, 317.
- ❖ **Lagnika L.** (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat. *Strasbourg I*.
- ❖ **Lahouel M., Boulkour S., Segueni N et al.** (2004). Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathologie Biologie*. 52(6): 314-322.
- ❖ **Lahouel M., Boutabet K., kebsa W et al.** (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4 (10): 712-720.
- ❖ **Landrigan PJ.** (2017). Air pollution and health. *The Lancet Public Health*. 2(1) : e4-e5.
- ❖ **Laughton MJ., Halliwell B., Evans PJ., Robin J et Hout S.** (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical pharmacology*. 38(17): 2859-2865.
- ❖ **Lee BK., Chung MY et Lee KW.** (2013). Benzo[a]pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide inhibits gap junction intercellular communication via phosphorylation of tumor progression locus 2 in WB-F344 rat liver epithelial cells. *Molecular carcinogenesis*. 54(5): 351-358.
- ❖ **Lee W., Shin HS., Hong JE et al.** (2003). Studies on the analysis of benzo(a)pyrene and its metabolites in biological samples by using high performance liquid chromatography/fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 24: 559-565.
- ❖ **Lin SC., Lin YH., Chan CF., Chung CY et Hsu SH.** (1997). The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *American Journal of Chinese Medicine*. 25(3-4): 325-332.
- ❖ **Lushchak VI.** (2011). Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 153(2): 175-190.



- ❖ **Manawadi S et Kaliwal B.** (2010). Methomyl induced gonadal dysfunction, biochemical contents and enzyme activities in male albino mice. *International Journal of Biotechnology Applications*. 2(2): 20-32.
- ❖ **Marcucci MC., Rodriguez J., Ferreres F., Bankova V.** (1998). Chemical composition of brazilian propolis from Sao Paulo state. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 53(1-2): 117-119.

- ❖ **Marfak A.** (2011). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat. *Université de Limoges*. p. 6-7-27-45.
 - ❖ **Marie C., Maitre A., Douki T., Gateau M., Tarantini A et al.** (2008). Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts, *Journal of Applied Toxicology*. 28(5): 579-590.
 - ❖ **Marklund S et Marklund G.** (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*. 47(3): 469-474.
 - ❖ **Marusawa H., Ichikawa K., Narita N., Murakami H., Ito K et Tezuka T.** (2002). Hydroxyle radical as a strong electrophilic species. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10: 2283 – 2290.
 - ❖ **Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C et Giovannini C.** (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compound in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*. 16(10): 577-586.
 - ❖ **Migdal C et Serres M.** (2011). Reactive oxygen species and oxidative stress. *Medecine Science*. Paris. 27(4): 405-412
 - ❖ **Moir D., Viau A., Chu I et al.** (1998). Pharmacokinetics of benzo[a]pyrene in the rat. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 53: 507-530.
 - ❖ **Moreira L., Dias LG., Pereira JA et Estevinho L.** (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical toxicology*. 46(11): 3482-3485.
 - ❖ **Moudir N.** (2004). Les polyphénols de la propolis algérienne. Thèse de magister en chimie. *Université Mohamed Boudiaf*. M'sila.
 - ❖ **Mouhoubi-Tafinine Z., Ouchemoukh S et Tamendjari A.** (2016). Antioxydant activity of some algerian honey and propolis. *Industrial Crops and Products*. 88: 85-90.
 - ❖ **Murawska-CiaŁowicz E., Jethon Z., Magdalan J., Januszewska L., Podhorska-OkoŁów M., Zawadzki M et al.** (2011). Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the liver, kidneys and brain of rats administered with benzo(a)pyrene. *Experimental and toxicologic pathology*. 63(1-2): 97-103.
 - ❖ **Murphy MP., Packer MA., Scarlett JL et Martin SW.** (1998). Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *General Pharmacology: The Vascular System*. 31(2): 179-186.
- N*
- ❖ **Negri G., Marcucci C., Salatino A et Salatino MLF.** (2000). Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 11(5): 453-457.


- ❖ **Nirala SK et Bhadauria M.** (2008). Propolis reverses acetaminophen induced acute hepatorenal alterations: a biochemical and histopathological approach. *Archives of Pharmacal Research.* 31(4): 451.



- ❖ **Okhawa H., Ohishi N et Yagi K.** (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry.* 95(2): 351-358.
- ❖ **Okutan H., Ozcelik N., Yilmaz HR et 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 PA., Colaço Aura., Chaves R et al.** (2007). Chemical carcinogenesis. *Anais da academia brasileira de ciências.* 79(4): 593-616.
- ❖ **Orth SR., Ritz E et Schrier RW.** (1997). The renal risks of smoking. *Kidney Int.* 51: 1669-77.
- ❖ **Ozbek E.** (2012). Induction of oxidative stress in kidney. *International journal of nephrology.* 2012.
- ❖ **Oztürk F., Kurt E., Inan UU., Emiroğlu L et Ilker SS.** (1999). The effects of acetylcholine and propolis extract on corneal epithelial wound healing in rats. *Cornea.* 18(4): 466-471.



- ❖ **Palackal NT., Lee SH., Harvey RG., Blair IA et Penning TM.** (2002). Activation of polycyclic aromatic hydrocarbontrans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *Journal of Biological Chemistry.* 277(27): 24799-24808.
- ❖ **Pan L et Zhang H.** (2006). Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 144(1): 67-75.
- ❖ **Park JH., Mangal D., Tacka KA., Quinn AM., Harvey RG., Blair IA et Penning TM.** (2008). Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 105: 6846–6851.
- ❖ **Park JH., Troxel AB., Harvey RG et Penning TM.** (2006). PAH o-quinones produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species. *Chemical research in toxicology.* 19(5): 719.
- ❖ **Park PJ., Jung WK., Nam KS., Shahidi F et Kim SK.** (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from proteinhydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American oil Chemists Society.* 78(6): 651-656.
- ❖ **Park YK., Alencar SM et Aguiar CL.** (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50(9): 2502–2506.

- ❖ **Penning TM.** (2004). Aldo-Keto Reductases and Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon o-Quinones. *Methods Enzymol.* 378: 31–67.
 - ❖ **Penning TM., Burczynski C., Hung K., Mccoull N., Palackal et al.** (1999). –Quinones. *Chemical Research in Toxicology.* 12(1): 1999.
 - ❖ **Penning TM., Ohnishi ST., Ohnishi T et Harvey RG.** (1996). Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chemical research in toxicology.* 9(1): 84-92.
 - ❖ **Perez C., Lopez de Cerain A et Bello J.** (2002). Modulation of mutagenic activity in meat samples after deep-frying in vegetable oils. *Mutagenesis.* 17: 63-66.
 - ❖ **Pham-Huy LA., He H et Pham-Huy C.** (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Medecine.* 4: 89-96.
 - ❖ **Phillips DH.** (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutational Research.* 443: 139-147.
 - ❖ **Philpot RM et Smith BR.** (1984). Role of Cytochrome P-450 and Related Enzymes in the Pulmonary Metabolism of Xenobiotics. *Environmental Health Perspect.* 55: 359-367.
 - ❖ **Pichaud N.** (2005). Effets biologiques d'une exposition par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur une espèce bioindicatrice, *Mya Arenaria*. Thèse de doctorat. Université du Québec à Rimouski.
 - ❖ **Pietta PG., Gardana C et Pietta AM.** (2002). Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia.* 73: S7-S20.
 - ❖ **Pisoschi AM et Pop A.** (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry.* 97: 55-74.
 - ❖ **Pitot HC.** (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer.* 72: 962-970.
 - ❖ **Popova M., Bankova V., Chimov A et Silva MV.** (2002). A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from Myroxylon balsamum trees. *Apidologie.* 33(1) : 87-88.
 - ❖ **Prüss-Üstün A et Corvalán C.** (2006). Preventing disease through healthy environments: towards an estimate of the environmental burden of disease. *Geneva: World Health Organization.* 12.
 - ❖ **Pushparajah DS., Umachandran M., Plant KE., Plant N et Ioannides C.** (2008). Upregulation of the glutathione S-transferase system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung. *Mutagenesis.* 23: 299-308.
- 
- ❖ **Rajendran P., Ekambaram G et Sakthisekaran D.** (2008). Protective role of mangiferin against Benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in experimental animals. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 31(6): 1053-1058.

- ❖ **Ramesh A., Inyang F., Hood DB., Archibong AB., Knuckles ME et Nyanda AM** (2001). Metabolism, bioavailability, and toxicokinetics of benzo(alpha)pyrene in F-344 rats following oral administration. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 53(4): 275-90.
 - ❖ **Ramos AFN et Miranda JL.** (2007). Propolis: A Review of Its Anti-Inflammatory and Healing Actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 13: 697–710.
 - ❖ **Remirez D., Gonzalez R., Rodrigues S., Ancheta O., Bracho JC., Rosado A., Rojas E et Ramos ME.** (1997). Protective effects of Propolis extract on allyl alcohol-induced liver injury in mice. *Phytomedicine*. 4(4): 309-314
 - ❖ **Reynaert NL., Aesif SW., McGovern T., Brown A., Wouters EF., Irvin CG et Janssen-Heininger YM.** (2007). Catalase overexpression fails to attenuate allergic airways disease in the mouse. *The Journal of Immunology*. 178(6): 3814-3821.
 - ❖ **Rezaire A.** (2012). Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua (patawa)*. Thèse de doctorat. *Antilles-Guyane*.
 - ❖ **Robinson JR., Felton JS., Levitt RC et al.** (1975). Relationship between "aromatic hydrocarbon responsiveness" and the survival times in mice treated with various drugs and environmental compounds. *Molecular pharmacology*. 11: 850-865.
 - ❖ **Ruch RJ., Cheng SJ et Klaunig JE.** (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*. 10(6): 1003-1008.
- §
- ❖ **Sadikovic B et Rodenhiser DI.** (2006). Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 216(3): 458-468.
 - ❖ **Said RA., Grassi TF., Scolastici C., De Lima ROA., Darros BR., Barbisan LF et De Camargo JLV.** (2010). Absence of chemopreventive influence of propolis on the rat liver altered foci development. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 62(4) : 405-412.
 - ❖ **Sancini G., Farina F., Battaglia C et al.** (2014). Health risk assessment for air pollutants: alterations in lung and cardiac gene expression in mice exposed to Milano winter fine particulate matter (PM_{2.5}). *PLoS One*. 9(10): e109685.
 - ❖ **Sanders CL., Skinner C et Gelman RA.** (1984). Percutaneous-Absorption of Benzo[a]Pyrene 7,10-C-14 and [7,12-C-14] Dimethylbenz[a]Anthracene in Mice. *Environmental Research*. 33: 353-360.
 - ❖ **Sayed S M., El-Ella, GAA., Wahba NM., El-Nisr NA., Raddad K., El Rahman MFA., Hafeez A et Aamer AEF.** (2009). Immune Defense of Rats Immunized with Fennel Honey, Propolis, and Bee Venom Against Induced Staphylococcal Infection. *Journal Medicinal Food*. 12: 569-575.

- ❖ **Scheibmeir HD., Christensen K., Whitaker SH., Jegaethesan J., Clancy R et Pierce JD.** (2005). A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs.* 21(1): 8–24.
- ❖ **Segueni N.** (2011). Contribution à l'étude de la composition chimique et des propriétés biologiques de la propolis. *Thèse de doctora.* Université de constantine1. Algerie.
- ❖ **Seibert JB., Bautista-Silva JP., Amparo TR., Petit A., Pervier P., Dos Santos Almeida JC et al.** (2019) Jul. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food Chem.* 30(287): 61-67.
- ❖ **Servais S.** (2004). Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat. *Université Claude Bernard-Lyon I.*
- ❖ **Sforcin JM et Bankova V.** (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of ethnopharmacology.* 133(2): 253-260.
- ❖ **Sha S et Girija D.** (2011). Benzo[a]pyrene induced liver and kidney cancer in *swiss albino* mice. *Research in Pharmacy.*
- ❖ **Sharma A et Sharma US.** (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International journal of pharmaceutics.* 154(2): 123-140.
- ❖ **Shubik P., Pietra G et Della PG.** (1960). Studies of skin carcinogenesis in the Syrian golden hamster. *Cancer research.* 20: 100-105.
- ❖ **Singleton VL et Rossi JA.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture.* 16(3): 144-158.
- ❖ **Sinha M et Dash DK.** (2018). Mangiferin protects renal impairment against benzo (a) pyrene induced toxicity by regulating mitochondrial and dna integrity. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics.* 8(1): 92-97.
- ❖ **Smith LE., Denissenko MF., Bennett WP., Li H., Amin S., Tang MS et Pfeifer GP.** (2000). Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of the National Cancer Institute.* 92(10): 803-811.
- ❖ **Smithgall TE., Harvey RG et Penning TM.** (1988). Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *Journal of Biological Chemistry.* 263(4): 1814-1820.
- ❖ **Sobočanec S., Šverko V., Balog T., Šarić A., Rusak G., Likić S et Marotti T.** (2006). Oxidant/antioxidant properties of Croatian native propolis. *Journal of agricultural and food chemistry.* 54(21): 8018-8026.
- ❖ **Soltani E K., Cerezuela R., Charef N., Mezaache-Aichour S., Esteban MA et Zerroug MM.** (2017). Algerian propolis extracts: Chemical composition, bactericidal activity and in

vitro effects on gilthead seabream innate immune responses. *Fish & shellfish immunology*. 62: 57-67.

- ❖ **Song YS., Park EHJ., Kyung J et al.** (2002). Inhibition of angiogenesis by propolis. *Archives of pharmacal research*. 25(4): 500-504.
- ❖ **Spinelli JJ., Demers PA., Le ND., Friesen MD., Lorenzi MF., Fang R et Gallagher RP.** (2006). Cancer risk in aluminum reduction plant workers (Canada). *Cancer Causes Control*. 17: 939-948.
- ❖ **Sumedha SA., Marjorie EA et Abhaya SB.** (2006). Effect of cigarette smoke on body weight, food intake and reproductive organs in adult albino rats.
- ❖ **Sylvie M.** (1977). Néphropathies d'origine médicamenteuse chez les carnivores domestiques. Thèse de doctorat. *Université claudes-bernard-lyon i*.
- ❖ **Szczeklik A., Szczeklik J., Galuszka Z et al.** (1994). Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environ Health Perspect*. 102: 302-304.



- ❖ **Taleb-Senouci D., Ghomari H., Krouf D et al.** (2009). Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 16(6-7): 623-631.
- ❖ **Tanaka S., Mizorogi T., Nishijima K et al.** (2009). Body and major organ weights of A/J-Chr 11SM consomic mice. *Experimental animals*. 58(4): 357-361.
- ❖ **Tekpli X., Rivedal E., Gorria M., Landvik NE., Rissel M., Dimanche-Boitrel MT., Baffet G., Holme JA et Lagadic-Gossmann D.** (2010). The B[a]P-increased intercellular communication via translocation of connexin-43 into gap junctions reduces apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 242: 231-240.
- ❖ **Temime B.** (2002). Contribution à l'étude de la partition des HAP entre les phases gazeuse et particulaire: validation de la technique de prélèvement par tube dénuder annulaire. Thèse de doctorat. *Université de Provence-Aix-Marseille I*.
- ❖ **Thannickal VJ et Fanburg BL.** (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 279: 1005-28.
- ❖ **Tolba MF., Azab SS., Khalifa AE et al.** (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB life*. 65(8): 699-709.
- ❖ **Touafek O.** (2010). Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud algérien. Thèse de doctorat. *Université de Constantine*. p. 9-12-76.
- ❖ **Toussoun Z., Rashed A et Hegazi AG.** (1997). Honey and propolis as management of some chronic skin ulcers. *International Symposium on Apitherapy Cairo*. Egypt. p. 8-9.



- ❖ **Valcic S., Muders A., Jacobsen NE et al.** (1999). Antioxidant chemistry of green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-epigallocatechin gallate with peroxy radicals. *Chemical research in toxicology*. 12(4): 382-386.
- ❖ **Valente MJ., Baltazar AF., Henrique R et al.** (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., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M et Mazur M.** (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160(1): 1-40.
- ❖ **Van R., Joost GM., Veeger., Mirjam MS., Bodelier-Bade., Monika M et al.** (1994). Smoking and dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons as sources of interindividual variability in the baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. *International archives of occupational and environmental health*. 66 (1): 55-65.
- ❖ **Vincent AM., Russell JW., Low P et Feldman EL.** (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine reviews*. 25: 612-628.
- ❖ **Vincent JL et Martin C.** (2008). Le syndrome de détresse respiratoire aigüe. *Edition Springer Berlin Heidelberg New York*. p. 172.

W°

- ❖ **Wessel N.** (2010). Étude des voies de bioactivation du benzo[a]pyrène et du fluoranthène chez la sole commune, *Solea solea*: Profil métabolique et génotoxicité. Thèse de doctorat. *Université de Bordeaux*.
- ❖ **Weyand EH et Bevan DR.** (1986). Benzo(a)pyrene disposition and metabolism in rats following intratracheal instillation. *Cancer Reserch*. 46: 5655-5661.
- ❖ **Whitin JC., Tham DM., Bhamre S et al.** (1998). Plasma glutathione peroxidase and its relationship to renal proximal tubule function. *Molecular genetics and metabolism*. 65(3): 238-245.
- ❖ **WHO.** (1998). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. In: WHO Task Group on Environmental Health Criteria for Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (ed) Environmental health criteria, Geneva. *World Health Organization*.1 online resource.
- ❖ **Wild SR., Mitchell DJ., Yelland CM et Jones KC.** (1992). Arrested Municipal Solid-Waste Incinerator Fly-Ash as a Source of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons (Pahs) to the Environment. *Waste Manage Research*. 10: 99-111.
- ❖ **Winterbourn CC.** (2015). Are free radicals involved in thiol based redox signaling? *Free radical biology and medicine*. 80: 164-170.

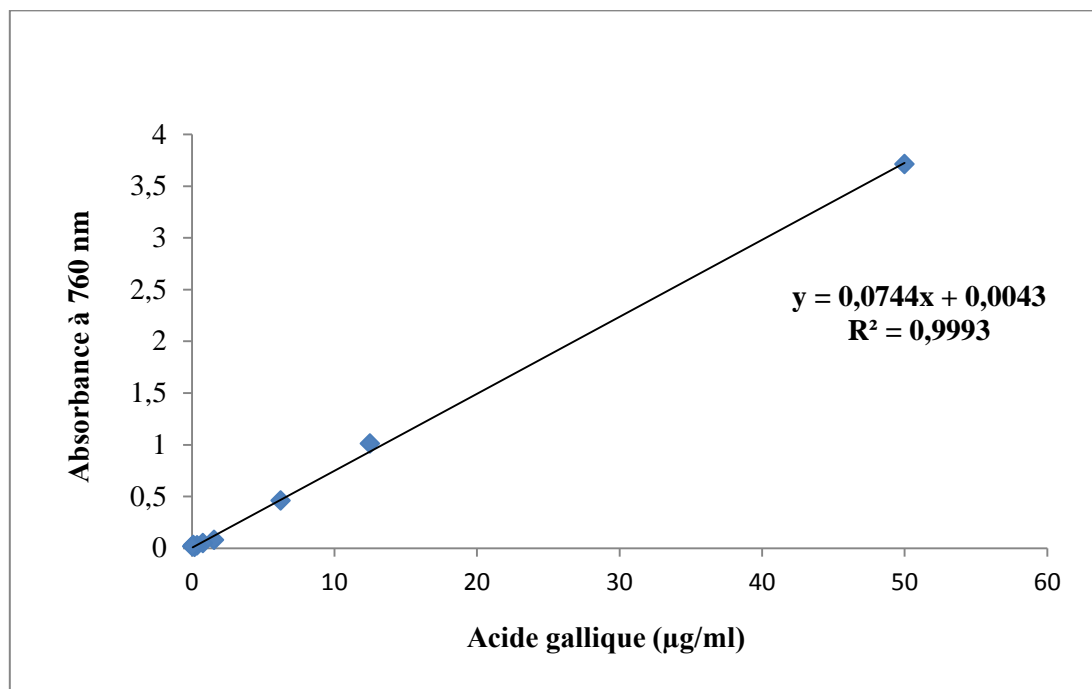
- ❖ **Wojdani A et Alfred LJ.** (1984) Alterations in cell-mediated immune functions induced in mouse splenic lymphocytes by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Research*. 44: 942-945.
- ❖ **Wolff RK., Griffith WC., Henderson RF et al.** (1989). Effects of repeated inhalation exposures to 1-nitropyrene, benzo[a]pyrene, Ga₂O₃ particles, and SO₂ alone and in combinations on particle clearance, bronchoalveolar lavage fluid composition, and histopathology. *J. Toxicol Environ Health*. 27: 123-138.
- ❖ **Wu JQ., Kosten TR et Zhang XY.** (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*. 46: 200-206 .

Y

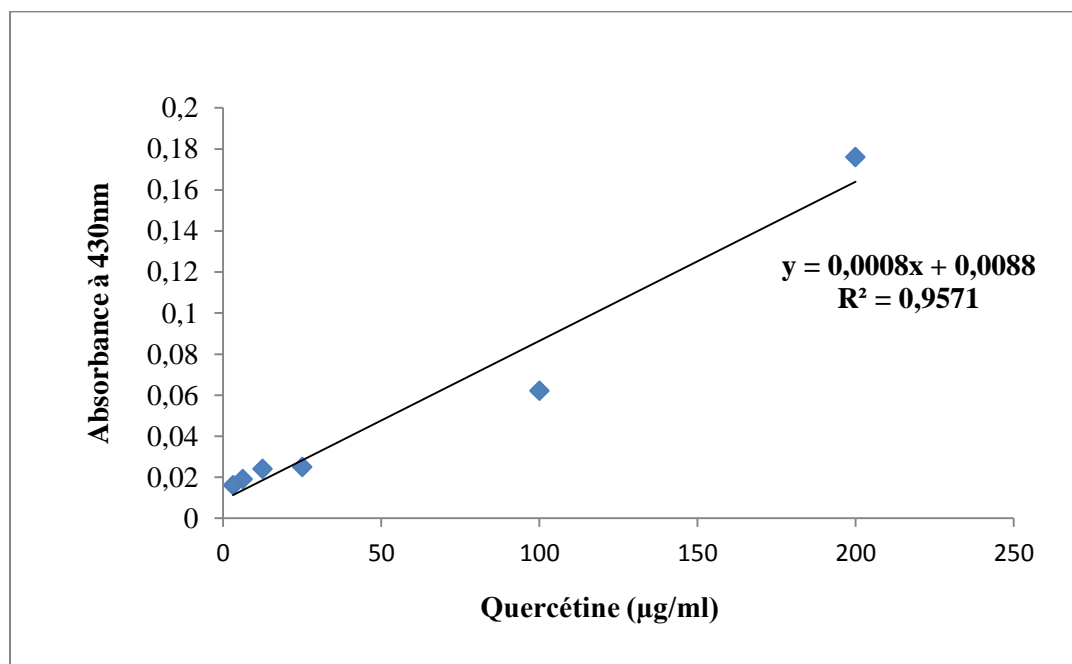
- ❖ **Yang H., Zhang H., Pan T et al.** (2018). Benzo(a)pyrene promotes migration, invasion and metastasis of lung adenocarcinoma cells by upregulating TGIF. *Toxicology letters*. 294: 11-19.
- ❖ **Yen GC., Chen HY., et Peng HH.** (1997). Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45(1): 30-34.
- ❖ **Yoshino I., Kawano D., Oba T., Yamazaki K., Kometani T et Maehara Y.** (2006). Smoking status as a prognostic factor in patients with stage I pulmonary adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*. 81: 1189-1193.

Z

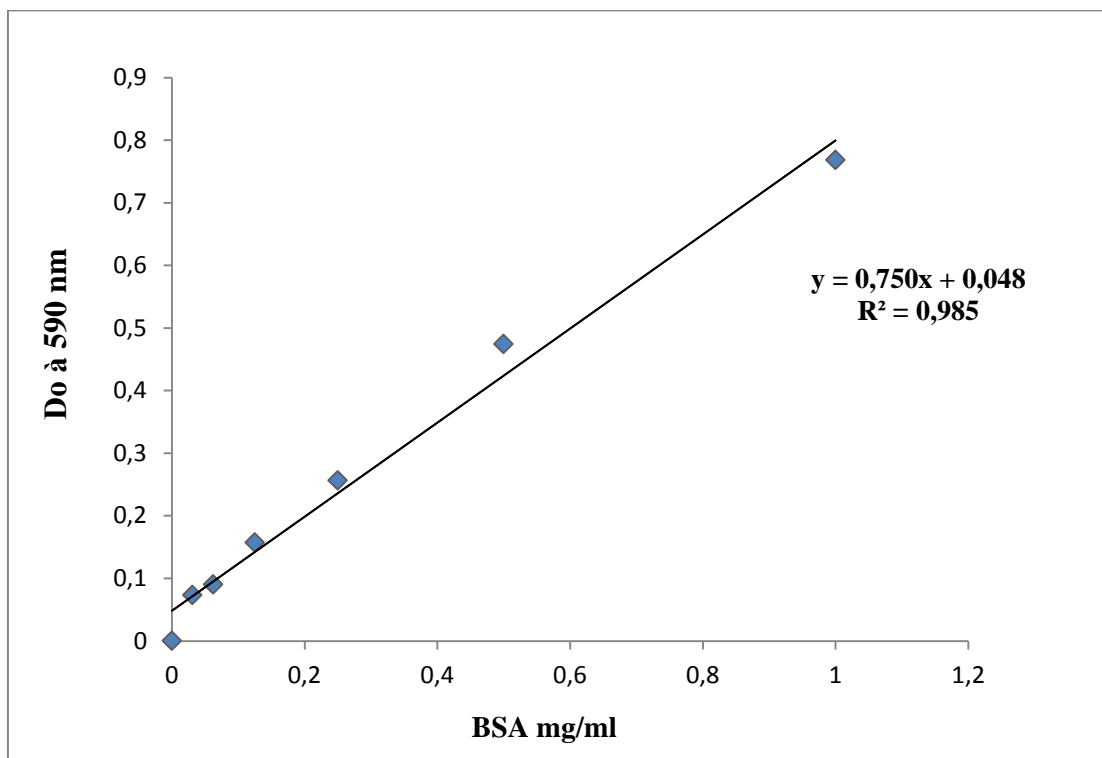
- ❖ **Zhang J., Chang L., Jin H., Xia, Y., Wang L., He W., Li W et Chen H.** (2016). Benzo(a)pyrene promotes lung cancer A549 cell migration and invasion through up-regulating cytokine IL8 and chemokines CCL2 and CCL3 expression. *Exp Biol Med (Maywood)*. 241: 1516-1523.



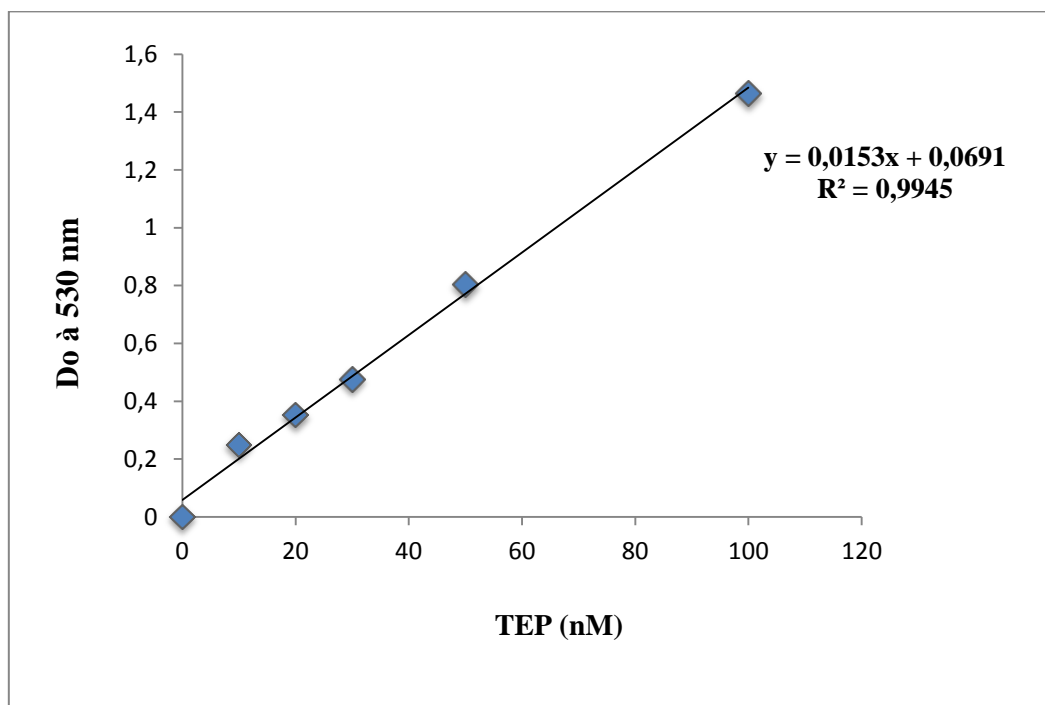
Annexe 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (pour le dosage des polyphénols).



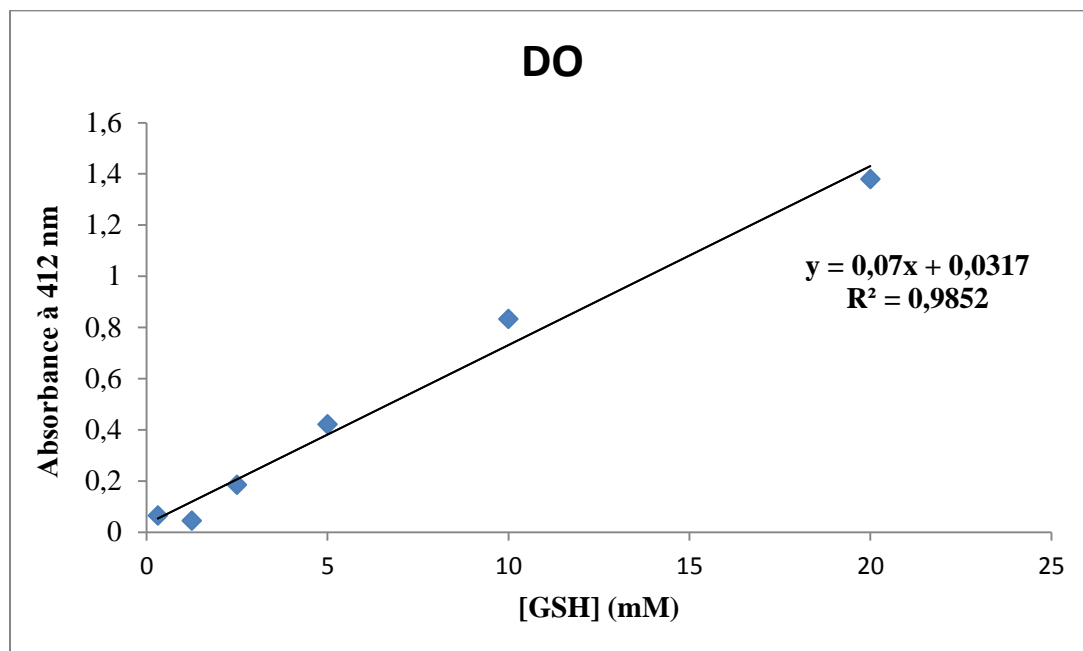
Annexe 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (pour le dosage des flavonoïdes).



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



Annexe 4. Courbe étalon du MDA (TEP comme standard).



Annexe 5. Courbe d'étalonnage de glutathion.

Réalisée par :

- Affane Nour-El houda
- Fantazia Meriem

Encadré par :

Mme KEBSA W.

Evaluation de l'effet protecteur de l'extrait éthanolique de la propolis de Jijel contre la toxicité rénale aiguë du benzo(a)pyrène chez la souris.**Résumé**

Le benzo(a)pyrène est un contaminant environnemental puissant ayant un potentiel cancérigène et présente une toxicité rénale importante. Cette toxicité est due essentiellement aux dommages oxydatifs liés à la formation des espèces réactives de l'oxygène. La présente étude vise à évaluer l'effet réno-protecteur de la propolis contre la toxicité aiguë du benzopyrène chez la souris *albinos wistar*. L'étude phyto-chimique a montré que l'extrait éthanolique de la propolis est très riche en polyphénols et en flavonoïdes. Il possède une activité anti-radicalaire concentration dépendante contre le radical libre DPPH° et contre le H₂O₂ avec des IC₅₀ de 30.54 µg/ml et 42.04 µg/ml respectivement. Le benzo(a)pyrène à la dose de 100mg/kg induit des altérations au niveau du tissu rénal qui se traduit par une augmentation significative de malondialdéhyde (MDA), comme marqueur de la peroxydation lipidique, ainsi qu'une diminution significative des systèmes antioxydants non enzymatiques (GSH) et enzymatiques (CAT et SOD). Le prétraitement par la propolis à la dose de (25 mg /kg /jour) pendant 5 jours a permis de protéger le tissu rénal par le maintien de l'équilibre de la balance antioxydant-prooxydant à travers la réduction des taux du MDA et le maintien des taux de GSH et de l'activité des enzymes antioxydants SOD et CAT à des niveaux normaux. L'étude histologique a permis de confirmer la toxicité rénale du B(a)P et l'effet préventif de la propolis.

Mots clés : Benzo(a)pyrène, stress oxydant, toxicité rénale, propolis, effet préventif.

Abstract

Benzo(a)pyrene is a potent environmental contaminant having carcinogenic potential and a significant renal toxicity. This toxicity is mainly due to oxidative damage related to the formation of reactive oxygen species. The purpose of this study is to evaluate the protective effect of propolis against the acute toxicity of benzo(a)pyrene in albino wistar mice. The phytochemical study showed that the ethanolic extract of propolis (EEP) is very rich in polyphenols and flavonoides. It possesses a concentration dependent antiradicalar activity against free radical DPPH ° and against H₂O₂ with IC₅₀ 30.54 µg/ml et 42.04 µg/ml respectively. Benzo(a)pyrene at 100 mg/kg induces an alteration in renal tissues, characterized by a significant increase in malondialdehyde (MDA), as a marker for lipid peroxidation, as well as a significant decrease in non-enzymatic (GSH) and enzymatic (CAT and SOD) antioxidant systems. Pretreatment with propolis at a dose of (25 mg / kg / day) for 5 days protected the renal tissue by maintaining the antioxidant-prooxidant balance through the reduction of MDA levels and the maintenance of GSH and the antioxidant enzymes at normal levels (SOD and CAT). The histological study confirmed the renal toxicity of B (a) P and the preventive effect of propolis.

Key words : Benzo(a)pyrene, oxidative stress, renal toxicity, propolis, preventive effect

المخلص

البنزو(أ)بيرين ملوث بيئي قوي له قدرة مسرطنة وسمية كلوية مهمة. هذه السمية ناتجة بشكل أساسي عن الأوكسدة المرتبطة بتكوين أنواع الأوكسجين التفاعلية. الغرض من هذه الدراسة هو تقييم التأثير الوقائي للدنج ضد السمية الحادة التي يسببها البنزو(أ)بيرين عند فئران التجارب. أظهرت الدراسة النباتية الكيميائية أن المستخلص الإيثانولي للدنج غني جدا بمتعددات الفينول والفلافونويد ويملك تأثير أسر ضد الجذور الحرة °DPPH وH₂O₂ متعلق بالتركيز حيث تقدر ال CI50 ب 30.54 و 42.04 ميكروغرام / مل على التوالي. استخدام البنزو(أ)بيرين بجرعة 100 ملغ/ كغ عند جردان التجارب تسبب في حدوث تغييرات في الأنسجة الكلوية التي تؤدي إلى زيادة كبيرة في MDA، كعلامة لبيروكسيد الدهون، وكذلك انخفاض كبير في أنظمة مضادات الأوكسدة غير الأنزيمية (GSH) والأنزيمية (CAT و SOD). المعالجة المسبقة بالدنج بجرعة (25 ملغ / كغ / يوم) لمدة 5 أيام تحمي الأنسجة الكلوية عن طريق الحفاظ على توازن توازن مضادات الأوكسدة من خلال الحد من مستويات MDA و الحفاظ على مستويات GSH ونشاط إنزيمات مضادات الأوكسدة SOD و CAT في المستويات العادية. سمحت الدراسة النسيجية بالتأكد من السمية الكلوية للبنزو(أ)بيرين ومن التأثير الوقائي للدنج.

الكلمات المفتاحية: البنزو(أ)بيرين، الاجهاد التأكسدي، التسمم الكلوي، الدنج، التأثير الوقائي.