

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 hépato-protecteur de l'extrait éthanolique de la propolis de Jijel contre la toxicité aigüe du Benzo(a)pérene B(a)P chez la souris.

Membres de Jury

Président : Dr. AISSAOUI S.
Examineur: Dr. BOUHAFS L.
Encadreur : M^{me} KEBSA W.

Présenté par :

BENBEKHMA Naima.
CHELAGHEMA Roqiya.
KHELIFI Halima.

Année Universitaire 2018-2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) :.....



Remerciements

Avant tout nous remercions « Allah » tout puissant.

*Nous remercions en particulier M^{me} **Kebsa W.** pour ses qualités d'encadrement, à la fois scientifiques et humaines. Pour la patience dont il a su faire preuve. Il s'est beaucoup investi dans ces travaux et a été à l'origine de nombreuses idées.*

*Nos vifs remerciements vont à Dr. **Aïssaoui S.** qui nous a honorés en acceptant de présider le jury.*

*Nous tenons également à remercier Dr. **Bouhafss L.** d'avoir bien voulu examiner notre travail.*

Nous avons également un grand plaisir à côtoyer les membres du laboratoire de Recherche et laboratoire de Pharmacologie, nous pensons en particulier à Mokhtar, Wahiba, Ziad et Yahia. Vous nous avez beaucoup aidés par vos conseils et encouragements.

Nous remercions également l'ensemble des panélistes pour leur volonté, participation et sens de serviabilité.

Merci beaucoup à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce projet et qui ont laissé un impact positif sur nous à travers leurs aides et leurs manières d'être.

Roqiya, Halima, Naima



<i>Liste des abréviations</i>	<i>i</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>ii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>iii</i>
Introduction	01

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1. Le benzo(a)pyrène

1.1. Structure et propriétés du B(a)P	02
1.2. Voies d'exposition au B(a)P chez l'homme	03
1.3. Toxicocinétique du B(a)P	04
1.3.1. Absorption	04
1.3.2. Distribution	04
1.3.3. Biotransformation	05
1.3.4. Élimination	07
1.4. Toxicité du B(a)P	08
1.4.1. Toxicité aiguë	08
1.4.2. Toxicité chronique	08
1.5. Cancérogénicité du B(a)P	09

Chapitre 2. Toxicité hépatique du B(a)P

2.1. Rappel sur le foie	10
2.2. Mécanismes d'induction du stress oxydant hépatique par le B(a)P	11
2.2.1. Production de ROS par le B(a)P	12
2.2.2. Dommages oxydatifs de l'ADN nucléaire et mitochondriale	13
2.2.3. Dommages oxydatifs aux lipides : la peroxydation lipidique	13
2.2.4. Dommages oxydatifs aux protéines	14
2.2.5. Effets sur les systèmes de défense antioxydants	14
2.3. Induction de la mort cellulaire par le B(a)P	16
2.3.1. La mort cellulaire par nécrose	16
2.3.2. La mort cellulaire par apoptose	16

Chapitre 3. La propolis

3.1. Définition et étymologie de la propolis	17
3.2. Origine de la propolis	17
3.3. Les propriétés physico-chimiques de la propolis	17

3.3.1. Propriétés physiques.....	17
3.3.2. Propriétés chimiques.....	18
3.4. Composition chimique de la propolis.....	18
3.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques de la propolis.....	19
3.5.1. Activité anti-oxydant.....	20
3.5.2. Activité anti-inflammatoire.....	20
3.5.3. Activité anti-cancéreuse et cytotoxique.....	21
3.5.4. Autres activités.....	21
3.6. Toxicité de la propolis.....	22

Matériel et Méthodes

1. Etude phytochimique et activité anti-radicalaire de la propolis.....	23
1.1. Récolte de la propolis.....	23
1.2. Préparation de l'extrait éthanolique de la propolis.....	23
1.3. Dosage des polyphénols totaux.....	23
1.4. Dosage des flavonoïdes totaux.....	24
1.5. Etude des propriétés anti-radicalaires par le test au DPPH°(2.2. Diphenylpicrylhydrazyl).....	24
1.6. Mesure du pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	25
2. Etude <i>in vivo</i>	26
2.1. Entretien et traitement des animaux.....	26
2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement du foie.....	26
2.3. Dosages tissulaires.....	27
2.3.1. Préparation de la fraction cytosolique.....	27
2.3.2. Dosage des protéines.....	27
2.3.3. Dosage du MDA cytosolique.....	27
2.3.4. Dosage du glutathion (GSH).....	28
2.4. Evaluation de l'activité des enzymes anti-oxydants.....	28
2.4.1. Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD).....	28
2.4.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT).....	29
2.5. Étude histologique.....	29
2.6. Analyse statistique.....	30

Résultats et discussion

1. Etude phyto-chimique et activité anti-radicalaire de la propolis.....31

 1.1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes.....31

 1.2. Effet anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis contre le radical libre DPPH° 32

 1.3. Variation du pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)34

2. Evaluation de l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité hépatique aigue de B(a) P35

 2.1. Evolution pondérale des animaux sous l'effet des différents traitements.....36

 2.2. Evaluation du stress oxydant hépatique.....37

 2.2.1. Dosage du glutathion (GSH) 37

 2.2.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA) 39

 2.2.3. Variation de l'activité des enzymes anti-oxydantes SOD et CAT 40

 2.3. Etude histologique microscopique43

Conclusion.....46

Référence Bibliographique

Annexe

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 : Bovine Sérique Albumine
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).
EAG : Equivalent Acide Galique.
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acetic
EEP : Extrait Ethanolique de Propolis
EGFR: Epidermal growth factor receptor.
EH : Epoxyde Hydrolase.
EQ : Equivalent Quercétine.
ERO : Espèces réactives de l'oxygène.
GPx : Glutathion peroxydase.
GSH : Glutathion réduit
GSSG : Glutathion oxydé
GST : Glutathion-S-Transférase.
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
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
ROS: Reactive oxygen species
SOD: Superoxydes dismutase
TBA: Thiobarbic acid
TCA: Trichloracetic acid.
TNB: Thionitrobenzoic acid

Liste des figures

Figures	Titre	Page
Figure 1	Structure moléculaire du benzo(a)pyrène.	2
Figure 2	Induction des gènes cyp1a1 par le B(a)P.	5
Figure 3	Les 3 voies d'activation du benzo(a)pyrène.	7
Figure 4	Processus multi-étape du développement d'un cancer.	9
Figure 5	Anatomie du Foie.	10
Figure 6	Production de ROS lors de la voie des quinones.	13
Figure 7	Structure chimique des molécules citées entrant dans la composition des différentes propolis.	19
Figure 8	Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picryl hydrazyl).	24
Figure 9	Teneur en polyphénolset en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de la propolis en mg EAG/g et mg EQ /gde propolis respectivement.	31
Figure 10	Pourcentage de réduction du radical libre DPPH° par l'EEP, et l'acide ascorbique à différentes concentrations.	33
Figure 11	Pourcentage de réduction du peroxyde d'hydrogène de l'EEP et de l'acide ascorbique à différentes concentrations.	35
Figure 12	Variations des taux du GSH cytosolique hépatique après traitement par le benzopyrène absolu seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours à 25mg/kg.	38
Figure 13	Variations des taux du MDA cytosolique hépatique après traitement par le B(a)P (100mg/kg) seul ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours à 25mg/kg/j par voie orale.	39
Figure 14	Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu hépatique, après un traitement par le B(a)p seul (100mg/kg), en cas de prétraitement par la propolis (25mg/kg) seul et en cas de la combinaison propolis + B(a)P.	41
Figure 15	Variations de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique dans le tissu hépatique, après un traitement par le B(a)p seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par la propolis à (25mg/kg/j) pendant 5jours chez la souris.	42
Figure 16	Coupes histologiques de foie des souris témoins, des souris traités par EEP seul, des souris traitées par le B(a)P seul et des souris traités par EEP+B(a)P (10X10).	44

Liste des Tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Principales caractéristiques physico-chimiques du B(a)P. données obtenues à partir de l'IARC (1983).	3
Tableau 2	Les principales espèces réactives de l'Oxygène.	12
Tableau 3	Réactions de peroxydation lipidique.	14
Tableau 4	Composition de la propolis brute.	18
Tableau 5	Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans la propolis.	31
Tableau 6	Pourcentage de réduction du DPPH° parla propolis et l'acide ascorbique	32
Tableau 7	Pourcentage de piégeage du H ₂ O ₂ par l'extrait éthanolique de la propolis et l'acide ascorbique.	34
Tableau 8	Evolution pondérale des poids corporels, des rapports foie chez les souris traitées par le B(a)P seul (100mg/kg), en association avec la propolis (50 mg/kg) et la propolis seul (50mg/kg).	36

Introduction

Le benzo(a)pyrène B(a)P est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) présent dans l'atmosphère sous forme particulaire et généré lors de la combustion incomplète des matériaux organiques, de la circulation automobile, du chauffage domestique, du tabagisme et de l'alimentation (Taehoon et *al.*, 2019). L'hépatotoxicité provoqué par le B(a)P constitue une cause importante des maladies hépatiques (Deng et *al.*, 2018). Or, jusqu'à présent peu d'études ont été consacrées à l'évaluation de la toxicité hépatique 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 hépatique. D'où l'intérêt d'étudier cette toxicité et de chercher de nouvelles substances qui peuvent la réduire.

La biotransformation hépatique du B(a)P génère des métabolites qui sont impliqués dans leur toxicité. Elle induit également un stress oxydant *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont l'anion superoxyde $O^{\bullet-2}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle OH^\bullet . 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 des différentes mutations pouvant participer à l'initiation de cancers et aux différents dommages oxydants hépatiques (Bourgart et *al.*, 2019 ; Derakhshesh et *al.*, 2019).

Pour échapper aux conséquences de ce stress oxydatif, il est nécessaire de rétablir l'équilibre de la balance prooxydant/antioxydant par la recherche de nouvelles substances à activité anti-oxydantes. La propolis; substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillie par les abeilles sur certaines parties de végétaux, est très riche en polyphénols (Silva-Carvalho., 2015). Ces derniers sont responsables des propriétés anti-oxydantes de la propolis rapportées par plusieurs études (Rouibah et *al.*, 2008, Lahouel et *al.*, 2010, Kebsa et *al.*, 2014, Bouaroura et *al.*, 2019).

C'est dans ce cadre que s'inscrivent les objectifs de cette étude qui vise à déterminer l'ampleur de ce stress oxydatif hépatique lors d'une toxicité aigüe du B(a)P d'une part et à établir les mécanismes de l'effet protecteur de la propolis contre cette toxicité d'autre part. Et ce à travers l'évaluation des paramètres de stress oxydant cellulaire et la visualisation des changements tissulaires.

Synthèse
Bibliographique

Chapitre 1. Le benzo(a)pyrène

1.1. Structure et propriétés du B(a)P

Le benzo(a)pyrène B(a)P est un constituant majeur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), un polluant environnemental persistant et potentiel. Le B(a)P peut entrer dans le corps par fumée de tabac, eau, air et sols pollués, ainsi que des aliments, principalement les viandes et les poissons grillés, cuits au four et fumés ou mal nettoyés. Le B(a)P est largement présent dans les hot-dogs, hamburger, steak, huile végétale comestible, etc (Yuan *et al.*, 2017).

Le benzo(a)pyrène comporte cinq cycles non substitués. Il est constitué de deux régions qui sont des sites de réactions chimiques (Figure 1). La région k est la région comprise entre le quatrième et cinquième carbone. Cette région est une zone de grande densité électronique et de haute activité métabolique. La région baie est la région comprise entre le neuvième et le douzième carbone, elle est considérée comme étant très réactive (Miller *et al.*, 2001).

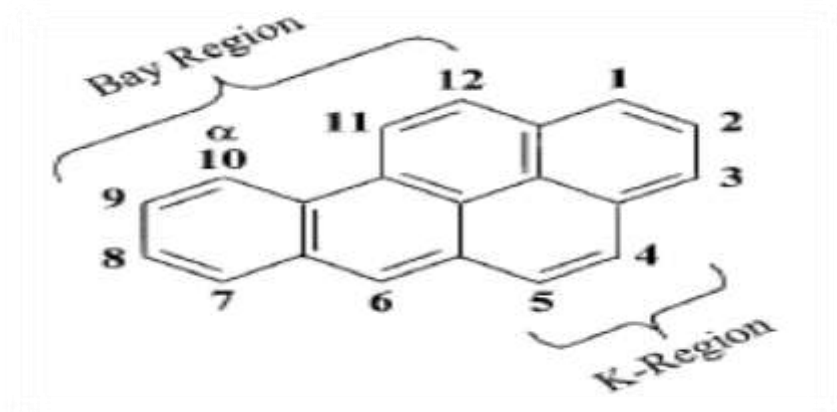
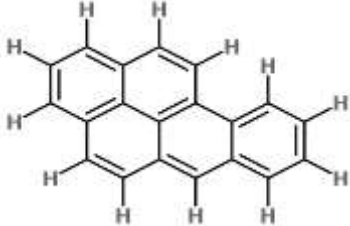


Figure 1. Structure moléculaire du benzo(a)pyrène (Miller *et al.*, 2001).

Le benzo(a)pyrène B(a)P est un cancérigène puissant et a été classé comme « cancérigène de (groupe 1) pour l'homme » par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC), et en tant que polluant majeur par l'Agence de Protection Environnementale des USA (USEPA) en raison de leur tératogénicité et cancérigénicité (Taehoon *et al.*, 2019).

Le nom officiel du B(a)P selon l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) est benzo(a)pyrène. Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont résumées dans le tableau 1 (IARC, 1983 ; IARC, 2010).

Tableau 1. Principales caractéristiques physico-chimiques du B(a)P (l'IARC, 1983).

Propriété	
Formule moléculaire	C ₂₀ H ₁₂
Structure chimique	
Numéro de registre	50-32-8
Noms et autres abréviations communes	B(a)P BAP 3,4-bp Bp 3,4-benzopyrène 3,4-benzpyrène 3,4-benz(a)pyrène benz(a)pyrène
Poids moléculaire (g/mol)	252,3
État physique	Solide, jaune pâle
Odeur	Légère odeur aromatique
Point de fusion (°C)	178,1
Point d'ébullition (°C)	310-312
Densité (g/cm³)	1,351
Solubilité dans l'eau (% de la masse)	Insoluble, 3×10 ⁻⁷ à 25 °C
Solubilité dans d'autres milieux	Très soluble dans le chloroforme, soluble dans le benzène, le toluène et le xylène

Les propriétés chimiques du B(a)P favorisent nettement son adsorption sur les particules, les sols et les sédiments. Ainsi, on estime qu'environ 82% du B(a)P rejeté dans l'environnement se loge dans les sols, 17 % dans les sédiments, 1 % dans l'eau et moins de 1 % dans l'air (Hattemer-Frey et Travis, 1991). La demi-vie associée à l'évaporation du B(a)P dans l'eau est estimée à 43 jours (Irwin, 1997). L'adsorption sur les sols et les sédiments limite l'évaporation. La demi-vie dans le sol peut être de 2 jours à 1,9 ans (U.S. EPA, 2007). Le B(a)P est raisonnablement stable dans l'air et peut être transporté sur des distances considérables. Dans l'air, le B(a)P est dégradé par photolyse.

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

L'homme est surtout exposé aux B(a)P suite à la cuisson des aliments comme les aliments trop grillés, rôtis, frits, fumés, suite à l'exposition aux gaz d'échappements des véhicules, aux émissions industrielles et aux feux de forêts. La fumée de cigarette constitue une voie d'exposition très importante ; un individu fumant 20 cigarettes par jour est exposé à environ 105 ng/j de B(a)P, un fumeur passif inhalant la fumée de cigarette pendant 5h est exposé à 40 ng/j

(Coullin, 2013). L'exposition professionnelle aux B(a)P peut être liée à des industries de raffinage du pétrole, la métallurgie, les industries du cuivre et de l'aluminium, d'usines de liquéfaction et de gazéification du charbon, de production de coke et des fours à coke, de distillation de goudron de houille, de production de toitures et revêtements, de fabrication des électrodes de carbone, et électriques (IARC, 2010). Les individus peuvent être exposés par inhalation ou par contact dermique.

1.3. Toxicocinétique du benzo(a)pyrène

1.3.1. Absorption

Le B(a)P est une substance lipophile (très peu soluble dans l'eau), cette propriété leur permet d'être facilement dissous dans la bicouche lipidique et de traverser les membranes cellulaires par diffusion passive. Le B(a)P peut être absorbé par différentes voies : la voie cutanée, respiratoire (inhalation) et gastrique (ingestion) (Marie, 2007). Lorsqu'il est inhalé, l'absorption à travers l'épithélium pulmonaire est rapide, cependant, sa vitesse d'absorption dépend de la taille des particules sur lesquelles le B(a)P est adsorbé.

La vitesse et la quantité de B(a)P absorbé dépendent surtout du véhicule. L'étude de Kawamura *et al.*, (1988) a montré que la composition des aliments avec lesquels le B(a)P était administré avait un grand impact sur son absorption. Ainsi, lorsque le B(a)P était administré avec des aliments lipophiles, entre 42 et 50% du B(a)P était absorbé. Pour d'autres types d'aliments, la proportion absorbée diminuait entre 20 et 30% (Kawamura *et al.*, 1988).

1.3.2. Distribution

Le B(a)P absorbé est rapidement distribué via le sang dans les ganglions lymphatiques thoraciques, le tractus respiratoire, les reins, le cerveau, les testicules et la rate, les taux les plus élevés sont retrouvés dans le foie (Bonnard *et al.*, 2007). Peu importe la voie d'administration, la répartition du B(a)P est similaire quel que soit le mode d'administration (sous cutanée, intraveineuse et intratrachéale) chez les souris et les rats. Des taux détectables de B(a)P peuvent être observés dans la plupart des organes internes de quelques minutes à quelques heures après l'administration (Fothet *al.*, 1988). Comme le B(a)P est une substance liposoluble, il est largement distribué et stocké dans les tissus adipeux et les glandes mammaires. Le B(a)P peut facilement traverser la barrière placentaire chez le rat et la souris (Witheyet *al.*, 1993).

La distribution du B(a)P est très importante dans tout l'organisme et l'équilibre entre les concentrations sanguines, hépatiques, dermiques et rénales est atteint dans les 2 heures suivant

l'exposition (Marie et *al.*, 2010). La diminution des concentrations plasmatiques pendant les premières heures suivant l'exposition est principalement due à son métabolisme hépatique lors d'une injection IV chez le rat (Heredia-Ortiz et *al.*, 2011).

1.3.3. Biotransformation

Le B(a)P est principalement métabolisé par le foie, ce processus de métabolisation est initié par une induction des enzymes de métabolisation (Figure 2). Le B(a)P est considéré comme un inducteur bi-fonctionnel: il augmente l'expression à la fois des CYP et des enzymes de détoxification de phase II. Cette induction est régulée par le récepteur aryl hydrocarbon (AhR) qui est spécifique des composés aromatiques.

Après son passage dans le cytosol, le B(a)P se lie directement au AhR. Une fois lié, le AhR se dissocie de la protéine Heatshock 90 et est rapidement transloqué dans le noyau où il forme un complexe avec son partenaire Arnt (Ah receptor nuclear translocator). Le complexe AhR/Arnt active l'expression d'une batterie de gènes contenant un élément de réponse aux xénobiotiques et active des éléments de réponse en amont de gènes de détoxification de phase II (Michaelson et *al.*, 2011).

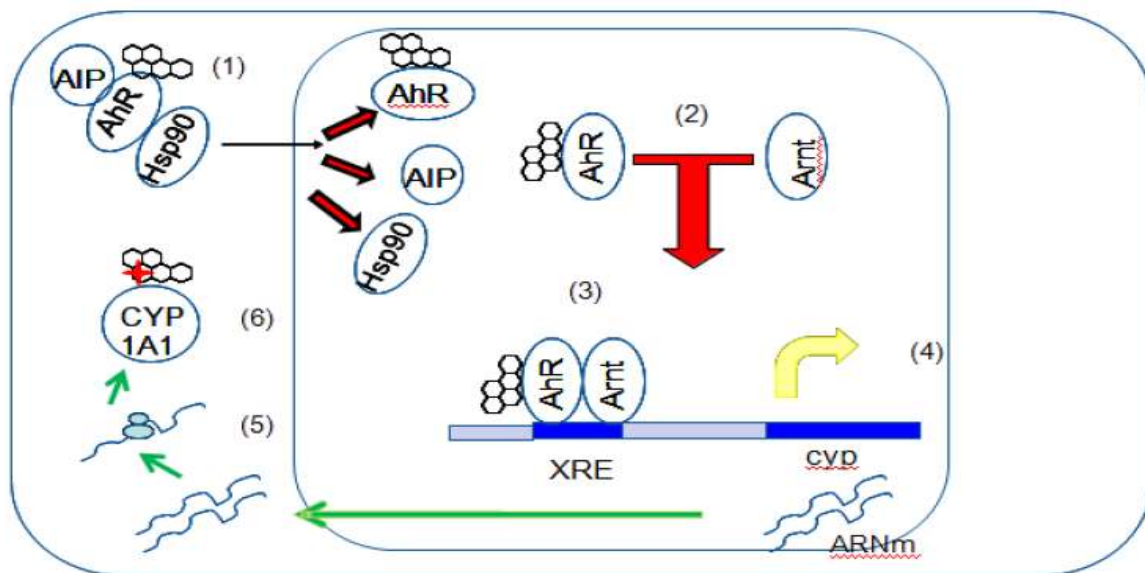


Figure 2. Induction des gènes *cypl1a1* par le B(a)P (Tarantini, 2009).

Le B(a)P est ensuite métabolisé par trois principales voies (Figure 3) (Zhang et *al.*, 2012) :

- Voie des diol-époxydes catalysée par les cytochromes P450 1A1 1B1.

- Voie d'oxydation mono-électronique catalysée par les cytochromes P450 peroxydases.
- La voie des quinones catalysée par les l'aldo-céto réductases (AKRs).

- **La voie des diol-époxydes**

Le B(a)P est converti en époxyde principalement par les enzymes du cytochrome P450 (CYP) (CYP1A1 et CYP1B1). Les époxydes du B(a)P sont hydratés par l'époxyde-hydrolase pour former des diols. Les aldo-cétoreductases convertissent les diols de B(a)P en catéchols (Lan et *al.*, 2004). L'époxydation secondaire par les CYP donne des diols-époxydes. Le B(a)P-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE) est le diol-époxyde de B(a)P le plus mutagène et le plus étudié, formant des adduits covalents avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) en position N2 de la désoxyguanosine (Fang et *al.*, 2001).

- **La voie du radical cation**

Cette voie également appelée voie d'oxydation mono-électrique est catalysée par les peroxydases cellulaires. Ces dernières catalysent l'oxydation à un électron du B(a)P pour former un radical cation de B(a)P instable chimiquement. Ce métabolite est l'un des composés génotoxiques directs qui forment des adduits instables avec les bases puriques (Kim et *al.*, 1997).

- **La voie des o-quinones**

Les étapes de formation de ces o-quinones sont en commun avec celles de la voie des diol-époxydes jusqu'à l'obtention du 7,8-dihydrodiol-B(a)P. Ce dernier sera donc métabolisé en catéchol par les AKR (aldo-kéto réductases), par la suite deux réactions d'oxydation transforment ce catéchol en B(a)P-7,8-dione ou B(a)P-o-quinone, espèce électrophile réactive vis-à-vis de l'ADN par la génération de bases oxydées notamment au niveau de la guanine : 7,8-dihydro-8-oxo-guanine. Cette voie métabolique entraîne la formation des adduits à l'ADN mais peut également être à l'origine d'une production des espèces réactive oxygénés : superoxyde ($\cdot\text{O}_2^-$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des radicaux hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) (Shertzer et *al.*, 2004).

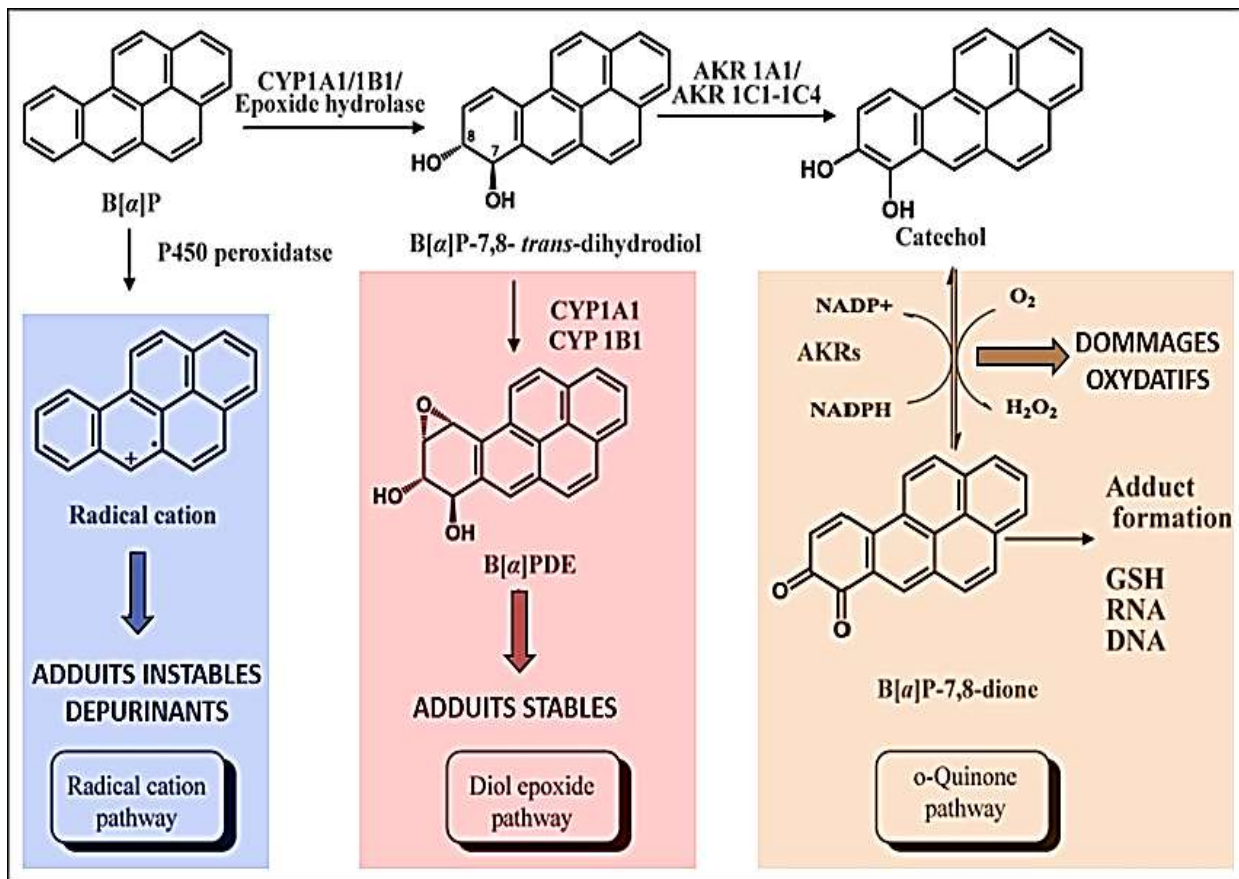


Figure 3. Les 3 voies d'activation du benzo(a)pyrène (Zhang *et al.*, 2012).

1.3.4. Elimination

L'excrétion hépatobiliaire et l'élimination fécale est la voie principale par laquelle le B(a)P est éliminé du corps, et ceci indépendamment de la voie d'administration (van de Wiele *et al.*, 1993). L'urine est une autre voie d'excrétion, mais reste sur le plan quantitatif, moins importante que les précédentes. En effet, les études animales montrent que 24 % de la dose de B(a)P radiomarqué sont présents dans la bile quelques heures après une administration IP et que plus de 50 % sont retrouvés dans les fèces (Kim *et al.*, 2012).

La très grande majorité du B(a)P est éliminée de l'organisme après métabolisation et conjugaison. Seulement 0,4 % de la dose de B(a)P administrée en IV à des rats sont éliminés en 72 heures dans les fèces sous forme inchangée (Marie *et al.*, 2010) contre 13 % pour le 3-OHBP (Heredia-Ortiz *et al.*, 2011). Des valeurs très proches sont obtenues par voie IP, avec 3 à 14 % du B(a)P éliminés dans les fèces sous forme de 3-OHBP (Tzekova *et al.*, 2004).

Dans les urines, plus de 80 % de la radioactivité urinaire retrouvée après administration IP de ¹⁴C-BaP à des rats correspondent là encore aux métabolites conjugués (Yang *et al.*, 1994).

1.4. Toxicité du B(a)P

1.4.1. Toxicité aiguë

On a trouvé peu d'information sur la toxicité aiguë chez les animaux. On considère que la toxicité aiguë du B(a)P par voie orale est assez faible, sa dose létale moyenne (DL50) étant supérieure à 1600 mg/kg p.c. chez la souris (Awogi et Sato, 1989). L'injection intrapéritonéale de B(a)P a donné une DL50 de 232 mg/kg p.c. chez la souris (Salamone, 1981). Chez le rat, l'injection sous-cutanée a mené à l'établissement d'une DL50 de 50 mg/kg p.c. (RTECS, 1994).

Des données expérimentales ont démontré que le B(a)P traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et induit une toxicité neuro-comportementale aigue suite à l'induction d'un stress oxydatif (Deng et *al.*, 2018). D'autre étude également montré un potentiel neurotoxique, une toxicité hématologique, rénale et hépatique en utilisant de très fortes doses de B(a)P chez le rat (Barbeau, 2013).

Chez l'homme il n'y a pas d'étude publiée de toxicité aiguë ou sub-aiguë du B(a)P qui ait été réalisée sur des individus. Aucune voie d'exposition ni n'a été étudiés ni documentés.

1.4.2. Toxicité chronique

Chez l'animal certaines expérimentations montrent une augmentation du poids du foie chez les rats mâles et femelles ayant reçu une dose du B(a)P de 30 mg/kg p.c. par jour par gavage ainsi que chez les rats mâles ayant reçu une dose de 10 mg/kg p.c. par gavage (5 jours/semaine pendant 90 jours) (Kroese et *al.*, 2001).

L'exposition des rats Wistar mâles et femelles (52 de chaque sexe par dose) à du B(a)P administré par gavage en doses de 0, 3, 10 ou 30 mg/kg par jour, 5 jours/semaine pendant 104 semaines a causé des tumeurs du foie chez les mâles et les femelles traités aux deux plus fortes doses (Wester et *al.*, 2012).

Chez l'homme, Il est à noter que la plupart des études semblaient indiquer l'existence d'une association positive entre l'exposition au B(a)P par ingestion ou par inhalation et le cancer chez les humains. L'exposition par voie alimentaire a été associée avec des cancers et des adénomes colorectaux (Ferrucci et *al.*, 2012), des cancers du pancréas (Li et *al.*, 2007) et des cancers du poumon (Tram et *al.*, 2009). Des études ont aussi associé l'inhalation de B(a)P à divers effets cancérigènes. On signale que, chez les fumeurs le B(a)P est l'un des principaux agents cancérigènes de la fumée de cigarette qui joue un rôle majeur dans l'induction de la cancérogenèse pulmonaire (Deng et *al.*, 2018).

1.5. Cancérogénicité du B(a)P

On a constaté que toutes les voies d'exposition causaient des effets cancérogènes localisés et systémiques : tumeurs du tube digestif, du foie, des voies respiratoires, de la peau et des glandes mammaires. Le B(a)P joue un rôle majeur dans l'induction de la cancérogenèse pulmonaire (Kasala et al., 2015 ; Deng et al., 2018). Il est classé comme cancérogène du (groupe 1) reconnu pour l'être humain selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) (IARC, 2010). L'activation métabolique du B(a)P en espèces électrophiles formant des adduits avec l'ADN est considérée comme l'événement crucial de la cancérogenèse pulmonaire, l'ADN nucléaire et mitochondrial, est donc une cible majeure. Les trois voies de conversion du B(a)P forment des métabolites réactives vis-à-vis l'ADN (Abdin et al., 2012).

Le B(a)P a un impact sur les trois stades de la cancérogenèse : initiation, promotion et la progression (Figure 4) (Kasala et al., 2015). Le métabolisme oxydatif du B(a)P génère des intermédiaires réactifs capables d'entraîner des altérations de l'ADN participant ainsi à l'initiation de la cancérogénès. L'étape de promotion est liée à l'activation par un promoteur de la multiplication cellulaire avec la transmission de la lésion de l'ADN. Le B(a)P est également capable d'agir comme promoteur. Dans des lignées épithéliales hépatiques, le B(a)P est capable de favoriser la prolifération cellulaire par l'augmentation d'expression de la cycline A et hyperphosphorylation de la protéine Rb (Coullin, 2013). La phase de progression est favorisée par une instabilité génique menant à l'apparition de nouvelles mutations et à l'augmentation des divisions cellulaires. Cette phase se caractérise par la formation de métastases et une angiogenèse accrue. Il a été montré que le B(a)P favorise la migration cellulaire suite à sa fixation au récepteur aux hydrocarbures (RAh), qui augmente la transcription de métalloprotéinases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire ce qui favorise la migration des cellules (Coullin, 2013).

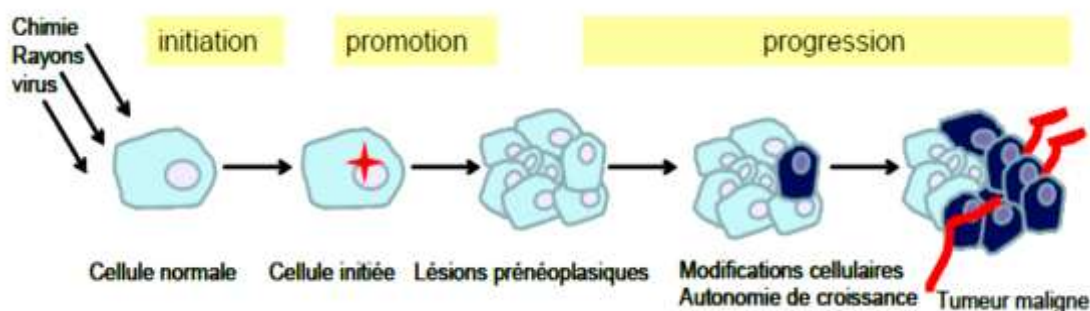


Figure 4. Processus multi-étape du développement d'un cancer (Coullin, 2013).

Chapitre 2. Toxicité hépatique du B(a)P

Le B(a)P était un agent toxique pour le foie (Deng et *al.*, 2018). Il est démontré que le B(a)P peut agir par divers mécanismes, un premier mécanisme est la formation de métabolites réactifs par l'intermédiaire de la biotransformation du B(a)P par un (ou plusieurs) cytochrome(s) qui conduit à la formation d'adduits à l'ADN, modification de la méthylation et d'acétylation d'histones, dérégulation du cycle cellulaire et induction d'un stress oxydatif. Caractérisé par une peroxydation des lipides et des altérations de la perméabilité des membranes mitochondriales responsable du déclenchement de la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Yuan et *al.*, 2017).

2.1. Rappel sur le foie

Le foie (grec, *hepar*) est une volumineuse glande rouge-brun, à la surface lisse, friable et fragile, pesant environ 1,5 Kg. Il est situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, juste sous la cage thoracique et le diaphragme et fait partie de l'appareil digestif (Figure 5) (Racolt et Federspiel, 2008).

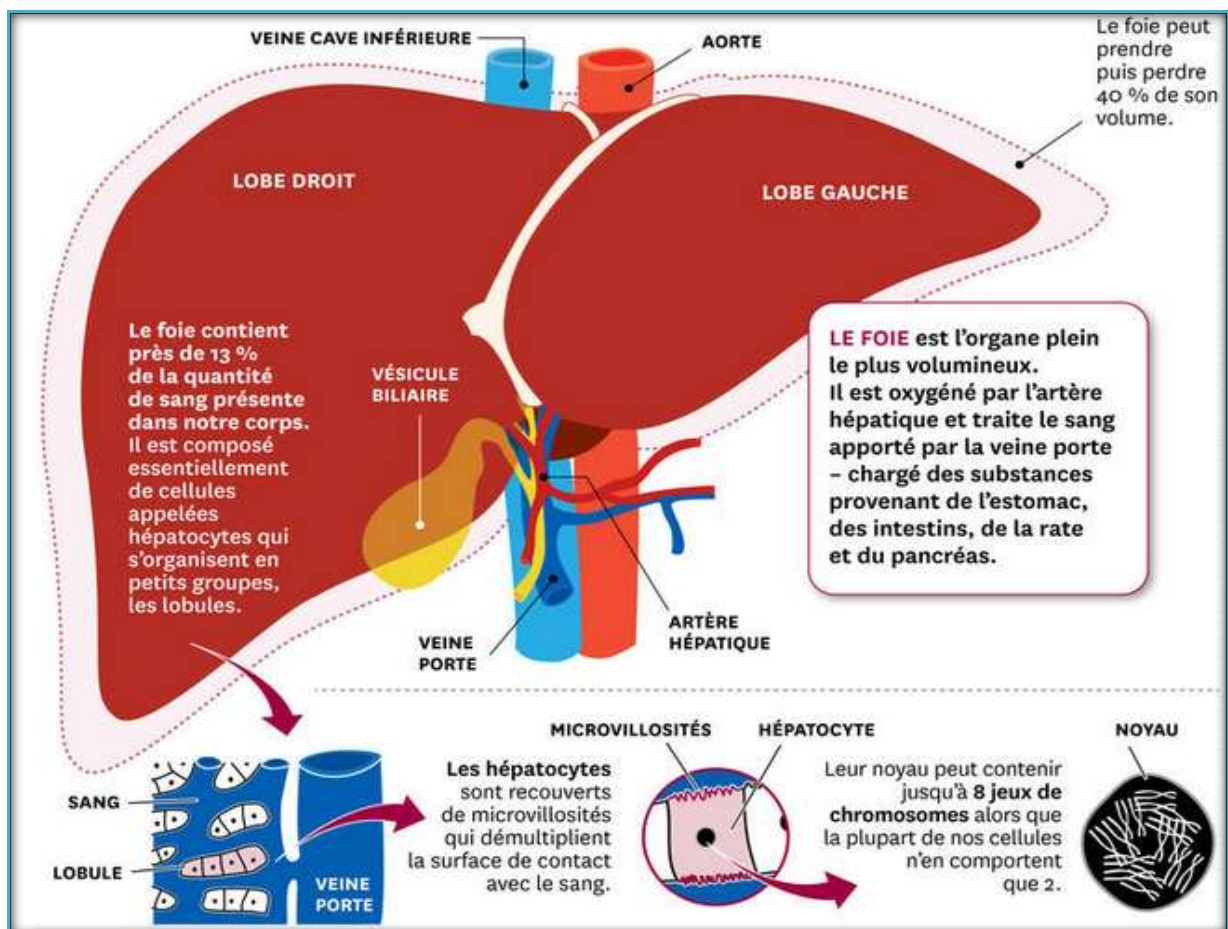


Figure 5. Anatomie du Foie.

(Source : <https://www.courrierinternational.com/article/physiologie-le-foie-cet-organe-tout-faire>).

Le foie est divisé en trois lobes : les lobes droits et gauche et le lobe de Spiegel à la face inférieure du foie. Les lobes droit et gauche sont subdivisés en segments et suivant les ramifications de la veine porte. Chaque segment est composé de nombreuses petites unités fonctionnelles : les lobes hépatiques, limités par des travées de tissu conjonctif s'élargissant au point de jonction pour former les espaces interlobulaires ou espaces portes. Un lobule hépatique est composé de cellule hépatiques (hépatocytes) agencées en travées convergeant vers le centre où se trouve la veine centro-lobulaire. Les espaces délimités par les hépatocytes s'appellent les sinusoides (Racolt et Federspiel, 2008).

Cet organe joue un rôle primordial dans le métabolisme des protéines, des acides aminés, des glucides et lipides (Bottcher et *al.*, 2011). Il assure également la fonction de détoxification des substances chimiques exogènes et endogènes, en les dégradant en produits non-toxiques *via* les réactions de phase I, II et III (Yamazaki et *al.*, 1996 ; Crettol et *al.*, 2010 ; Moronpot et *al.*, 2012). Les produits liposolubles sont ensuite reversés dans la bile, puis dans l'intestin, et éliminés dans les selles. Les produits hydrosolubles sont reversés dans le sang, qui les mène jusqu'aux reins : ils sont éliminés par les urines. Le foie joue un rôle important dans la digestion et la transformation des aliments et les lipides en synthétisant la bile contenant des sels et des acides biliaires. De plus d'emmagasiner le glycogène, et certaines vitamines (A, B12, D, E) et minéraux (fer et cuivre) (Ozougwu, 2017).

2.2. Mécanismes d'induction du stress oxydant hépatique par le B(a)P

Le métabolisme du B(a)P par les dihydrodiol déshydrogénases entraîne la formation de divers intermédiaires générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui provoquent un stress oxydatif responsable de son hépatotoxicité (Rangi et *al.*, 2018).

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre oxydants et antioxydants. Ce qui entraîne une augmentation globale des niveaux cellulaires d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Rahal et *al.*, 2014). Les radicaux libres de l'oxygène (Tableau 2) ou, plus généralement, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) peuvent être définis comme des molécules ou des fragments moléculaires contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans des orbitales atomiques ou moléculaires, les principaux ERO sont représentés dans le tableau 2 (Valko et *al.*, 2007). La production d'ERO peut être soit d'origine exogènes tels que : l'alcool, les polluants, tabac, rayons X, médicament ou de source endogène tel que : cytochrome hépatique P-450 (Vuppalanchi et *al.*, 2011 ; Migdal et Serres, 2011).

Tableau 2. Les principales espèces réactives de l'Oxygène (Migdal et Serres, 2011)

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

2.2.1. Production de ROS par le B(a)P

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont générées lors du cycle redox des quinones, mais les CYP1A1 peuvent également en produire, au cours de leur activité catalytique (Baulig 2003, Morel 1999).

La première oxydation du B(a)P-*o*-quinone (B(a)P-7,8-dione (BPQ), résultant de la voie des quinones, produit un anion semi-quinone (SQ) et de l' H_2O_2 suivi par une deuxième oxydation qui conduit à la formation de BPQ et d' $O_2^{\cdot-}$. En présence d'équivalents réducteurs cellulaires (ex : NADPH), l'*o*-quinone peut aussi être réduite en catéchols entraînant des cycles redox supplémentaires qui amplifient la production d'ERO : H_2O_2 et $O_2^{\cdot-}$. En présence de métaux redox tels que Fe^{2+} ou Cu^+ , H_2O_2 peut donner OH^{\cdot} par une réaction appelée réaction de Fenton (Figure 6) (Rangi et al., 2018).

Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent directement ou indirectement endommager les biomolécules majeures qui sont mises en évidence par des niveaux élevés des protéines carbonyles PCC et les peroxydes lipidiques (LPO). En outre, des niveaux élevés de ROS peuvent modifier diverses cascades de signalisation et l'activité des protéines kinases qui seraient affecté la différenciation normale et la croissance des cellules. Le stress oxydatif induit par le B(a)P par le biais des ROS est l'étape clé toutes ses effets toxiques (Rangi et al., 2018).

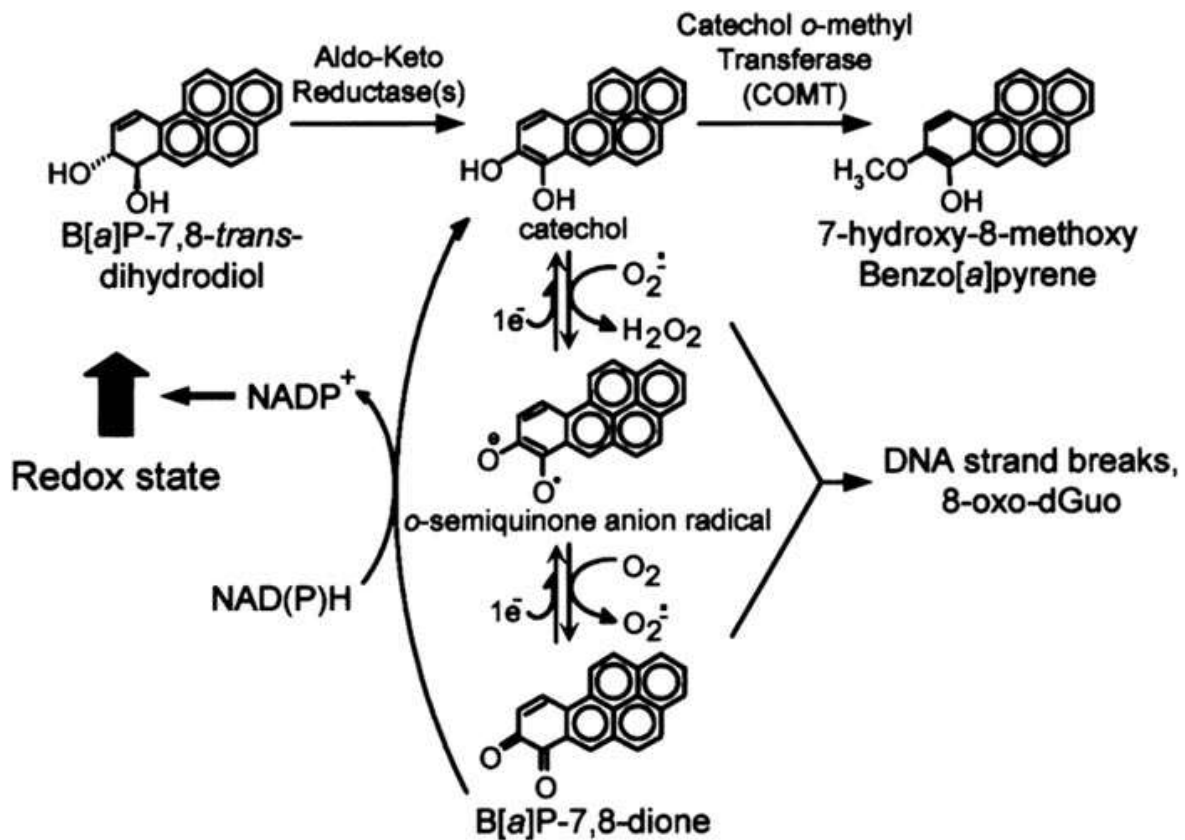


Figure 6. Production de ROS lors de la voie des quinones (Zhang et al., 2012).

2.2.2. Dommages oxydatifs de l'ADN nucléaire et mitochondriale

Les ERO produits suite à la métabolisation du B(a)P entraînent des cassures simple brins, doubles brins ainsi que des modifications au niveau des purines ou pyrimidines ou du désoxyribose (Klaunig et Kamendulis, 2004). Parmi ces ERO, le radical hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) 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. Les dommages de l'ADN associés au B(a)P proviennent également de la formation d'adduits stables du BPDE au niveau des groupes aminoexocycliques des purines. Ces adduits stables du BPDE restent fixés à l'ADN à moins d'être pris en charge par les systèmes de réparation (Tarantini, 2009).

2.2.3. Dommages oxydatifs aux lipides : la peroxydation lipidique

Les acides gras polyinsaturés sont des cibles majeures d'une attaque radicalaire. Une autre cible importante est le cholestérol non estérifié qui, lors d'une oxydation, conduit à la formation des oxystérols. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, les radicaux hydroxyles et hydroperoxydes sont les plus réactifs vis-à-vis des acides gras polyinsaturés (Therond, 2006).

La peroxydation lipidique est une réaction en chaîne (tableau 3) initiée par un radical qui conduit à la formation d'hydroperoxydes qui vont se dégrader en aldéhydes et altérer la membrane cellulaire pouvant entraîner une perte d'intégrité de la cellule et de ses organites (Valko et al. 2006). Parmi les produits finaux formés, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) ont un potentiel mutagène et cancérigène (Poisson, 2014).

Une augmentation de la peroxydation lipidique est observée sous l'effet du B(a)P et de ses métabolites. Le MDA peut réagir avec les bases G, A, et C de l'ADN et former des adduits qui conduisent à des lésions mutagènes (Valko et al., 2006).

Tableau 3. Réactions de peroxydation lipidique (Poisson,2014).

Phase d'oxydation lipidique	Réaction(s) chimique(s)
Initiation	$RH + HO\cdot \longrightarrow R\cdot + H_2O$
Propagation	$R\cdot + O_2 \longrightarrow ROO\cdot$ $ROO\cdot + RH \longrightarrow ROOH + R\cdot$
Terminaison	$R\cdot + R\cdot \longrightarrow RR$ $ROO\cdot + R\cdot \longrightarrow ROR$ $ROO\cdot + ROO\cdot \longrightarrow ROOR + O_2$

2.2.4. Dommages oxydatifs aux protéines

Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Haleng et al., 2007).

Le B(a) P et ses métabolites comme 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).

2.2.5. Effets sur les systèmes de défense antioxydants

Les antioxydants sont des substances ou molécules capables d'inhiber la production, limitée la propagation ou destruction d'ERO. Ils peuvent agir en réduisant ou en dismutant l'espèce ou en la piégeant pour former un composé stable (Favier, 2003). Les antioxydants existent dans les

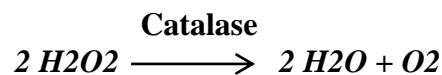
cellules vivantes sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques pour empêcher les dégâts oxydatifs des membranes biologiques (Pieme et *al.*, 2017).

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GSH-Px) (Sharma et *al.*, 2012).

- i. *La superoxyde dismutase (SOD)* est une des plus importantes enzymes qui catalyse la conversion d'anions superoxydes en dioxygène et en peroxyde d'hydrogène (Belge, 2016).



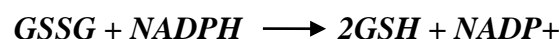
- ii. *La catalase* est considérée comme une enzyme peroxisomale (Castaldo et *al.*, 2016), qui catalyse la dismutation d'eau oxygénée en eau et oxygène (généralement produit par la SOD).



- iii. *La glutathion peroxydase (GPX)* est présente dans le cytoplasme où elle catalyse la réduction des hydro-peroxydes (H₂O₂) et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Omodanisi et *al.*, 2017).



- iv. *Le glutathion réductase (GR)* est une oxydoréductase associée au NADPH (nicotinamide adénine dinucléotidephosphate), qui catalyse la conversion du glutathion oxydé (GSSG) à glutathion réduit (GSH) (Csiszár et *al.*, 2016).



Les systèmes antioxydants non enzymatiques peuvent être d'origine exogènes ou endogènes. Ces derniers sont représentés essentiellement par le glutathion qui est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de la glycine : (γ-L-Glutamyl-L-cystéinyglycine). On le représente de manière simplifiée par GSH ou GSSG. Il peut réagir chimiquement avec O₂•-, •OH, H₂O₂ et donc peut fonctionner directement comme un boueur de radicaux libres (Sharma et *al.*, 2012).

Les antioxydants d'origines exogènes sont représentés par les vitamines E (α-tocophérol) et C (acide ascorbique) (Evans, 2000), les caroténoïdes, les oligoéléments comme le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) et les polyphénols. Ces derniers

présentent une activité anti-oxydante et fournissent ainsi aux cellules de notre organisme une protection contre les agressions oxydatives. Les flavonoïdes constituent le principal groupe de polyphénols qui protègent contre des dégâts oxydatifs par: piégeage direct des ROS, activation des enzymes antioxydants, chélation des ions métalliques, inhibition des oxydases (Kumar et *al.*, 2013).

L'exposition au B(a)P diminue le statut antioxydant enzymatique et non enzymatique (GPx, SOD, CAT et glutathion) induisant ainsi un état de stress oxydant hépatique intense (Sinha, 2018).

2.3. Induction de la mort cellulaire par le B(a)P

2.3.1. La mort cellulaire par nécrose

Dans les cellules épithéliales hépatiques, le B(a)P à des concentrations allant de 8 à 64 μM , induit une mort cellulaire par nécrose suivie d'une mort par apoptose (Jiang et *al.*, 2011). Cette mort par nécrose est due à la production d'espèces réactives de l'oxygène et à une peroxydation lipidique. La mort cellulaire par nécrose se traduit par un gonflement de la cellule et des organites et une rupture de la membrane plasmique, libérant le contenu intracellulaire (Coullin, 2013).

2.3.2. La mort cellulaire par apoptose

Au niveau du foie, le principal type de la mort mis en évidence sous l'effet du B(a)P est la mort cellulaire par apoptose, suivant la voie intrinsèque. Les ERO produites par le métabolisme du B(a)P participent activement aux différents mécanismes d'induction de cette voie apoptotique. Les altérations de l'ADN induites par le B(a)P entraînent la phosphorylation et/ou l'acétylation de p53 qui induit un arrêt du cycle cellulaire ou active de nombreux gènes de l'apoptose comme les gènes pro-apoptotiques responsable de l'induction de l'apoptose (Coullin, 2013).

Chapitre 3. La propolis

3.1. Définition et étymologie de la propolis

La propolis également appelée colle d'abeille et dans certaines références en russe la pénicilline (Ahangari et *al.*, 2018), est un produit issu des ruches d'abeilles d'espèce *Apis mellifera L.* Elle contient principalement la cire d'abeille et une résine obtenue de diverses sources végétales avec ajout de cire et d'enzymes salivaires favorisant l'hydroxylation des composés phénoliques, améliorant ainsi leurs activités pharmacologiques. Couleur, odeur et texture varient selon les types de propolis et les sources végétales (Salatino et Salatino, 2018 ; Santos *et al.*, 2019).

Son étymologie vient des mots greque « pro » signifiant (« devant », « pour défendre ») et « polis » signifiant (« communauté ou cité ») (Ghedira et *al.*, 2009 ; Santos et *al.*, 2019). Une autre étymologie latine « propolire » qui signifié « enduire ». En effet, l'abeille utilise la résine pour se protéger contre les envahisseurs et les micro-organismes pathogènes (bactéries, parasites et virus), sceller des trous dans les alvéoles des abeilles, boucher les ouvertures, lisser les parois internes et désinfecter la ruche (Castaldo et Capasso, 2002 ; De Mendonça et *al.*, 2015 ; Santos et *al.*, 2019).

3.2. Origine de la propolis

La propolis a deux origines :

Origine externe : les principales essences d'arbres, connues pour être productrices de propolis sont représentés par différents conifères : pin, spin, épicéa ; plusieurs espèces de peuplier (qui semble l'espèce la plus importante) ; l'aulne ; le saule ; le marronnier d'inde ; le bouleau ; le prenier ; le frêne ; le chêne ; et l'orme (Ghedira et *al.*, 2009 ; Joanna et *al.*, 2018).

Origine interne : d'après les chercheurs Allemands la propolis serait un résidu résineux provenant de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe situé entre le jabot et l'intestin moyen (Hegazi, 1997).

3.3. Les propriétés physico-chimiques de la propolis

3.3.1. Propriétés physiques

La propolis est une substance naturelle de consistance variable suivant la température : à 15°C elle est dure et friable, à 30°C elle est molle et malléable, entre 30 et 60°C, elle devient collante ou gluante, jusqu'à fondre en moyenne vers 60-70°C ou plus. Sa couleur est très variable suivant sa provenance, elle peut être jaune clair au brune très foncé presque noire en passant par toute la

gamme de bruns, marron, rouge. Elle est souvent âcre et parfois amère. L'arôme ou l'odeur de la propolis varie selon son origine botanique : en générale arôme agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autres produits (cannelle, vanille, etc.). Lorsqu'on la brûle, elle dégage une odeur très délicate et très recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient (El Housseini, 2013 ; Papachristoforou *et al.*, 2019).

3.3.2. Propriétés chimiques

La propolis est insoluble dans l'eau à froid. Elle est, en revanche, partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme, etc. Il importe de noter que la propolis est beaucoup plus soluble dans une solution de soude caustique à 2%. Son point de fusion se situe autour de 70°C et sa densité est de 1,2 (soit supérieure à celle de l'eau) (El Housseini, 2013 ; Wang *et al.*, 2016).

3.4. Composition chimique de la propolis

La composition de la propolis est complexe et varie en fonction des conditions phytogéographiques, des caractéristiques climatiques, de la saison de collection et des espèces d'abeilles (Bouaroura *et al.*, 2019). De manière générale, elle est composée de (45--55%) de résines, 30% de cires, 10% d'huiles essentielles, (5%-10%) de pollen et 5% d'autres composés chimiques, notamment les acides aminés, les sucres, certains minéraux tels que Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn et Fe, certaines vitamines comme B1, B2, B6, C et E, ainsi que des composés aromatiques (Tableau 4) (Lotfy, 2006 ; Ahangari *et al.*, 2018 ; Santos *et al.*, 2019).

Tableau 4. Composition de la propolis brute (El-housseini, 2013).

Composition en ordre	Composition par groupes	Quantité
Résines et baumes	Flavonoïdes, acides phénoliques + ester	45-55 %
Cire et acides gras	La cire d'abeille et des plantes	25-35 %
Huiles essentielles	Anéthol et eugénol +++	10 %
Pollen	Protéines (6 acides aminées libres > 1 %) Arginine et proline jusqu'à 45 % du total	5 %
Autre composés organique et substances minérales diverses	Cétones, lactones, quinones, stéroïdes, acides benzoïque, vitamines A/B, sucres, 14 traces de minéraux, silice et zinc sont les plus connus.	5 %

Les principaux groupes chimiques présents dans la propolis sont les acides phénoliques et leurs esters, les flavonoïdes, les terpènes, les aldéhydes aromatiques et les alcools, les acides gras, les

stilbènes et les β -stéroïdes. Les molécules citées entrant dans la composition des différentes propolis sont indiquées sur la figure 7 (Zabaiou et al., 2017).

Les flavonoïdes sont les composés de la propolis responsables des principaux effets pharmacologiques. Parmi eux, on peut citer les flavones (lutéoline), les flavonols (quercétine et dérivés), les flavanones (pinocembrine et dérivés et naringénine), les flavanonols (garbanzol et alnustinol), les chalcones et dihydrochalcones, les isoflavones (calycosine), les isodihydroflavones (daidzéine), les isoflavanes (vestitol et dérivés) et les néoflavonoïdes (médicarpine) (Bankova, 2005).

Les terpenoïdes représentent 10 % et sont responsables de l'odeur de la propolis étant donné qu'ils sont des composés volatils, mais contribuent aussi aux propriétés biologiques de la propolis (Zabaiou et al., 2017).

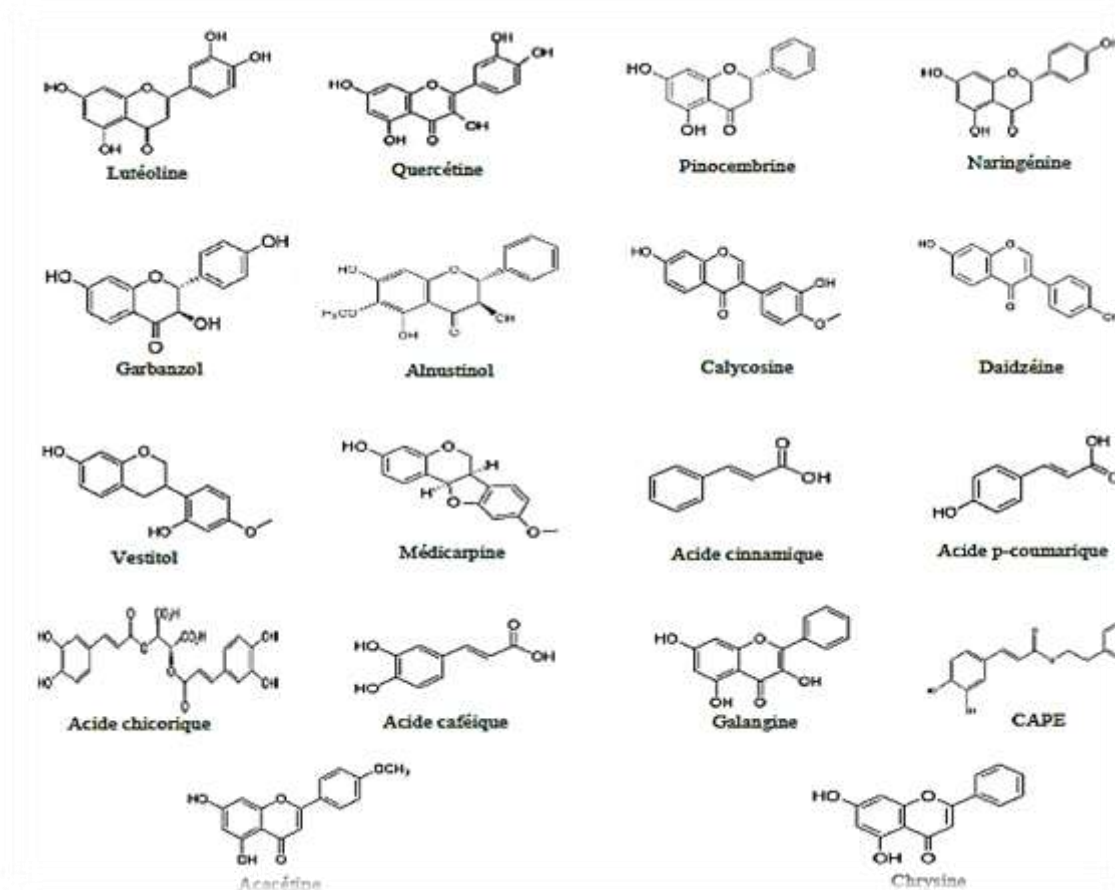


Figure 7. Structure chimique des molécules citées entrant dans la composition des différentes propolis (Zabaiou et al., 2017).

3.5. Propriétés biologiques et pharmacologiques de la propolis

Au cours des dernières décennies, plusieurs études ont démontré les actions biologiques et pharmacologiques de différents échantillons de propolis dans le monde. Les sections suivantes

résumé les informations publiées récemment sur les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques, antivirales, immunomodulatrices, les activités anticancéreuses, et hépato-protectrices, révélant ainsi l'intérêt des chercheurs pour ce produit apicole et son potentiel pour le développement de nouveaux médicaments (Silva *et al.*, 2015).

3.5.1. Activité anti-oxydante

La capacité à diminuer ou à empêcher les réactions d'oxydation reflète l'activité antioxydante d'un composé ou d'un extrait. De nombreux travaux ont montré que l'activité antioxydante de la propolis était positivement corrélée avec sa teneur en polyphénols (Gregoris et Stevanato, 2010 ; Bonvéhi, 2011). Rejane Pina *et al.* (2017) avaient montré qu'il existait une corrélation positive entre l'activité anti-radicalaire et les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes. Plusieurs études ont montré l'effet antioxydant de la propolis de Jijel (Lahouel *et al.*, 2004 ; Kebsa *et al.*, 2007 ; Rouibah *et al.*, 2008).

Les dérivés de l'acide caféoylquinique et l'acide caféique phényl ester (CAPE) présentent un effet anti-radicalaire plus élevé que celui de la vitamine C et de la vitamine E et exercent des effets protecteurs contre la peroxydation lipidique des membranes. La forte activité antioxydante de la propolis suggère qu'elle pourrait être utilisée dans la prévention des maladies chroniques causées par le stress oxydatif (Vincenzo, 2017), et des effets toxiques des anticancéreux (Lahouel *et al.*, 2007 ; Kebsa *et al.*, 2014).

En général, selon les données de la littérature, la teneur en composés phénoliques totaux des extraits de propolis allait de 30 à 200 mg d'équivalent acide gallique (GAE)/g de poids sec, et la teneur en flavonoïdes d'environ 30 à 70 mg d'équivalent de quercétine (QE)/g, alors que l'activité de piégeage des radicaux libres du DPPH variait entre 20 à 190 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en terme d'IC₅₀ (Piccinelli, 2013 ; Joanna *et al.* 2018).

3.5.2. Activité anti-inflammatoire

La propolis possède un effet anti-inflammatoire significatif sur différents modèles *in vivo* d'arthrite, d'œdème de la patte ou d'inflammation chronique ou aiguë (Ramos et Miranda, 2007). Certains composants extraits de la propolis, tels que les flavonoïdes et les acides phénoliques ont un pouvoir anti-inflammatoire très puissant (Mehaisen *et al.*, 2017). A travers l'inhibition : du facteur nucléaire- κB (NF- κB), de la synthèse des prostaglandines et de la libération de l'oxyde nitrique (Noushin et Alireza, 2017). En outre, une étude a montré que le CAPE inhibe la libération de cytokines inflammatoires et augmente la production des

cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-10 et l'IL-4 et diminue l'infiltration de cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles et les monocytes (Vincenzo, 2017).

3.5.3. Activité anti-cancéreuse et cytotoxique

La propolis présente un effet cytotoxique et antiprolifératif poussé contre toute une gamme de types cellulaires cancéreuses *in vitro* (sang, peau, côlon, sein, poumon, foie, rein, prostate, cerveau) (Watanabe *et al.*, 2011 ; Rejane *et al.*, 2017).

La galangine, l'un des flavonoïdes les plus abondants dans la propolis, a réduit de manière significative le nombre de cellules de mélanome *in vitro* par induction de l'autophagie ou de l'apoptose selon la concentration. L'EEP réduisait la progression/dissémination des tumeurs de mélanome et pouvait prolonger la durée de vie des souris lorsqu'elles étaient utilisées comme traitement thérapeutique (Benguedouar *et al.*, 2016). Plusieurs études ont été publiées concernant l'effet anticancéreux et antiprolifératif de la propolis de Jijel (Zabaiyou *et al.*, 2017 ; kebsa *et al.*, 2018 ; Rouibah *et al.*, 2018).

3.5.4. Autres activités

Les toutes premières données publiées sur l'activité antibactérienne de l'extrait de propolis remontent à 1980 et montrent que la sensibilité de *Streptococcus* à l'extrait de propolis a été rapportée. Plus tard, l'efficacité de l'extrait alcoolique de propolis a été remarquée contre une souche de *Bacillus* et une activité d'inhibition de la croissance (à 3 mg / ml) a été enregistrée contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Noushin et Alireza, 2017).

Les résultats de Rejane *et al.* sont en accord avec les données publiées indiquant une activité antimicrobienne élevée de la propolis contre les bactéries à Gram positif et une faible activité antimicrobienne de la propolis contre des bactéries à Gram négatif parce que la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est chimiquement plus complexe (Rejane *et al.*, 2017).

La propolis affecte les virus de la grippe (types A et B). La numération virale d'herpès a été considérablement réduite par l'utilisation de propolis (30 µg/mL) ; complexes, et il a également été signalé que la propolis pouvait affecter les récepteurs cellulaires lors de l'étape d'adsorption virale.

L'activité antifongique de la propolis a été testée sur les espèces de *Trichophyton* et *Mycrosporium*, avec une solution de propylène glycol, et a présenté une activité antifongique augmentée de manière synergique. Le même résultat a été obtenu en utilisant la propolis avec

d'autres antifongiques sur *Candida albicans* selon Fernandes Junior et al (Noushin et Alireza, 2017). La propolis peut affecter l'immunité intrinsèque en activant la réponse immunitaire en augmentant la production de cytokines (Noushin et Alireza, 2017).

3.6. Toxicité de la propolis

La dose létale 50 (DL50) de la propolis se situerait autour de 2000 mg/kg. Plus tard, il a été rapporté que la DL50 était d'environ 700 mg/kg pour l'extrait éthanolique de la propolis, alors qu'elle était de 350 mg/kg pour l'extrait éther de propolis. L'administration orale de 200 à 1220 mg/kg/j de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) pendant 7-10 jours, n'a entraîné aucun effet nocif (Higashi et De Castro, (1995). De plus, l'extrait éthanolique de la propolis incorporée 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 éthanolique de la propolis de Jijel à 100mg/kg/j pendant 60 jours 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'organisme.

Il a été démontré que différents types de propolis peuvent produire différents degrés d'allergie de contact. L'allergie à la propolis a été considérée comme présentant des niveaux élevés de sensibilisation chez les enfants. Lors d'une expérience approfondie sur la propolis, il a été recommandé d'utiliser des avertissements de patch lors de l'utilisation de la propolis à des fins dermatologiques pour les jeunes enfants (Noushin et Alireza, 2017).

Matériel et méthode

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de toxicologie moléculaire, département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Mohammed Seddik Ben Yahia de Jijel. Il a été consacré à l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique de la propolis contre la toxicité aigüe du B(a)P *in vivo*.

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

1.1. Récolte de la propolis

La propolis a été récoltée pendant la période du printemps 2019, par des apicultures de la région de (*chekfa*)-Jijel-. La récolte a été effectuée par grattage et raclage des cadres et des parois de la ruche. Avant utilisation, la propolis a été maintenue à température ambiante et à l'obscurité pour garder intact ses constituants.

1.2. Préparation de l'extrait éthanolique de la propolis

L'extraction des polyphénols de la propolis a été réalisée selon le protocole décrit par Lahouel *et al.*, (2010). La propolis a été coupée en petits morceaux et lavé deux fois dans l'éthanol 96% pendant 2 heures, à température ambiante pour éliminer les résidus insolubles, y compris les résidus végétaux et les insectes qui ont été ensuite séparés par filtration. Elle est ensuite soumise à une extraction par macération dans l'éthanol 96% (20g de la 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, le filtrat est évaporé à sec en utilisant un évaporateur rotatif (évaporateur E100, Heidolph) à 45°C. Après évaporation, le résidu obtenu est appelé extrait éthanolique de la propolis (EEP).

1.3. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé par la méthode Singleton et Rossi, (1965) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. L'interaction entre le Folin-Ciocalteu qui est un acide de couleur jaune et les résidus phénoliques conduit à la formation d'un complexe coloré en bleu dont l'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des polyphénols dans l'extrait. Pour réaliser ce dosage, 250 µl de l'extrait dilué en 1/100^{ème} sont additionnés à 1 ml d'eau distillée et 250 µl du réactif de Folin-Ciocalteu (5%). Après 5 mn de repos, 1 ml de Na₂CO₃ (7.5%) ont été ajouté, le mélange est ensuite incubé pendant 60mn à 90 mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin la densité optique (DO) est lue à 760nm à l'aide d'un spectrophotomètre *JASCO*.

La teneur en composés phénoliques dans l'extrait est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique aux concentrations allant de 0 à 200 µg/ml (Annexe

1). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de propolis. Tous les dosages ont été réalisés 3 fois.

1.4. Dosage des flavonoïdes totaux

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

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

1.5. Etude des propriétés anti-radicalaires par le test au DPPH° (2.2. Diphenylpicrylhydrazyl)

L'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis a été évaluée *in vitro*, par le test du DPPH° (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) comme décrite par Ancerewicz et *al.*, (1998). Le DPPH° est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH° est réduit (Figure 8) et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH°, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'extrait.

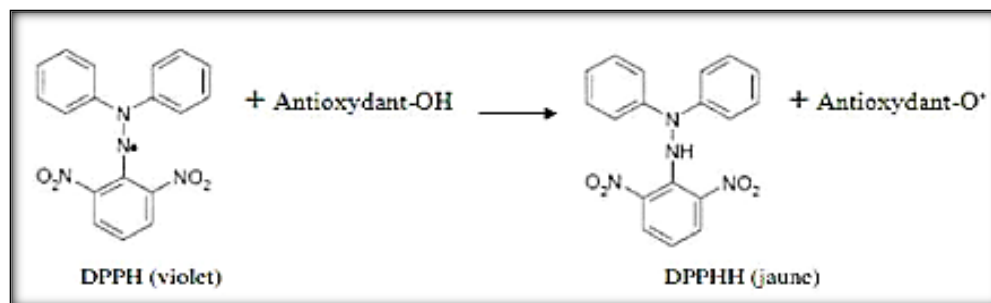


Figure 8. Réaction de test DPPH° (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl) (Ancerewicz et *al.*, 1998).

Pour cela, 15µl de l'extrait éthanolique de la propolis à différentes concentrations (0, 12.5, 25, 50, 100 et 200 µg/ml) est additionné à 1,5 ml de la solution éthanolique de DPPH° (100µM). Après agitation et incubation pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 517nm à l'aide d'un spectrophotomètre (*JASCO*).

Le mélange contenant 15µl d'éthanol et 1,5 ml de DPPH° est considéré comme control négatif. L'acide ascorbique est utilisé comme standard aux mêmes concentrations utilisées pour la propolis. Tous les dosages ont été réalisés 3 fois.

L'activité anti-radicalaire est exprimée en pourcentage de réduction de DPPH°, en utilisant la formule suivante :

$$I (\%) = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

Avec : **I** : pourcentage de réduction du DPPH°. **AB** : Absorbance du control négatif.

AA : absorbance de l'échantillon.

L'activité anti-radicalaire a été exprimée également sous forme d'IC50 (µg/ml) ; la concentration nécessaire pour induire une réduction de 50% du radical DPPH°.

1.6. Mesure du pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène (H2O2)

Le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H2O2) a été déterminé par la méthode Ruch et *al.*, (1989). Pour ce dosage, 0.75 ml de l'H2O2 (10 mM) préparé dans le tampon phosphate (0.1M, pH=7,4) sont ajoutés à 1 ml de l'EEP à différentes concentrations (0, 12.5, 25, 50, 100 et 200 µg/ml). Après incubation 30 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (*JASCO*) et ce contre un blanc préparé dans les mêmes conditions.

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 :

$$H2O2 (\%) = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Avec : **A0** : absorbance du blanc. **A1** : absorbance de H2O2 en présence de l'extrait.

L'activité anti-radicalaire a été exprimée également sous forme d'IC50 (µg/ml) ; la concentration nécessaire pour induire une réduction de 50% du peroxyde d'hydrogène.

2. Etude *in vivo*

2.1. Entretien et traitement des animaux

Les souris utilisées dans ce travail sont des souris males de souche *Swiss albinos*, de poids moyen de 30g, fournis par l'institut Pasteur d'Alger -Algérie-. Les souris sont maintenues dans l'animalerie de l'université Mohammed Seddik Ben Yahia de Jijel dans des conditions standards ; température ambiante de 22 °C, humidité relative de 60% et un cycle de lumière/obscurité de 12/12h.

Les animaux sont placés dans des cages en plastique. Ils ont un accès libre à la nourriture et à l'eau. Pour l'étude *in vivo*, les animaux ont été répartis en 4 lots (3 souris pour lots témoin et B(a)P et 5 souris pour lots EEP et EEP+B(a)P) :

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

Lots 2 (B(a)P) : Les souris 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) (Deng et *al.*, 2018) par voie *intra-péritonéale*. Le B(a)P provient de la société Sigma Aldrich se forme poudre de couleur jaune préparé dans l'huile d'olive.

Lots 3 (Propolis + B(a)P) : Les souris reçoivent 0.2ml de propolis par gavage à la dose de 25mg/kg/j (Zabaiou et *al.*, 2017) 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 reçoivent quotidiennement 0.2 ml d'extrait éthanolique de propolis par voie orale (25mg/kg/j) pendant 5 jours.

2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement du foie

A la fin des délais du traitement ; 48heures après le traitement par le B(a)P, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale sans anesthésie. Ensuite les foies sont soigneusement prélevés, rincés dans une solution de chlorure de sodium (NaCl) 0.9%, puis pesés. Une partie du foie de chaque souris des différents lots est congelée à (-20 °C) pour la réalisation des dosages tissulaires des paramètres de stress oxydatif (MDA, GSH, SOD, CAT,) et l'autre est fixée dans la solution de formol tamponné pour l'étude histologique. 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

Nous avons préparé la fraction cytosolique selon la méthode décrite par Iqbal et *al.*, (2003). Pour cela, 0.5 g du foie ont été 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 nucléaires ; 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

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode est basée sur un dosage colorimétrique détectant le changement de couleur du bleu de Coomassie à 590 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, 2 ml de Bleu de Coomassie a été ajouté à 5 µl de l'échantillon dilués à 1/10^{ème}. Ensuite le mélange a été incubé à température ambiante pendant 15 min et la DO a été lue à 590nm en utilisant un spectrophotomètre de type *JASCO*.

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

2.3.3. Dosage du MDA cytosolique

Le dosage de malondialdéhyde (MDA) a été réalisé selon la méthode décrite par Okhawa et *al.*, (1979). Le principe de ce dosage est le suivant : le MDA réagit avec deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) 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 selon la réaction suivante :

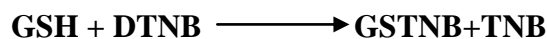


A 0.5ml de l'homogénat nous avons additionné 0.5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 20% et 1 ml de l'acide thiobarbiturique (TBA0.67%). Ensuite le mélange est ensuite chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-Butanol. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 3000 rpm et enfin la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530 nm en utilisant un spectrophotomètre de type *JASCO*.

Le taux du MDA est exprimé en n moles/mg de protéines et elles sont déduites à partir d'une gamme étalon (Annexe 4) préparée dans les mêmes conditions par utilisation d'une solution du tétra-etoxypropane (TEP) qui donne après leur hydrolyse du MDA.

2.3.4. Dosage du glutathion (GSH)

Pour le dosage du GSH, nous avons utilisé la méthode colorimétrique d'Ellman (1959) utilisant le réactif DTNB (acide dithionitrobenzoïque). Le principe de la réaction consiste en l'oxydation du GSH par le DTNB, ce qui libère l'acide thionitrobenzoïque (TNB) lequel à pH alcalin présente une absorbance à 412 nm selon la réaction suivante :



Pour cela 50 μL du TCA (5%) est ajoutés à 50 μl de la fraction cytosolique. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 15 minute à 3000 rpm à 4°C. 20 μL du surnageant sont ensuite diluées dans 5 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH=8). 20 μl du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution, Après 15 min d'incubation nous avons effectués la lecture de la densité optique à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%) et ce en utilisant un spectrophotomètre de type *JASCO*.

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion (Annexe 5) préparée dans les mêmes conditions que le dosage. Les résultats sont exprimés en mg GSH/mg de protéines.

2.4. Evaluation de l'activité des enzymes anti-oxydants

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

La SOD est une enzyme antioxydante très importante dans le maintien d'une basse concentration de l'anion superoxyde. Elle catalyse la dismutation de l'O₂^{-°} en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante :



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

Pour la mesure, on met dans la cuve de mesure : 850 µL du tampon tris HCL (50mM, PH=8.2), 15 µL de la fraction cytosolique, 100µL de l'EDTA (10mM) et ensuite 50µL de pyrogallol (2.5 mM dans HCL 10mM).

La lecture de la DO est effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes en utilisant un spectrophotomètre de type *JASCO*. 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.

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

L'activité de la CAT a été 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 en utilisant un spectrophotomètre de type *JASCO*. L'activité enzymatique est exprimée en UI/mg de protéine selon la relation suivante :

$$\text{Activité CAT (UI/mg de protéine)} = (2,3033/T * \log A1/A2) / [\text{protéines}].$$

Avec: **T** : intervalle du temps en mn. **A1** : La densité optique au temps 0 mn. **A2** : La densité optique au temps 1 mn.

2.5. Étude histologique

Au moment du sacrifice des animaux, un petit fragment de foie de toutes les souris de chaque lot est rincé et immédiatement fixé dans le formol tamponné pour permettre la conservation morphologique des structures tissulaires et cellulaires.

Pour la préparation des coupes histologiques, les Biopsies hépatiques sont préalablement déshydratées par passage 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).

Après la réalisation des blocs, des coupes de 5µm d'épaisseur ont été préparé à l'aide du microtome (*Thermo Scientific*). Les coupes ainsi obtenues sont déposées et collées sur des lames en verre. Les coupes sont ensuite déparaffinées au xylène et réhydratées dans des bains d'alcools de concentration décroissantes. Pour permettre la mise en évidence des différentes structures tissulaires et cellulaires, les coupes obtenues sont colorées à l'hématoxyline/éosine ; technique de coloration usuelle associant un colorant nucléaire hématoxyline et un colorant cytoplasmique éosine. Enfin, l'examen au microscope optique permet la visualisation des changements pathologiques tissulaires du foie.

2.6. Analyse statistique

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous forme de moyenne \pm écartype. 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.
- ($P < 0.05$) : effet significatif *(comparaison avec le témoin) ou # (comparaison avec le lot B(a)P).
- ($P < 0.01$) : effet très significatif ** ou (comparaison avec le témoin) ou ## (comparaison avec le lot B(a)P).
- ($P < 0.001$) : effet très hautement significatif *** ou (comparaison avec le témoin) ou ### (comparaison avec le lot B(a)P).

Résultat et Discussion

Cette étude a pour but d'évaluer l'effet préventif des polyphénols de la propolis de Jijel (*Chekfa*) contre la toxicité hépatique aigüe induite expérimentalement par le benzo(a)pyrène chez la souris et ce *via* l'évaluation de l'état du stress oxydatif cellulaire et la visualisation des altérations tissulaires au niveau du foie.

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

Les résultats de l'étude phytochimique et de l'activité anti-radicalaire de la propolis utilisée dans cette étudesont représentés ci-dessous.

1.1. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de la propolis exprimées en mg EAG/g de propolis et mg EQ/g de propolis respectivement, sont illustrées dans le tableau 5 et la figure 9:

Tableau 5. Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans la propolis.

	Polyphénols	Flavonoïdes
Teneur	575,61±21,45 mg EAG/g de propolis	454,25±2,5 mg EQ/ g de propolis

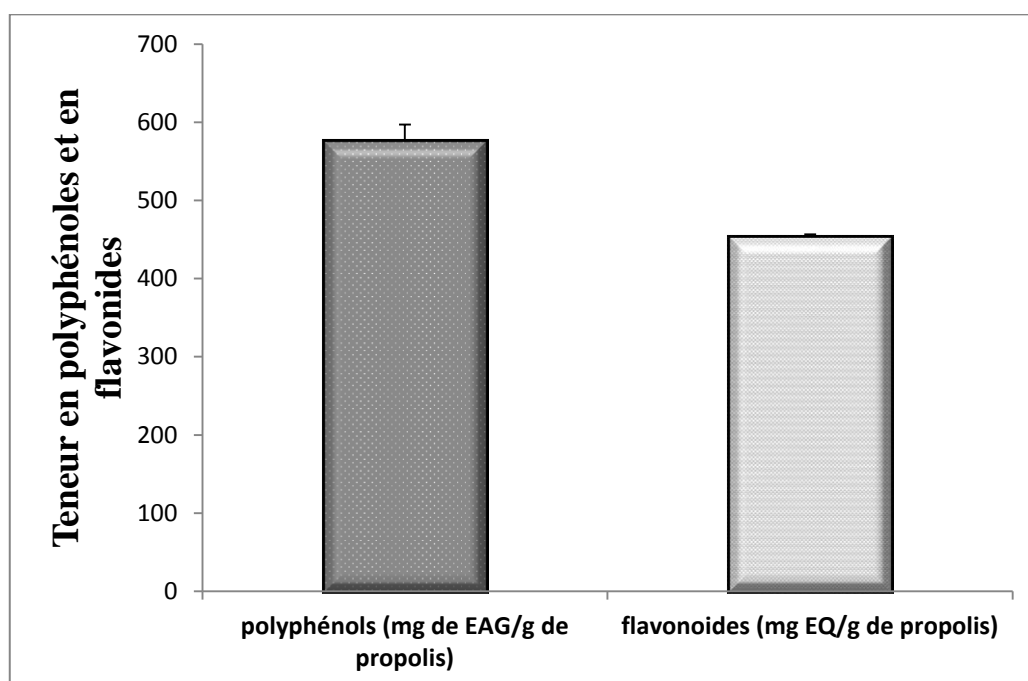


Figure9. Teneur en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait éthanolique de la propolis en mg EAG/g et mg EQ /gde propolis respectivement.

Les résultats obtenus montrent que la propolis utilisée dans ce travail est très riche en polyphénols et en flavonoïdes avec des taux de 575,61±21,45 mg EAG/g de propolis et 454,25±2,5 mg EQ/ g de propolis respectivement.

Comparant nos résultats avec ceux obtenus par Kebsa et *al.*, (2014) réalisés sur un échantillon de lapropolis de *Kaous* (Jijel) avec un taux de (402.25 mg EAG/ g de propolis) en polyphénols et un taux de (320.71 mg ER/ g de propolis) en flavonoïdes, on trouve que notre échantillon est plus riche en composés phénoliques. Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de la propolis de l'île de Samothraki (Grèce) sont plus faibles par rapport à ceux de notre propolis (Papachristoforou et *al.*, 2019).

La composition chimique de la propolis a éveillé l'intérêt de nombreux chercheurs. Plusieurs travaux ont été effectués sur des propolis de différents pays et ont abouti aux conclusions suivantes : les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes dépend essentiellement de l'origine de la propolis, la saison de la récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les conditions de conservation et l'espèce d'abeilles (Bouaroura et *al.*, 2019) et le solvant utilisé dans l'extraction de ces composés, dans notre étude le choix du solvant a été fait en se référant aux travaux précédents réalisés par Kebsa et *al.*, (2007).

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

Les variations de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique de la propolis EEP et de l'acide ascorbique à différentes concentrations contre le radical libre DPPH° sont représentées dans le tableau 6 et la figure 10. Ces résultats sont exprimés en pourcentage de réduction du DPPH°.

Tableau6. Pourcentage de réduction du DPPH° parla propolis et l'acide ascorbique

	12.5 µg/ml	25 µg / 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

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de Student : comparaison faites entre l'EEP et l'acide ascorbique : **P≤0.01 désigne une différence très significative.

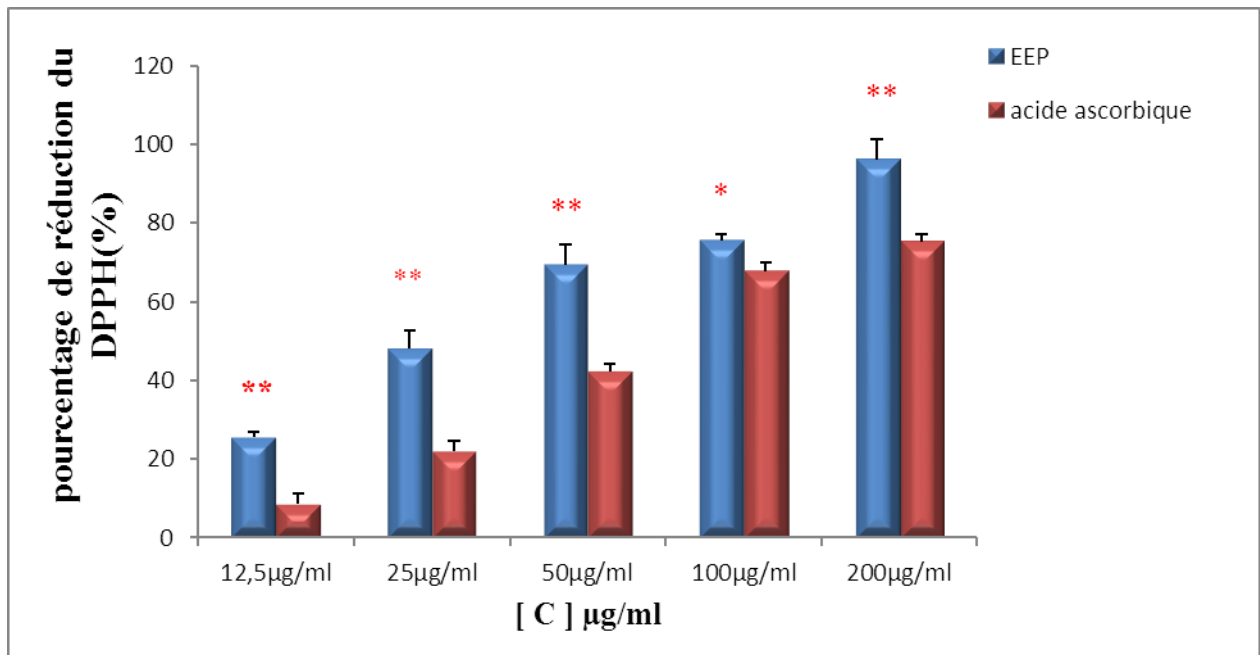


Figure 10. Pourcentage de réduction du radical libre DPPH° par l'EEP, et l'acide ascorbique à différentes concentrations.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : comparaison faites entre l'EEP et l'acide ascorbique : ** $P \leq 0.01$ désigne une différence très significative.

Le pouvoir anti-radicalaire de l'extrait éthanolique de la propolis, et de l'acide ascorbique aux concentrations 12,5 µg/ml, 25 µg/ml 50 µg/ml, 100 µg/ml et 200 µg/ml a été évalué en se basant sur le pourcentage de réduction du radical libre DPPH°.

Les résultats obtenus ont révélé que l'EEP possède une activité anti-radicalaire concentration-dépendante. La propolis a montré un effet mieux que celui obtenu avec l'acide ascorbique. Les IC50 obtenues sont 30,54 µg/ml et 55,95 µg/ml avec l'EEP et l'acide ascorbique respectivement. Le test de *student* montre une augmentation très significative des pourcentages de réduction de l'EEP aux différentes concentrations par rapport à ceux de l'acide ascorbique. A la concentration de 200 µg/ml, l'extrait éthanolique de la propolis a donné l'effet le plus important avec $96.2 \pm 5.01\%$ par rapport à l'acide ascorbique qui présente un pourcentage de réduction de $75.2 \pm 1.8\%$.

Parmi les principaux groupes de composés présents dans la propolis nous retrouvons les polyphénols et les flavonoïdes qui peuvent agir sur l'élimination des radicaux libres (Ahn et al., 2007; Moreira et al., 2008).

Les résultats de Debab et *al.* (2015) suggèrent que la capacité anti-oxydante de la propolis dépend essentiellement de leurs contenus phénoliques. Dans notre étude, la propolis testée possède un teneur élevée en polyphénols et en flavonoïde (EEP : 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. L'effet scavenger des polyphénols de la propolis est du à leur richesse en groupement hydroxyles. Il a également été signalé par Kebsa et *al.* (2014) que les composés phénoliques sont des donneurs efficaces d'hydrogène, la position et le degré d'hydroxylation de ces composés jouent un rôle majeur dans cette activité.

Nos résultats sont en accord à ceux obtenus avec la propolis *Egyptienne* (Ezzat et *al.*, 2019) et *Moroccaine* (El-Guendouz et *al.*, 2018).

1.3. Variation du pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène (H2O2)

Le tableau 7 et la figure 11 ci-dessous représentent les variations de la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène de l'extrait éthanolique de la propolis, et de l'acide ascorbique aux concentrations 12.5, 25, 50, 100 et 200µg/ml.

Tableau 7. Pourcentage de piégeage du H2O2 par l'extrait éthanolique de la propolis et l'acide ascorbique.

	12.5 µg/ml	25 µg / ml	50 µg / ml	100 µg / ml	200 µg / ml	IC50 (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 : comparaison faites entre l'EEP et l'acide ascorbique : **P≤0.01 désigne une différence très significative.

A partir des résultats obtenus, nous avons constaté que les variations de la capacité de réduction du peroxyde d'hydrogène (H2O2) de l'extrait éthanolique de la propolis et de l'acide ascorbique sont concentration dépendants. A 12,5 µg/ml, l'extrait éthanolique de la propolis présente un pouvoir de réduction de l'ordre de (31.87 ± 1.89%) contre (16.98± 2.71%) seulement avec l'acide ascorbique. L'effet de l'EEP est mieux que celui de l'acide ascorbique; le test de *student* montre une augmentation très significative des pourcentages de réduction de l'EEP aux différentes concentrations par rapport à ceux de l'acide ascorbique. Ce résultat est confirmé par les valeurs

obtenues de l'IC50; l'EEP présente une IC50 de 42,04 µg/ml contre 68,78 µg/ml notée avec l'acide ascorbique.

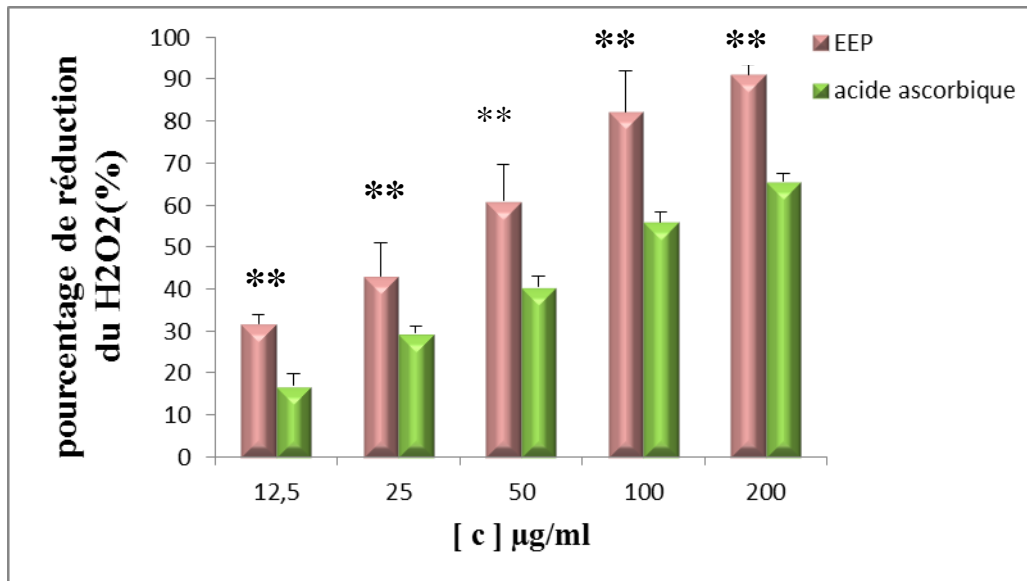


Figure 11. Pourcentage de réduction du peroxyde d'hydrogène de l'EEP et de l'acide ascorbique à différentes concentrations.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : comparaison faites entre l'EEP et l'acide ascorbique : $**P \leq 0.01$ désigne une différence très significative.

Le peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂) est un dérivé non radicalaire de l'O₂ et l'une des principales espèces réactives non chargés qui traverse facilement les membranes et provoque des dégâts énormes au niveau cellulaire, conduisant à la dégradation des lipides par oxydation d'acides gras insaturés membranaires (Pisochi et Pop, 2015). Keser *et al.*, (2012) ont démontré que la présence des polyphénols dans l'extrait éthanolique de la propolis est responsable de son potentiel antioxydant et anti-radicalaire.

2. Evaluation de l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité hépatique aigue du B(a)P

Le B(a)P est le membre prototypique et le mieux caractérisé des HAP, il est omniprésent dans l'environnement puisqu'il provient de différentes sources organiques, naturelles ou anthropiques. Les incendies de forêt, les éruptions volcaniques, la fumé de cigarette et l'alimentation (Miller *et al.*, 2001). L'évaluation de l'effet de l'extrait éthanolique de la propolis contre la toxicité hépatique aigue de ce polluant a été effectuée dans cette étude en se basant sur l'étude des paramètres de stress oxydant cytosolique cellulaire et des changements tissulaires associés au traitement.

2.1. Evolution pondérale des animaux sous l'effet des différents traitements

Au cours de l'expérience l'administration d'une dose unique 100 mg /Kg du B(a)p, plusieurs symptômes ont été observés chez les souris de ce lot, à savoir ; de fortes convulsions et agitations et une difficulté respiratoire. Par contre les souris des lots traités par EEP 25mg/kg et les souris du lot témoin ne subissent aucun changement.

Les variations du poids corporel (PC) des souris dès le début jusqu'à la fin de l'expérience sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 8. Evolution pondérale des poids corporels, des rapports foie chez les souris traitées par le B(a)P seul (100mg/kg), en association avec la propolis (50 mg/kg) et la propolis seul (50mg/kg).

	Témoin	EEP	B(a)P	EEP+B(a)P
PC g (1^{er} jour)	25,87±1,16	34,73±6,15	25,03±1,46	37,53±6,64
PC g (7^{ème} jour)	26,1±0,78*	33,23±3,67*	23,24±1,21**	31,3±2,1**
<i>Poid de foie</i>				
<i>Poid total</i>	0,05±0	0,0466±0,01 ns	0,047±0,01 ns	0,0460±0,01ns

Les résultats sont exprimés en moyenne± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($p>0.05$). * $P<0.05$ désigne un effet significatif ; ** $P<0.01$ désigne un effet très significatif. Comparaison faite entre le 1^{er} jour et le 7^{ème} jour du traitement pour chaque groupe pour le PC.

Nous avons constaté des variations de poids corporel au 7^{ème} jour des quatre groupes par rapport au 1^{er} jour. Le poids des animaux de groupe témoins et de groupe EEP seul est augmenté de façon significative ($p<0.05$) (26,1±0,78 et 33,23±3,67 respectivement) au 7^{ème} jour par rapport à (25,87±1,16 et 34,73±6,15 respectivement) enregistrés au 1^{er} jour de traitement.

Une diminution très significativement ($p<0.01$) au 7^{ème} jour a été enregistrée chez les souris du groupe EEP+B(a)P et chez les souris du groupe B(a)P seul (31,3±2,1g et 23,24±1,21g) respectivement contre (37,53±6,64g et 25,03±1,46g) respectivement notés au 1^{er} jour du traitement.

Nos résultats sont en accord avec ceux de l'étude de (Deng et al., 2018) qui ont indiqué des diminutions significatives du poids corporel chez les souris après 48 h et 72 h de l'administration de B (a)P à 100mg/kg. La diminution du poids corporel chez les souris traitées par le B(a)P vient de son effet cytotoxique qui provoque des lésions au niveau du foie, des poumons, de l'estomac, du cerveau et des reins affectant le fonctionnement normal de ces organes.

La diminution du poids corporel des souris du groupe EEP est similaire aux résultats obtenus par Oršolić et *al.* (2019). Cette diminution est peut être due à l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis qui régule le métabolisme hépatique des lipides et diminue ainsi le gain de poids corporel chez la souris.

Selon l'étude précédente, l'EEP a réduit la teneur en lipides dans le foie et a amélioré la fonction hépatique. Les composés polyphénoliques de l'EEP possèdent des effets positifs sur la fonction du foie et la distribution des lipoprotéines. Cela montre que la propolis possède un effet hépatoprotecteur et antihyperlipidémique (Oršolić et *al.*, 2019). La double diminution du poids corporel des souris du groupe EEP+B(a)P est due à l'association de l'effet toxique de B(a)P et l'effet antihyperlipidémie de la propolis.

Concernant le rapport des poids (foie/corps), on a trouvé qu'il n'y a pas de changements significatifs entre les groupes. Que ce soit lorsque on a comparé le groupe de B(a)P avec le groupe témoin, ou le groupe B(a)P avec le groupe EEP+B(a)P ou avec EEP seul. Le rapport entre le poids corporel et le poids de l'organe des animaux des quatre groupes a été similaire. Cela reflète qu'il y a une relation proportionnelle entre le changement du poids de chaque organe et celui du corps entier.

2.2. Evaluation du stress oxydant hépatique

2.2.1. Variation des taux du glutathion

Le système antioxydant cellulaire joue un rôle fondamental dans la défense cellulaire contre les radicaux libres réactifs et autres espèces oxydantes. Ce système est constitué de GSH et d'une gamme d'enzymes fonctionnellement liées, dont la GPx et la GST qui travaillent avec le GSH dans la décomposition des peroxydes d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques. Le GSH peut agir en tant qu'antioxydant non enzymatique par une interaction directement du groupe SH avec les ROS, ou peut être impliqué dans la réaction de détoxification enzymatique pour les ROS, en tant que cofacteur ou coenzyme (Ma et *al.*, 2011). Le GSH est une molécule omniprésente qui joue un rôle important dans le processus d'antioxydation de ROS et des radicaux libres (Wei et *al.*, 2012).

La figure 12 montre les variations des taux du GSH cytosolique hépatique après traitement par le B(a)P à (100 mg/kg) seul ou en cas de prétraitement par EEP à (25mg/kg/j) pendant 5 jours.

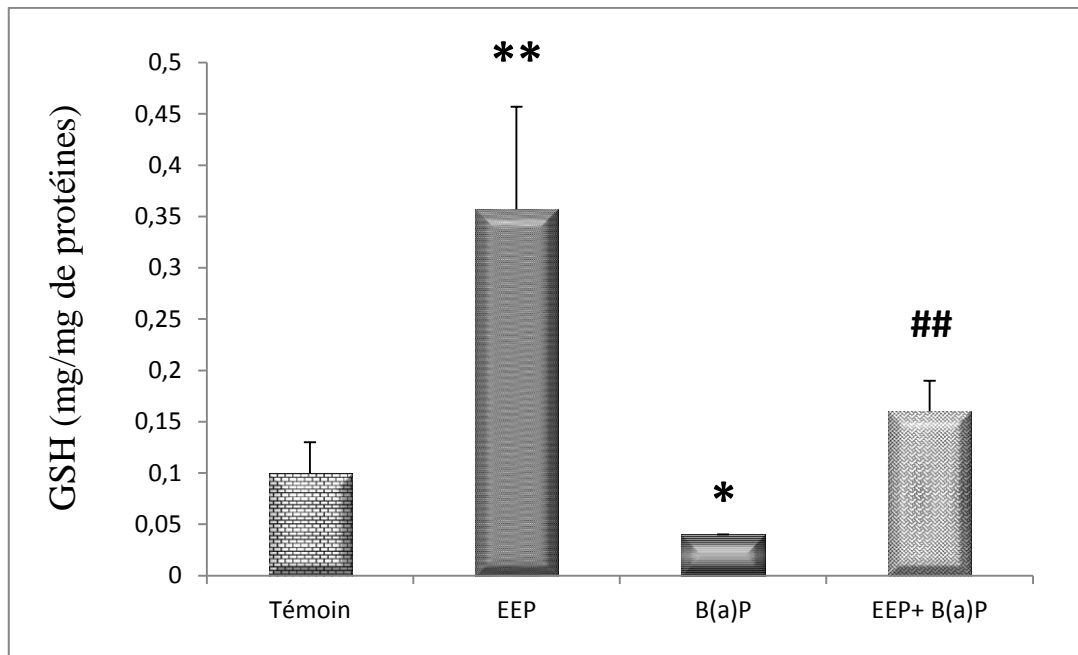


Figure 12. Variations des taux du GSH cytosolique hépatique après traitement par le benzo(a)pyrene absolu seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours à 25mg/kg.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : * $P \leq 0,05$ désigne un effet significatif lors d'une comparaison faite par rapport au Témoin. ## $P \leq 0,01$ désigne un effet très significatif, comparaison faites par rapport au groupe B(a)P.

D'après les résultats obtenus, les souris traitées par le B(a)P présentent une diminution significative ($P \leq 0,05$) des taux du GSH qui atteint $0,04 \pm 0,001$ mM GSH /mg de protéines contre $0,1 \pm 0,03$ mM GSH/mg de protéines chez les souris témoins. Le taux de GSH augmente de façon très significative ($P \leq 0,01$) chez les souris prétraitées par EEP avec une valeur de $0,16 \pm 0,03$ mM GSH /mg de protéines par rapport aux souris traités par la B(a)P seul. Ainsi les souris traitées par la propolis seule présentent une augmentation significative des taux de GSH qui atteint $0,36 \pm 0,11$ mM de GSH /mg de protéines contre $0,1 \pm 0,03$ mM GSH /mg de protéines chez les souris témoins.

La diminution des taux de GSH chez les souris traitées par le B(a)P par rapport au groupe témoin peut résulter d'une utilisation accrue de GSH par la GPx et la GST ou bien de la formation des complexes avec les métabolites de B(a)P. Cette diminution du contenu en GSH pourrait potentialiser la toxicité hépatique du B(a)P (Ma et al., 2011). Selon l'étude de Günay et al. (2016), l'exposition au B(a)P entraîne une diminution du glutathion associée à une augmentation du stress oxydatif cellulaire au niveau hépatique.

Nous avons constaté que EEP seule ou en association avec le B(a)P augmentait considérablement les niveaux de GSH dans le foie des souris ce qui est peut être en relation avec l'induction de sa synthèse, sa régénération ou à l'effet scavenger des flavonoïdes de la propolis (Kebsa et *al.*, 2014).

2.2.2. Variations des taux du malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique est le processus de dégradation oxydative d'acides gras polyinsaturés. Son apparition dans les membranes biologiques endommagent la membrane et provoque une altération de l'intégrité structurelle, diminution de la fluidité membranaire et l'inactivation d'un certain nombre de molécules comme enzymes et les récepteurs (Kebsa et *al.*, 2014).

Le MDA, produit final de la peroxydation lipidique initiée par les ROS, est une molécule hautement toxique et considérée comme le marqueur du stress oxydatif. Parce qu'il peut interagir avec l'ADN et les protéines pour former des adduits, on a souvent mentionné que le MDA était hautement mutagène et cancérigène (Wei et *al.*, 2012).

La figure 13 montre les variations des taux du MDA cytosolique hépatique après traitement par le B(a)P seul (100 mg/kg), ou en cas de prétraitement par EEP (25mg/kg/j) pendant 5 jours.

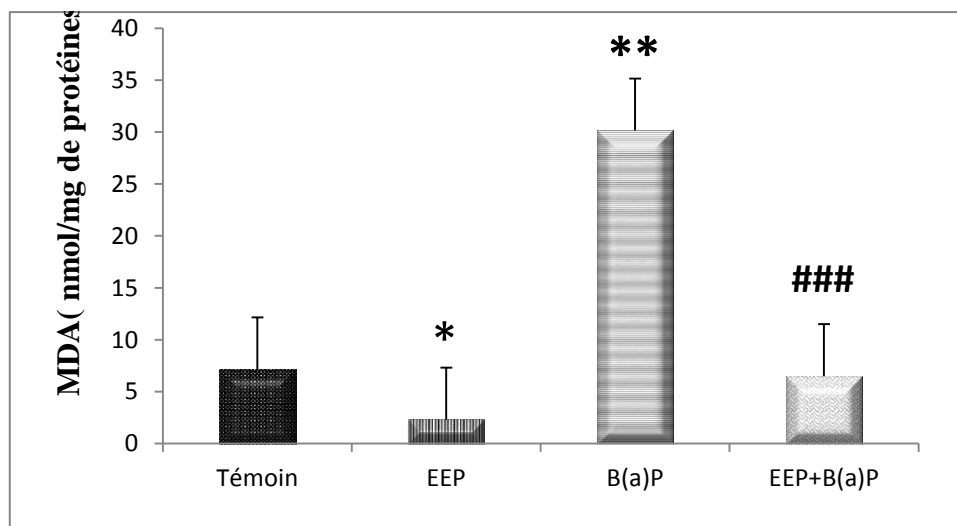


Figure 13. Variations des taux du MDA cytosolique hépatique après traitement par le B(a)P (100mg/kg) seul ou en cas de prétraitement par la propolis pendant 5 jours à 25mg/kg/j par voie orale.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : ** $P \leq 0,01$ désigne un effet très significatif, * $P \leq 0,05$ désigne un effet significatif lors d'une comparaison faite par rapport au Témoin $^{###} P \leq 0,001$ désigne un effet très hautement significatif, comparaison faites par rapport au groupe B(a)P.

D'après les résultats obtenus, les souris traitées par le B(a)P présentent une augmentation très significative ($P \leq 0,01$) des taux du MDA qui atteint $30,15 \pm 5,71$ nmoles/mg de protéines contre $7,16 \pm 4,51$ nmoles/mg de protéines chez les souris témoins. Le taux de MDA diminue de façon hautement significative ($P \leq 0,001$) chez les souris prétraitées par EEP $6,49 \pm 2,07$ nmoles/mg de protéines par rapport aux souris traitées par le B(a)P seul. Ainsi les souris traitées par EEP seule présentent une diminution significative des taux de MDA qui atteint $2,3 \pm 0,79$ (nmoles/mg de protéines) contre $7,16 \pm 4,51$ (nmoles/mg de protéines) chez les souris témoins.

L'augmentation des taux du MDA chez les souris traitées par le B(a)P, est peut-être due à l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des métabolites toxiques du B(a)P qui déclenchent le processus de la peroxydation lipidique ou à la diminution des taux d'enzymes antioxydants favorisant ce processus. Ma et *al.*, (2011) ont montré que le B(a)P subit une activation métabolique pour former des intermédiaires réactifs comme les B(a)P-quinones. Ces intermédiaires sont connus pour être impliqués dans la génération de ROS et sont associés avec altération oxydative de l'ADN, des protéines et des lipides.

L'inhibition de la peroxydation lipidique lors de l'administration de EEP, est due à son effet protecteur est peut-être dû à la captation des molécules du MDA par les principes actifs ou bien à l'inhibition des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (Kebsa, 2006). De plus, cette réduction du sous-produit de peroxydation lipidique (MDA) indique que le foie atténue par la propolis les dommages oxydatifs pouvant être attribués à ses principaux composants, tels que flavonoïdes et phénéthyl-ester de l'acide caféique (CAPE) (Mounieb et *al.*, 2017)

2.2.3. Variations de l'activité des enzymes anti-oxydantes SOD et CAT

Parmi les systèmes antioxydants enzymatiques cytosoliques figurent en première ligne la Superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) (Belge, 2016). Dans la présente étude et sur la base que le B(a)P génère des ROS dans son processus métabolique, nous avons l'intention d'évaluer l'effet du B(a)P sur l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase et de la catalase.

Le superoxyde dismutase (SOD) représente l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydant. Ces métalloprotéines assurent l'élimination de l'anion superoxyde O_2^- par réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Belge, 2016 ; Nimse et *al.*, 2015). La figure 14 illustre l'effet de la propolis à (25mg/kg/j) pendant 5 jours sur l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu hépatique des souris traitées par une dose unique du B(a)P à 100 mg/kg pendant 48H.

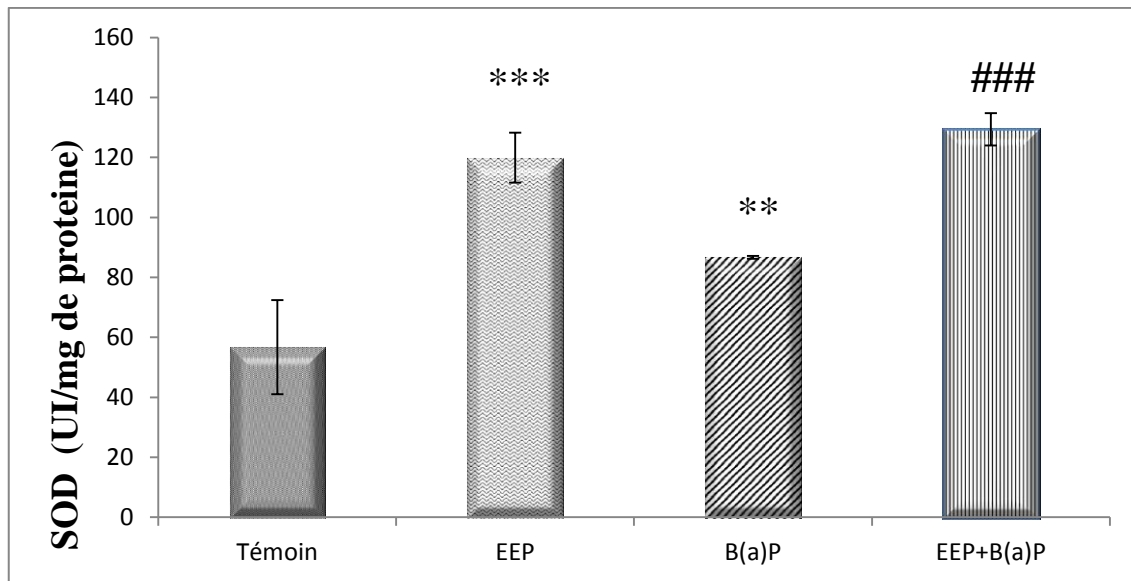


Figure 14. Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans le tissu hépatique, après un traitement par le B(a)p seul (100mg/kg), en cas de prétraitement par la propolis (25mg/kg) seul et en cas de la combinaison propolis + B(a)P.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : comparaison faites avec le groupe Témoin : ** $P \leq 0,01$ désigne un effet hautement significatif. *** $P \leq 0,001$ désigne un effet très hautement significatif. Groupe prétraité comparé au groupe BaP : ### $P \leq 0,001$ désigne un effet très hautement significatif.

Dans cette étude, nous avons enregistré une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité de la SOD dans le tissu hépatique des souris ayant reçu le B(a)P seul ($86,67 \pm 0,5$ UI/mg de protéine) par rapport au témoin ($56,76 \pm 15,69$ UI/mg de protéines). L'augmentation de l'activité de la SOD reflète l'installation et l'adaptation à un état de stress oxydatif, et confirme les résultats obtenus par (Deng et al., 2018).

Le traitement des souris par l'extrait éthanolique de propolis à 25 mg/kg avant l'administration du B(a)P a montré une élévation très significative ($P < 0,01$) de l'activité de cette enzyme par rapport à ceux recevant le B(a)P seul ($129,4 \pm 5,4$ UI/mg de protéine et $86,67 \pm 0,5$ UI/mg de protéine respectivement). Le traitement des souris par l'extrait éthanolique de la propolis seul a montré également une augmentation significative de l'activité de la SOD par rapport au témoin, l'activité enzymatique atteint $119,92 \pm 8,34$ UI/mg de protéine et $56,76 \pm 15,69$ UI/mg de protéines respectivement.

La catalase est une enzyme tétra-métrique contenant un groupe hème considérée comme une enzyme peroxisomale se trouve aussi dans les autres compartiments cellulaires (Castaldo et al., 2016). Elle constitue la première enzyme anti-oxydante caractérisée qui catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Starlin et al., 2013).

La figure 15 montre les variations de l'activité enzymatique de la CAT dans le tissu hépatique des souris après un traitement par le B(a)P seul à (100mg/kg), ou en cas du prétraitement par l'EEP à 25mg/kg/j pendant 5jours.

Dans cette étude, une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité enzymatique de la CAT a été enregistrée dans le tissu hépatique des souris ayant reçu le B(a)P seul ($66,22 \pm 1,48$ UI/mg de protéine) par rapport au témoin ($28,64 \pm 11,24$ UI /mg de protéines). L'augmentation de l'activité de CAT reflète l'installation d'un stress oxydatif induit par le B(a)p, et confirme les résultats obtenus par (Deng et *al.*, 2018).

Le prétraitement des souris par l'extrait éthanolique de propolis à 25 mg/kg a montré une élévation très significative ($P < 0.01$) de l'activité de cette enzyme ($139,06 \pm 5,04$ UI/mg de protéine) par rapport à ceux recevant le B(a)P seul ($66,22 \pm 1,48$ UI/mg de protéine). Le traitement des souris par l'extrait éthanolique de la propolis seul a montré également une augmentation significative de l'activité de la CAT par rapport au témoin ($121,31 \pm 5,72$ UI/mg de protéine et $28,64 \pm 11,24$ UI /mg de protéines respectivement).

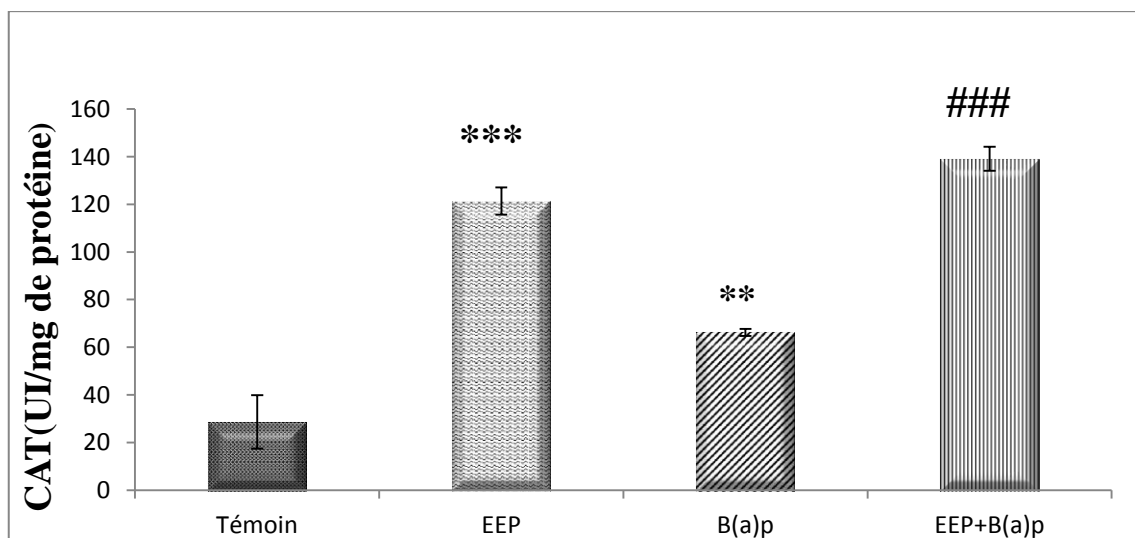


Figure 15. Variations de l'activité enzymatique de la CAT cytosolique dans le tissu hépatique, après un traitement par le B(a)p seul (100mg/kg) ou en cas de prétraitement par la propolis à (25mg/kg/j) pendant 5jours chez la souris.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de Student : comparaison faites avec le témoin : ** $P \leq 0,01$ désigne un effet hautement significatif. *** $P \leq 0,001$ désigne un effet très hautement significatif. Groupe prétraité comparé au groupe BaP : ### $P \leq 0,001$ désigne un effet très hautement significatif.

La SOD et la CAT constituent la première ligne de défense contre les ERO, la SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui à son tour est dismuté en eau et en oxygène moléculaire via la catalase (Deng *et al.*, 2018).

Dans notre étude l'administration de B(a)P induit des augmentations significatives dans les niveaux de SOD, de CAT chez les souris traité avec B(a)P, cette induction peut être due au stress oxydatif induit par B(a)P suite à la production excessive de ROS, en particulier une quantité considérable d'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène qui doivent être converti par SOD et CAT. Deng *et al.*, (2018) ont montré que les activités de la CAT et de la SOD étaient plus élevées après 24h et 48h du traitement par le B(a)P par rapport au témoin, le mécanisme implique l'induction transitoire de ces antioxydants enzymatiques par B(a)P.

Des augmentations très significatives de l'activité de SOD et CAT dans les groupes qui ont reçu EEP seule ou en en pré-traitement prouvent l'effet préventif de la propolis contre la toxicité aigüe du B(a)P. Cette augmentation est peut être due à l'activation directe de ces enzymes, l'induction de leurs expressions génétiques ou bien la propolis empêche toute altération de l'activité de ces enzymes ou leur consommation à travers la réduction et la neutralisation des radicaux libres (Kebsa, 2006).Plusieurs études suggèrent que la propolis renforce le système antioxydant par réduction des ROS et augmentation de l'activité enzymatique de la SOD et CAT (Kebsa *et al.*, 2007; Benguedouar *et al.*, 2008 ; kebsa *et al.*, 2014; Tzankova, 2019).

2.3.Etude histologique microscopique

Les coupes histologiques du foie des souris témoins, traités par EEP (25 mg/kg) ou par le B(a)P (100 mg/kg) ou par l'association EEP+B(a)P ont été réalisées pour observer les changements tissulaires qui peuvent apparaître suite aux différents traitements. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 16 ci-dessous.

L'observation microscopique des coupes histologiques de foie des souris témoins montre une histoarchitecture normale avec lobules hépatiques et arrangement uniforme des hépatocytes polyédriques qui convergent vers la veine centro-lobulaire (VC). Les noyaux des cellules présentent une structure vésiculaire normale avec un cytoplasme uniforme (Figure 16T).

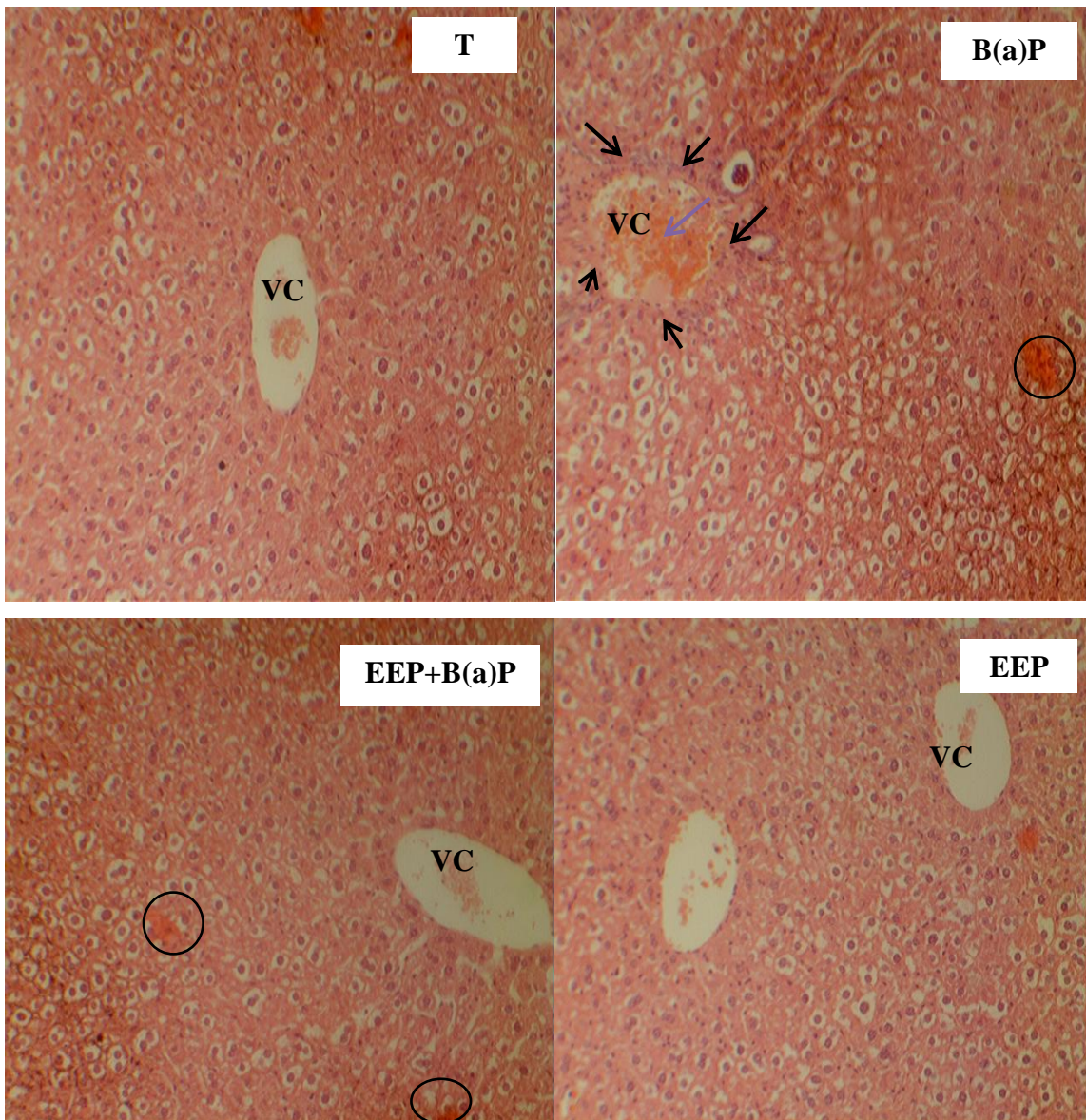


Figure 16. Coupes histologiques de foie des souris témoins, des souris traitées par EEP seul, des souris traitées par le B(a)P seul et des souris traitées par EEP+B(a)P (10X10).

Flèche noir : infiltration lymphocytaire. Flèche bleu : congestion. cercle noir : espaces hémorragiques. VC : Veine centrolobulaire.

Chez le groupe des souris traitées par le B(a)P à 100mg/kg, nous avons observé l'apparition d'une perturbation de la disposition des hépatocytes autour de la veine centrolobulaire. Des zones d'inflammation autour de la veine centrolobulaire avec infiltration lymphocytaire (indiquée par des flèches noires), apparition des espaces hémorragiques (cercle noir) avec congestion de la veine centrolobulaire (Flèche bleu) (Figure 16 B(a)P). Ces modifications peuvent être dues à une diminution de la défense anti-oxydante et/ou à l'accumulation d'ERO générés par le B (a)P.

Des changements similaires dans le tissu hépatique chez des souris ont été rapportés par des recherches (Deng *et al.*, 2018 ; Delgado-Roche *et al.*, 2019).

Par contre nous avons observé des altérations tissulaires moindres dans le foie des souris prétraitées par EEP (Figure 16 EEP+B(a)P) par B(a)P seul: absence d'inflammation et d'infiltration lymphocytaire, réduction de la congestion de l'espace porte mais avec conservation de quelques espaces hémorragiques (cercle noir). Chez le groupe traité par EEP seule nous avons observé que l'architecture hépatique est semblable à celle du témoin (Figure 16 EEP). La propolis exerce des effets hépatoprotecteurs contre l'hépatotoxicité induite par le B(a)P. Les résultats enregistrés dans la présente étude sont conformes avec ceux obtenus par l'étude de (Tanvir *et al.*, 2019).

Dans notre étude le traitement avec EEP indique le rôle de la propolis dans la protection du foie, elle est capable de piéger les radicaux libres: les radicaux hydroxyles (OH·), les anions superoxydes (O₂⁻) et les radicaux peroxylipidiques grâce aux flavonoïdes, en plus elle inhibe les enzymes responsables de la production de l'anion superoxyde, comme la xanthine oxydase et les protéines ce qui assure la protection des hépatocytes contre les dommages induits par le B(a)P (Tanvir *et al.*, 2019 ; Tzankova *et al.*, 2019). La propolis agit également par le renforcement des antioxydants enzymatiques (SOD, CAT, ..) et non enzymatiques (GSH) (Kebsa *et al.*, 2014).

L'étude histologique confirme les résultats biochimiques du stress oxydant cytosolique mesuré lors de la toxicité aiguë du B(a)P et l'effet préventif de la propolis obtenus dans cette étude.

Conclusion

La présente étude portée sur l'évaluation de l'effet préventif de la propolis de Jijel contre la toxicité hépatique aigue du B(a)P nous a permis de conclure que:

- La propolis de *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.
- Le B(a)P est toxique pour le foie et conduit à une diminution de poids corporels des souris et l'induction d'un stress oxydant hépatique intense. Ce stress oxydant est exprimé par l'augmentation de la peroxydation lipidique et l'activité des enzymes anti-oxydantes SOD et CAT et une déplétion en glutathion (GSH). Ceci est confirmé par l'apparition des modifications tissulaires sévères.
- Le prétraitement des souris par la propolis à la dose de 25 mg/kg a permis la mise en évidence d'un effet préventif contre l'hépatotoxicité du B(a)P. Ceci se traduit par le renforcement des systèmes antioxydants enzymatiques (SOD et CAT) et non enzymatiques (GSH) et la protection des membranes contre les effets de ROS par inhibition de la peroxydation lipidique et la réduction des taux de MDA.

Cette étude reste préliminaire, il serait souhaitable de développer cette étude en mesurant d'autres paramètres du statut antioxydant/pro-oxydant. Elle nécessite d'autres études à l'échelle moléculaire pour mieux développer le mécanisme hépatotoxique du B(a)P et hépatoprotecteur des polyphénols de la propolis. Une analyse de la composition chimique de l'extrait éthanolique de la propolis est également nécessaire.

Références

Bibliographiques

- Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F.** (2018). Propolis: Chemical Composition and Its Applications in Endodontics. *Iran. Endo. J.* 13(3): 92-285.
- Ahn M.R, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T.** (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem. J.* 101 (4): 1383-1392.
- Ancerewicz J, Migliavacca E, Carrupt P.A et al.** (1998). Structure–property relationships of trimetazidine derivatives and model compounds as potential antioxidants. *Free Radical Bio. and Med. J.* 25(1): 113-120.
- Awogi T et Sato T.** (1989). Micronucleus test with benzo[a]pyrene using a single peroral administration and intraperitoneal injection in males of the MS/Ae and CD-1 mouse strains. *Mutat. Res.J.* 223(4): 353–356.
- Bankova V.** (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Ethno.pharm.J.* 100: 114–117.
- Barbeau D.** (2013). Le 3-hydroxybenzo (a) pyrène urinaire en tant qu'indicateur biologique de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Th.doct* : Université de Grenoble-France-. P. 256.
- Belge E.K.** (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative stress. *Nutr. J.* 15: 1-71.
- Benguedouar L, Boussenane H.N, Kabsa W, Alyane M, Rouibah H and Lahouel M.** (2008). Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced byantineoplastic agents (doxorubicin and vinblastine) in rats. *Indian. exp. boil. J.* 46: 112-119.
- Benguedouar L, Lahouel M, C Gangloff S, Durlach A, Grange F, BernardP, and Antonicelli F.** (2016). Ethanolic extract of Algerian propolis and galangin decreased murine melanoma T. *Anti-Cancer Agents in Med.Chem.* 16(9):1172-1183.
- Bonvehí J.** (2011). Gutiérrez, A. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). *J of American Oil Chemists' Society.* 88: 1387–1395.
- Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C.** (2007). Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann. Oncol. J.* 18(3):431-46.
- Bottcher J.P, Knolle P.A, Stabenow D.** (2011). Mechanisms Balancing Tolerance and Immunity in the Liver. *Dig. Dis. J.* 29(4): 90-384.
- Bouaroura A, Segueni N, Diaz J.G, Bensouici C, Akkal S, and Rhouati S.** (2019). Preliminary analysis of the chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities of Algerian propolis. *Ntr. Prod. Resrch. J. P.* 1-5.

Bourgart E, Barbeau D, Marques M, Vonkoschbahr A, Béal D, Persoons R, Leccia M.T, Douki T, 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. J.* 93(1):81-93.

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

Burczynski M.E et Penning T.M. (2000). Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-ketoreductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancr. resrch. J.* 60(4): 908-915.

Castaldo S, Capasso F. (2002). propolis and old remedy used in modern medicine. *Fitotérapie.* 73(1) :1-6.

Castaldo S.A, Freitas J.R, Conchinha N.V, Madureira P.A. (2016). The Tumorigenic Roles of the Cellular redox Regulatory Systems. *Oxidative Med. and Cell. Longevity.* P. 17.

Chen M.R, Tsai P.J, Wang Y.F. (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. *Enviro. intern. J.* 34(7): 971-5.

Collin A. (2013). Mort cellulaire induite par la co-exposition benzo [a] pyrène/éthanol dans les hépatocytes : rôle du remodelage membranaire. *Th. doct* : Université de Rennes 1, France. P.139.

Crettol S, Petrovic N, Murray M. (2010). Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism. *Current.Pharma. Desi.* 16(2):204-219.

Csiszár J, Horváth E.B, Ela K, Gallé Á. (2016). Glutathione-Related Enzyme System: Glutathione Reductase (GR), Glutathione Transferases (GSTs) and Glutathione Peroxidases (GPXs). *Redox State as a Cent. Reg. of Plant-Cell Stress Resp.* 137-158.

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

Debab M, Toumi-Benali F, M.M, Dif M.M. (2017). Antioxidant Activity of Propolis of West Algeria. *Phytothér.* 15: 230-234.

Delgado-Roche L, Rodeiro I, Riera M, Herrera J. A, Venturi I, Hernández Y et al. (2019). Chemoprotective effects of Ulvalactuca (green seaweed) aqueous-ethanolic extract against subchronic exposure to benzo (a) pyrene by CYP1A1 inhibition in mice. *Phyto. Resrch.* 5: 1-10.

Deng C, Dang F, Gao J, Zhao H, Qi S, and Gao M. (2018). Acute benzo [a] pyrene treatment causes different antioxidant response and DNA damage in liver, lung, brain, stomach and kidney. *Heliyon.J.* 4(11):1-25.

Derakhshesh N, Salamat N, Movahedinia A, Hashemitabar M, 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. *Chemsph. J.* 226:534-544.

Dewanto V, Xianzhong WU, Adom K.K et al. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. agricult and food chem.* 50(10) : 3010-3014.

El Housseini N. (2013). Intérêts et applications cliniques de la propolis en médecine bucco-dentaire. *Th. Doct.* : Université de Nantes. France. P.110.

El-Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Popova M, Neto L, Leonor Faleiro M, Miguel M. D. G. (2018). Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with No Induction of Resistance after Continuous Exposure. *Evid-Based Complem. and Altern. Med.* P:1-19.

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

Evans J.L, Goldfine I.D, Maddux B.A and Grodsky G.M. (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 23: 599-622.

Ezzat S.M, Khattaby A.M, Abdelmageed S, Elaal M.A.A. (2019). Cytotoxicity, antioxidant, anti-inflammatory activity, and GC-MS analysis of Egyptian propolis. *Comp. Clinc. Path.* P.1-10.

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.

Foth H, Kahl R and Kahl G.F. (1988). Pharmacokinetics of low doses of benzo[a]pyrene in the rat. *Food. Chem. Toxicol.* 26: 45–51.

Gaertner R. R, Theriault G.P. (2002). Risk of bladder cancer in foundry workers: a meta-analysis. *Occup. and Envir. Med. J.* 59(10): 655-63.

Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. (2009). Propolis. *Phytothér.* 7: 100–105.

Gregoris E, Stevanato R. (2010). Correlations between Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of Venetian Propolis. *Food. and Chem. Toxicol.* 48: 76 –82.

Günay E, Celik S, Sarinc-Ulasli S, Özyürek A, Hazman Ö, Günay S et al. (2016). Comparison of the anti-inflammatory effects of proanthocyanidin, quercetin, and

damnacanthal on benzo (a) pyrene exposed A549 alveolar cell line. *Inflammation*. 39(2): 744-751).

Haleng J, Pincemail J, Defraigne J. O, CHARlier C, CHaPelle J.P. (2007). Le stress oxidant. *Rev. Med. Liege*. 62(10) : 628-638.

Hegazi A.G. (1997). Contribution à l'étude de la composition chimique et des Propriétés biologiques de la propolis. *Thes.Dot.* Université de Béjaia-Algérie- Pp.1-19.

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

Higashi K.O et De Castro S.L. (1995). Effect of different formulations of propolis on mice infected with Trypanosomacruzi. *J. Ethnopharmacol.* 46: 55-8.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (1983). Polynuclear aromatic compound: Part 1. *Chem. Envir. and Exper. Data.* 1-457.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related occupational exposures, Lyon, France. Distributed by *World Health Organ.* 92: 1-868.

Iqbal Z, Akhtar M.S, Sindhu Z.U.D, Khan M.N et Jabbar A. (2003). Herbal dewormers in livestock-a traditional therapy. *Intern. J. of Agricol and Biol.* 2:199-206.

Jiang Y, Zhou X, Chen X, Yang G, Wang Q, Rao K, Xiong W, Yuan J. (2011). Benzo(a)pyrene-induced mitochondrial dysfunction and cell death in p53-null Hep3B cells. *Mutat. Res.* 726, 75–83.

Joanna K, Malgorzata K, Dorota L-K, Jacek K, and Irena M. (2018). Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application. *Oxidative medicine and cellular longevity.* P.1-29.

Kasala E.R, Bodduluru L.N, Barua C.C, Sriram C.S, and Gogoi R. (2015). Benzo (a) pyrene induced lung cancer: role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacol. 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. *J of the Food Hygien. Soc. of Japan.* 29 : 21-25.

Kebsa W. (2006). Effet de la propolis algérienne sur le stress oxydatif mitochondrial. *Th. magister* : Université Mohamed Sedik Ben Yahia, Jijel-Algérie- Pp.128-132.

Kebsa W, Rouibah H, Bousnane H.N, Bengueduer L, Alyane M and 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.* 22:16-26.

Kebsa W, Lahouel M, Rouibah H, Malek Z, Mamoun A, Bachaer A. (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 med. chem.* 18 (9): 1330-1337.

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

Kim J, Koo S.I, Noh S.K. (2012) Green tea extract markedly lowers the lymphatic absorption and increases the biliary secretion of ¹⁴C-benzo[a]pyrene in rats. *J Nutr. Biochem.* 23(8):1007-11.

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

Klaunig J.E, Kamendulis L.M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:239-67.

Kroese E, Muller J, Mohn G, and Dortant P.W. (2001). Tumorigenic effects in Wistar rats orally administered benzo[a]pyrene for two years (gavage studies). Implications for human cancer risks associated with oral exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Th. Doc.* Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, Pays-Bas.

Kumar K, Pandey A.K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids. *Sci. World J.P.* 5:1-16.

Lahouel M, Boutabet k, Kebsa W and Alyane M. (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 4(10) :712-720.

Lahouel M, Boutabet K, kebsa W et al. (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African J. of Pharma. and Pharmaco.* 4 (10) : 712-720.

Lahouel M, Boulkour S, Segueni N, and Fillastre J.P. (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. *Patho. Bio. J.* 52(6) : 314-322.

Li D, Day R.S, Bondy M.L, Sinha R, Nguyen N.T, Evans D.B, Abbruzzese J.L, and Hassan M.M. (2007). Dietary mutagen exposure and risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16(4): 655–661.

Lotfy M. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific J. of cancer preven.* 7: 22-31.

- Ma J.Q, Liu C.M, Qin Z.H, Jiang J.H, and Sun Y.Z.** (2011). Ganodermaapplanatumterpenes protect mouse liver against benzo (α) pyren-induced oxidative stress and inflammation. *Enviro. toxicol and pharmaco.* 31(3):460-468.
- Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, Viau C, Maître A.** (2010). A toxicokinetic study to elucidate 3- hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats. *J. Appl. Toxicol.* 30(5) :402-10.
- Marie C.** (2007). Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. *Th doct:* Université Joseph-Fourier-Grenoble I.P.235.
- Marklund S et Marklund G.** (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. of biochem.* 47(3): 469-474.
- Mehaisen G. M, Ibrahim R.M, Desoky A.A, Safaa H. M, El-Sayed O.A, and Abass A. O.** (2017). The importance of propolis in alleviating the negative physiological effects of heat stress in quail chicks. *PloS one,* 12(10), e0186907.
- Migdal C, Serres M.** (2011). Reactive oxygen species and oxidative stress. *méd.sci. J.* 27(4): 405-412.
- Moreira F. A, Aguiar D.C, Campos A.C, Lisboa S. F, Terzian, A.L., Resstel, L.B., Guimaraes, F.S.,** (2008). Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1. *Neuro. Pharmacol.* 54:141-150.
- Moronpot R.R, Yoshizawa k, Nyska A, Harada T, et al.** (2012). Hepatic Enzyme Induction: Histopathology. *Toxicol. Pathology.* 38(5): 95-776.
- Mounieb F, Ramadan L, Akool E. S, and Balah, A.** (2017). Propolis alleviates concanavalin A-induced hepatitis by modulating cytokine secretion and inhibition of reactive oxygen species. *Naunyn-Schmiedeberg's arch. of pharma.* 390(11), 1105-1115.
- Nimse S.B, Pal D.** (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv. J.*5:1-21.
- Noushin A et Alireza N.** (2017). Propolis diterpenes as a remarkable bio-source for drugdiscovery development. *Inter. J. of Mol. Sci.* 18(6):1290.
- Ohkawa H, Ohishi N et Yagi K.** (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal.Biochem.* 95(2): 351-358.
- Omodanisi E.I., Aboua Y.G., Oguntibeju O.** (2017). Assessment of the Anti-Hyperglycaemic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Methanol Extract of *MoringaOleifera* in Diabetes-Induced Nephrotoxic Male Wistar Rats. *Molecules.* 22(4):1-16.

Oršolić N, LandekaJurčević I, Đikić D, Rogić D, Odeh D, Balta V, et al. (2019). Effect of Propolis on Diet-Induced Hyperlipidemia and Atherogenic Indices in Mice. *Antioxidants*. 8(6): 156.

Ozougwu J. (2017). Physiology of the liver. *Intern. J. of Research in Pharma. and Biosci.* 4(8): 13-24.

Papachristoforou A, Koutouvela E, Menexes G, Gardikis K and Mourtzinis I. (2019). Photometric Analysis of Propolis from the Island of Samothraki, Greece. The Discovery of Red Propolis. *Chem. and biodiversity*. P :1-13.

Piccinelli A. L, Mencherini T, Celano R, Mouhoubi Z, Tamendjari A, Aquino R. P, and Rastrelli L. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of Algerian propolis. *J. of agricol. and food chem.* 61(21): 5080-5088.

Pieme C.A, Tatangmo J.A, SiSmo G, Nya P.C.B, Moor V.J.A., et al. (2017) Relationship between hyperglycemia, antioxidant capacity and some enzymatic and non-enzymatic antioxidants in African patients with type 2 diabetes. *BMC Res. Notes*. 10(1): 141.

Pisoschi AM et Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress. *Eur. J. of Med. Chem.* 97 : 55-74.

Poisson C. (2014). Rôle du stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique. *Th doct* : Université paris- Sud 11. France. P : 416.

Racolt G, Federspiel F. (2008). Hépatologie Gastroentérologie. *Wolters Kluwer éd.* France. Paris. Pp. 2-11.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S and Dhama K. (2014). Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *Bio. Med. Research Intern.* 12: 1-19.

Ramos A.F.N, Miranda J.L. (2007). Propolis: A Review of Its Anti- Inflammatory and Healing Actions. *J. of Venomous An. and Toxins include. Tropical. Diseases*.13: 697–710.

Rangi S, Dhatwalia S. K, Bhardwaj P, Kumar M and Dhawan D. K. (2018). Evidence of similar protective effects afforded by white tea and its active component 'EGCG' on oxidative-stress mediated hepatic dysfunction during benzo(a) pyrene induced toxicity. *Food and Chem.Toxicol.* 116:281-291.

Rejane P. D. S, Bruna A. S.M, Gabriele A. B, Samantha S.C, Luciana N. A, Ricardo G, A., el al. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos one*. 12(3):1-22.

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

Rouibah H, KessaW, Lahouel M, Malek Z, Mamoun A, Ibtihel M, Bachayer A and Hamza A. (2018). Algerian Propolis Potentiates Doxorubicin Mediated Anticancer Effect against Human Pancreatic PANC-1 Cancer Cell Line through Cell Cycle Arrest, Apoptosis Induction and P-Glycoprotein Inhibition. *Anti-cancer agents in med. Chem.* 18(3): 375-385.

RTEC S. (1994). Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.MEDLARS Online Information Retrieval System, U.S. *National Library of Medicine*, Bethesda, Maryland.

Ruch R.J, Cheng S.J et Klaunig J.E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6): 1003-1008.

Salamone M.F. (1981). Toxicity of 41 carcinogens and noncarcinogenic analogs.Dans : de Serres, F.J. et Ashby, J. (éd.). Progress in mutation research.Vol. 1.Evaluation of short-term tests for carcinogens. Report of the inter. Corrobor. program. Elsevier-North Holland, Amsterdam (Pays-Bas), p. 682–685.

Salatino A, Salatino M.L.F. (2018). Brazilian Red Propolis: Legitimate Name of the Plant Resin Source. *MOJ Food Pro. and Techno.* 6 (1): 1-2.

Santos D.A, Munari F.M, Moura S, Barcellos T et al. (2019). Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines. *Biotech. Research and Innov.* 30 : 1-11.

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

Sharma A.B. Jha R.S. Dubey M. Pessara k.L. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stress ful conditions. *J. Bot.* 2: 1-26.

Silva-Carvalho R, Baltazar F and Almeida-Aguiar C. (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Compl. and Altern. Med.* 25(3):206-439

Singleton V.L et Rossi J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American J. of Eno. and Viticul.* 16(3): 144-158.

Sinha M et Dash D.K. (2018). Mangiferin protects renal impairment against benzo(a)pyrene induced toxicity by regulating mitochondrial and dna integrity. *J. of Drug Delivery and Therap.* 8 (1): 92-97.

Starlin T, Gopalakrishnan V.K. (2013). enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of tylophorapauciflorawight and arn:an in vitro study. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6: 68-71.

Taehoon L, Pradeep P, Chulkyoon M. (2019). Degradation of benzo[a]pyrene on glass slides and in food samples by low pressure cold plasma. *Food Chem.* 286 (2019): 624–628.

Tanvir E. M, Hasan M. A, Nayan S. I, Islam T, Ahmed T, Hossen M. S., et al. (2019). Ameliorative effects of ethanolic constituents of Bangladeshi propolis against tetracycline-induced hepatic and renal toxicity in rats. *J. of Food Biochem.* 1-11.

Tarantini, A. (2009). Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges. *Th doct.* Université Joseph-Fourier-Grenoble I. P.175.

Therond P. (2006). Dommages créés aux biomolécules (lipides, protéines, ADN) par le stress oxydant. *Ann. Pharma.* 64 : 383-389.

Tram K.L, Cross A.J, Consonni D, Randi G, Bagnardi V, Bertazzi P.A, Caporaso N.E, Sinha R, Subar A.F, and Landi M.T. (2009). Intakes of red meat, processed meat, and meat mutagens increase lung cancer risk. *Cancer Res.* 69(3): 932–939.

Tzankova V, Aluani D, Yordanov Y, Kondeva-Burdina M, Petrov P, Bankova V and Tzankov B. (2019). Micellar propolis nanoformulation of high antioxidant and hepatoprotective activity. *Revista Brasileira Farmaco. J. 2:* 1-9.

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

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

Van de Wiel J.A, Fijneman P.H, Duijf C.M, Anzion R.B, Theuws J.L. and Bos, R.P. (1993). Excretion of benzo[a]pyrene and metabolites in urine and feces of rats: influence of route of administration, sex and long-term ethanol treatment. *Toxicol.* 80:103–115.

Vincenzo Z, Valeria C, Arianna D.L, Alessandra B, Cristina M, Sabrina S and Maria D. (2017). Effect of green and brown propolis extracts on the expression levels of microRNAs, mRNAs and proteins, related to oxidative stress and inflammation. *Nutrients.* 9(10): 1090.

Vuppalanchi R, Juluri R, Bell L.N, Ghabril M, Kamendulis L, Klaunig J.E, Saxena R, Agarwal D, Johnson M.S, Chalasani N. (2011). Oxidative Stress in Chronic Liver Disease Relationship Between Pheripheral and Hepatic Measurements. *AM J. Med. Sci.* 342 (4): 314-317.

Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Woo S.O, Kwon H.W et al. (2016). Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Compl. and Alterna. Med.* 16(65):1-12.

Wei W, Li X. F, Li X. N, Chen X. M, Liu A. L, and Lu, W. Q. (2012). Oxidative stress and cell cycle change induced by coexposed PCB126 and benzo (a) pyrene to humanhepatoma (HepG2) cells. *Envir. toxicol.* 27(5), 316-320).

Wester P.W, Muller J.J.A, Slob W, Mohn G.R, Dortant P.M, and Kroese E.D. (2012). Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2-year oral study in Wistar rats. *Food Chem.Toxicol.* 50(3-4):927-935.

Withey J.R, Shedden J, Law F.C and Abedini S. (1993). Distribution of benzo[a]pyreneinpregnant rats following inhalation exposure and a comparison with similar data obtained withpyrene. *J. Appl. Toxicol.*13.193-202.

Xue W et Warshawsky D. (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage. *Toxicol and Applied Pharmaco.* 206:73-93

Yamazaki M, Suzuki H, Sugiyama Y. (1996). Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharma Research.* 13(4):497-513.

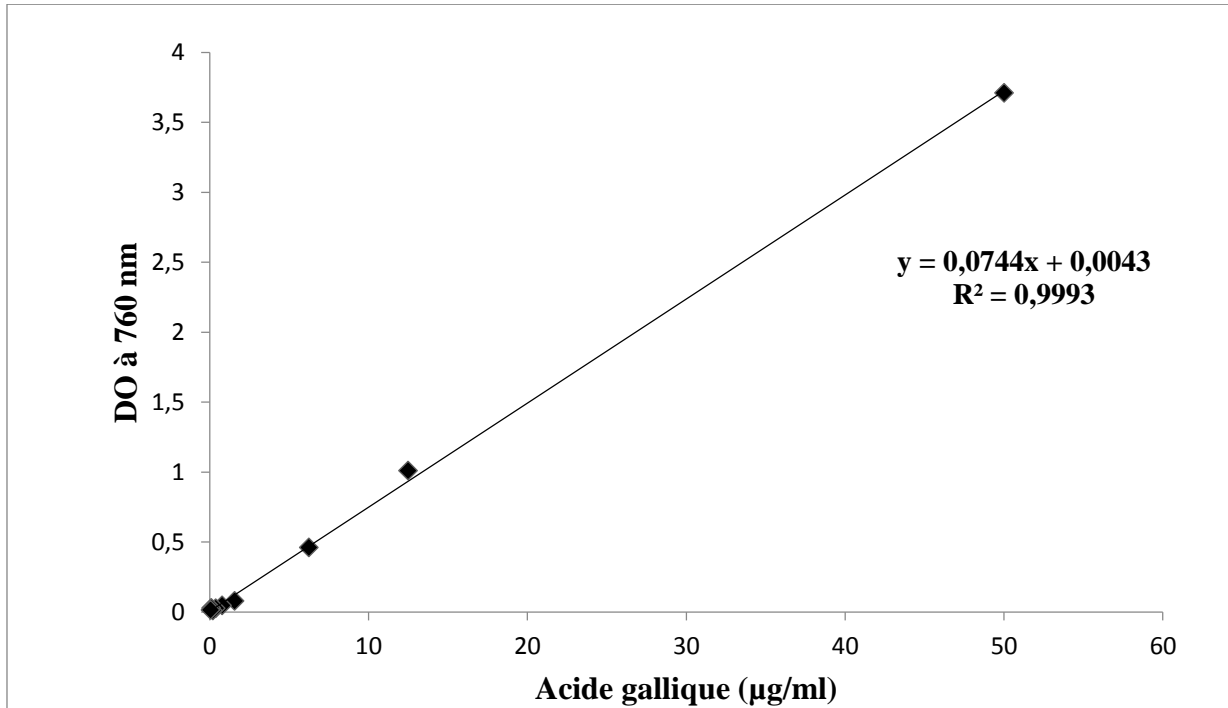
Yang Y, Sjövall J, Rafter J, Gustafsson J.A. (1994) Characterization of neutral metabolites of benzo[a]pyrene in urine from germfree rats. *Carcinogenesis. Apr.* 15(4): 681-7.

Yuan L, Liu J, Deng H, and Gao C. (2017). Benzo [a] pyrene induces autophagic and pyroptotic death simultaneously in HL-7702 human normal liver cells. *J. of agricol and food chem.* 65(44) : 9763-9773.

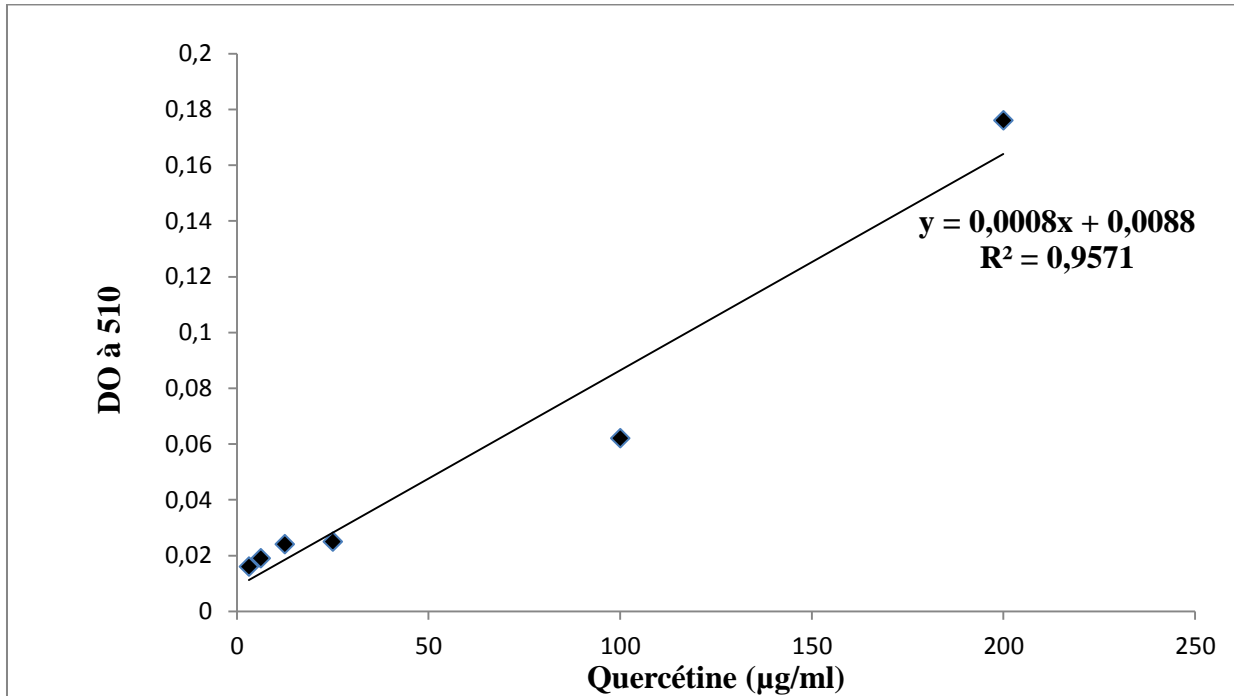
Zabaiou, N. (2017). Etude du stress oxydatif dans l'hypertrophie bénigne de la prostate et mise en évidence de l'effet de la propolis contre le cancer de la prostate in vivo sur un modèle animal de rat Wistar et ex vivo sur les cellules LNCaP du cancer de la prostate hormono-sensibles. *Th. doc* : Université Mohammed Seddik Ben Yahia , Jijel-Algérie- P. 158.

Zhang L, Jin Y, Huang M, and Penning T. (2012). The role of humanaldo-ketoreductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclicaromatichydrocarbons: interconversion of PAH catechols and PAH o-quinones. *Frontiers in pharm.* 3: 1-193.

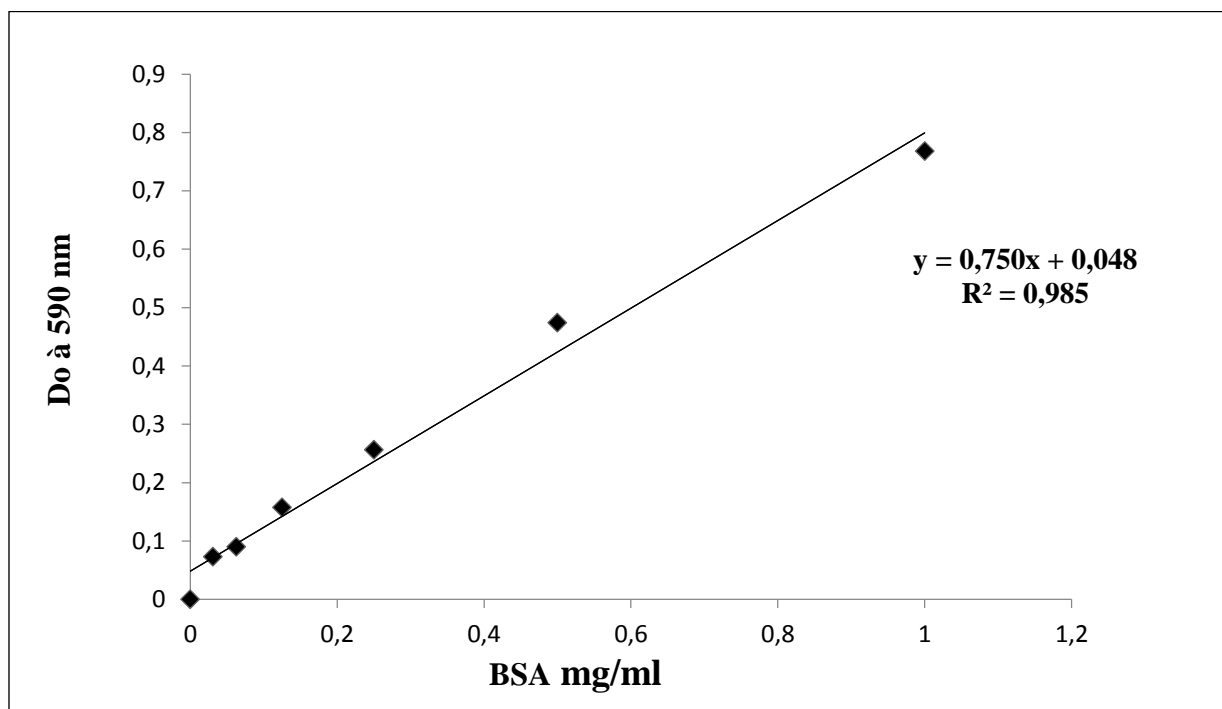
Annexes



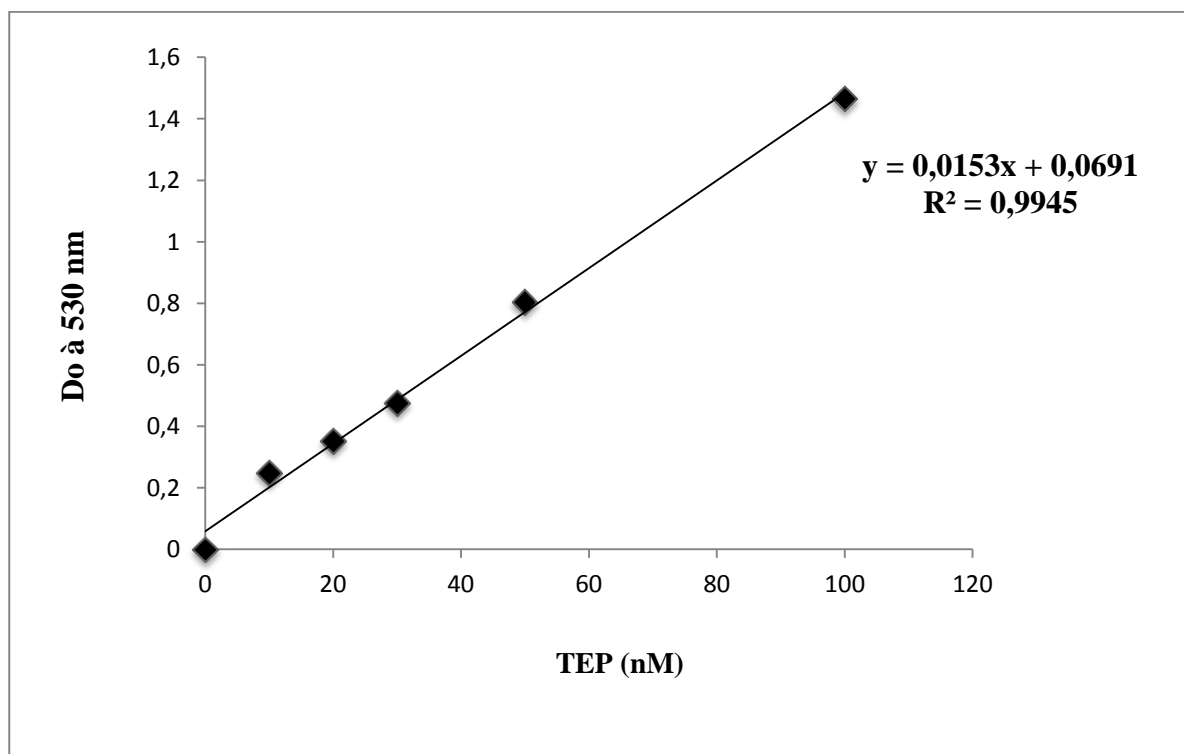
Annexe 1. Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols (acide gallique comme standard). (Moyennes de 3 essais).



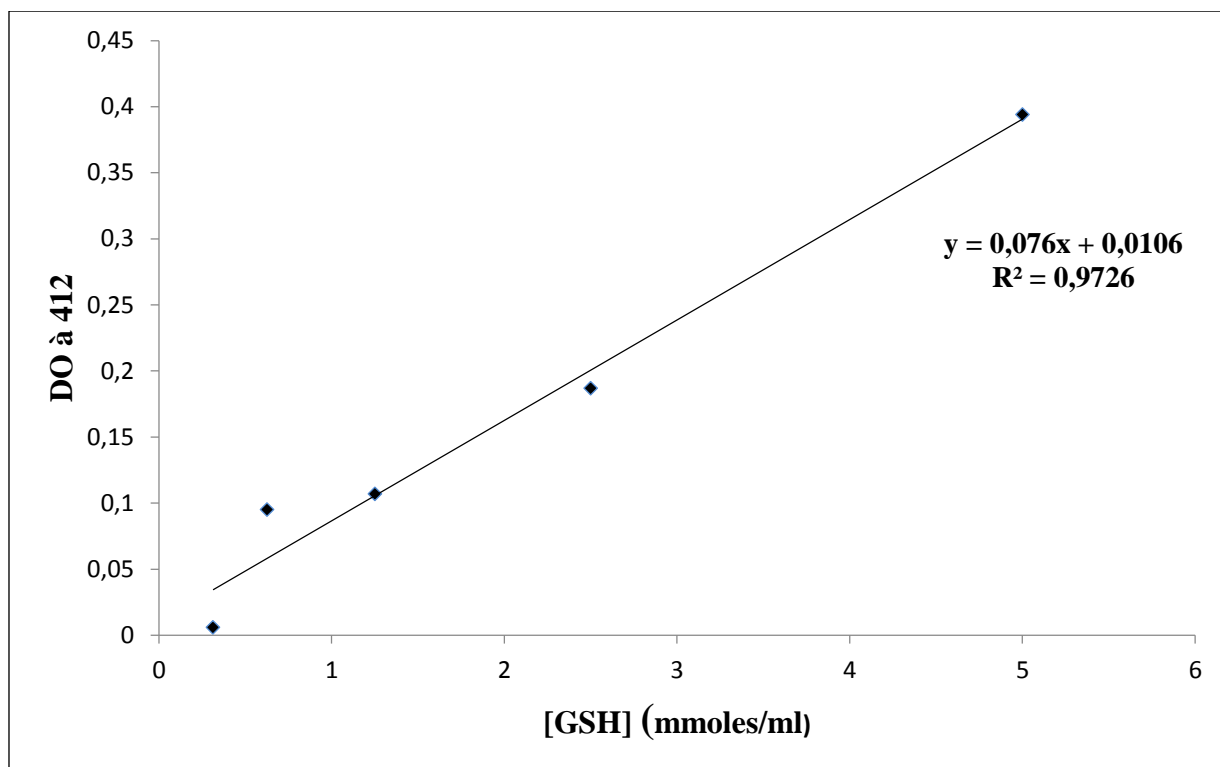
Annexe 2. Courbe d'étalonnage de dosage des flavonoïdes en µg/ml (quercétine comme standard). (Moyennes de 3 essais).



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 :

- BENBEKHMA Naima
- CHELAGHEMA Roqiya
- KHELIFI Halima

Encadré par :

Mme KEBSA W.

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

Le benzo(a)pyrène B(a)P est un polluant atmosphérique cancérigène capable d'induire une hépatotoxicité *via* la génération des radicaux libres et l'induction d'un stress oxydant. La présente étude vise à évaluer l'effet préventif de la propolis de Jijel contre l'hépatotoxicité aigüe du B(a)P chez la souris. L'étude phytochimique a montré que la propolis est riche en polyphénols et en flavonoïdes et possède une activité anti-radicalaire contre les radicaux DPPH° et un pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène. Les IC50 sont de l'ordre de 30.54 µg/ml et 42.04 µg/ml respectivement. L'étude *in vivo* a montré que le B(a)P à 100mg/kg en dose unique par voie intrapéritoniale (IP) présente une toxicité hépatique sévère 48heures après le traitement. Ceci se traduit par une réduction significative des poids corporels des souris et des taux du glutathion (GSH) et une augmentation de la peroxydation lipidique (MDA) et de l'activité des enzymes anti-oxydantes superoxyde dismutase (SOD) et catalase (CAT). Le prétraitement par la propolis à (25mg /kg/j) pendant 5jours a permis de prévenir cette toxicité par diminution des taux du MDA d'une part, et augmentation des taux de GSH et de l'activité de la SOD et de la CAT d'autre part. L'étude histologique a confirmé la toxicité de B(a)P et l'effet hépatoprotecteur de la propolis. Ces résultats recommandent donc l'utilité de la propolis pour atténuer les dysfonctionnements hépatiques du B(a)P.

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

Abstract

Benzo(a) pyrene B(a)P is an atmospheric pollutant with carcinogenic and hepato-toxic effects due to free radicals generation and oxidative stress induction. The present study aims to evaluate the preventive effect of Jijel propolis against the acute hepatotoxicity of B (a) P on mice. The phytochemical study showed that propolis is rich on polyphenols and flavonoids and has an anti-radicalar activity against DPPH ° free radical and a reduction power of hydrogen peroxide. The IC50 values are 30.54 µg / ml and 42.04 µg / ml respectively. The *in vivo* study showed that intra-peritoneally (IP) single dose of B(a)P at 100 mg/kg showed severe hepatic toxicity 48 hours after treatment. It results in a significant reduction in mouse body weight and glutathione levels (GSH) and an increase in lipid peroxidation (MDA) and antioxidant superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities. Pretreatment with propolis at 25mg/kg/day for 5 days prevented this toxicity by reducing MDA levels and increasing GSH levels and enzymes SOD and CAT activities. The histological study confirmed the B(a)P toxicity and the propolis hepatoprotective effect. These results therefore recommend propolis usefulness to decrease hepatic dysfunctions of B(a)P.

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

المخلص

البنزو(أ)بيرين Benzo (a) pyrene B(a)P عبارة عن ملوث جوي مسرطن وقادر على إحداث تسمم الكبد عن طريق توليد الجذور الحرة وتحريض الإجهاد التأكسدي. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التأثير الوقائي لدنج جيجل ضد السمية الكبدية الحادة لـ B(a)P عند الفئران. أظهرت الدراسة الكيميائية النباتية أن البروبوليس غني بالبوليفينول والفلافونويد وله نشاط مضاد ضد جذور DPPH و قدرة مخفضة لبيروكسيد الهيدروجين. حيث يقدر التركيز المثبط 50% (IC50) ب 30.54 ميكروغرام / مل و 42.04 ميكروغرام / مل على التوالي. وأظهرت الدراسة في الجسم الحي أن B(a)P عند 100 مغ / كغ جرعة واحدة داخل الصفاق (IP) أظهر تسمم كبدي حاد بعد 48 ساعة من العلاج. أدى هذا إلى انخفاض كبير في وزن جسم الفأر ومستويات الجلوتاثيون (GSH) وزيادة في بيروكسيد الدهون (MDA) وأنظمة الدفاع المضادة للأكسدة (SOD) و (CAT). منعت المعالجة المسبقة بالبروبوليس بمعدل 25 مغ / كغ / يوم لمدة 5 أيام هذه السمية من خلال خفض مستويات MDA من ناحية، وزيادة مستويات هرمون GSH ونشاط SOD و CAT من ناحية أخرى. أكدت الدراسة النسيجية سمية B(a)P والتأثير الوقائي للبروبوليس علي الكبد. لذلك توصي هذه النتائج بفائدة البروبوليس لتخفيف الاضرار الكبدية للبنزو(أ)بيرين.

الكلمات المفتاحية: بنزو (أ) بيرين ، سمية الكبد ، الإجهاد التأكسدي ، دنج ، التأثير الوقائي.