

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى -جيجل-

Université Mohamed Seddik Ben Yahya -Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et
de la Vie

Département de Biologie Moléculaire
et Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du Diplôme : Master Académique en Biologie
Option : Sciences Pharmacologiques

Thème

**Evaluation de l'effet de la
propolis d'Algérie sur le stress
oxydatif pulmonaire aigüe induit
par le benzopyrène.**

Membres du Jury :

- Présidente :Dr LARICHE Nesrine.
- Examinatrice:Dr BENGUEDOUAR Lamia
- Encadreur :Pr. LAHOUEL Mesbah.

Elaboré et soutenu par :

- HOUMACHE Sabrina
- SADOUD Wahiba
- YOUNSI Samira

Année universitaire : 2018/2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous avoir permis d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nos premiers remerciements vont à notre directeur de mémoire monsieur **LAHOUEL Mesbah** professeur à la Faculté de sciences de la nature et de la vie de l'université Mohamed Seddik Ben Yahia de Jijel, directeur et chercheur du Laboratoire de Toxicologie Moléculaire qui nous a permis d'effectuer nos travaux au sein du laboratoire pour son soutien moral et ses conseils. Nous lui exprimons notre profond respect et nos chaleureux remerciements.*

*Nous tenons particulièrement à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail : **Dr LARICHE Nesrine** docteur en biochimie et biologie moléculaire et **Dr BENGUEDOUAR Lamia** chercheuse associée au Laboratoire de Toxicologie Moléculaire. Et aussi pour leurs aides à la réalisation de ce travail, leurs gentillesse, et précieux conseils, aussi pour leurs compétences techniques.*

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

Enfin nous remercions toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.



Dédicace

*C'est avec un très grand honneur que je dédie
ce modeste travail à :*

*A mes chers parents Sadoud Smaïl et Rezzaï
Samia pour leurs soutiens et leurs
encouragements tout au long de ma vie Pour
vos mains qui ont tant travaillé , Aucune
dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer
réellement mon profond amour, mon respect et
ma vive gratitude. Que Dieu vous garde .*

A mes chers frères et mes chères sœurs.

A toute ma famille.

A tous mes collègues et mes amies et surtout

Mon trinôme d'étude Sabrina et Samira.

*A tous ceux qui me connaissent de près ou de
loin.*

SADOUD

Dédicace

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail :

*A mes chers parents ma mère « Zakia » et mon père
« Mohammed » le premier et le dernier homme de
ma vie, pour leur patience, leur amour, leur soutien
et leurs encouragements.*

*A mes frères, A mes sœurs et à ma très cher
cousine « Basma ».*

*A mes amies « Hiba, Sabrina, Saïda » Merci pour les
très bons moments qu'on avait partagé ensemble.*

*Sans oublier tous les professeurs que ce soit du
primaire, du moyen, du secondaire ou de
l'enseignement supérieur surtout professeur
« LAHOUEL Mesbah ».*

YOUNSI



Dédicace

*D'un profond amour et d'une immense gratitude
je dédie ce travail aux deux personnes qui me
sont les plus chères, mes parents HOUMACHE
Saïd et BOULAHIA Fatíha pour leur amour,
leur patience et encouragements qu'ils m'ont
offert durant toute ma vie.*

*A mes chers frères et mes chères sœurs qui sont
ma source de fierté et soutien*

*A mes enfants : Abdraouf, Islem, Hiba,
Maysoune, Alaaeddine, Adem, Anfel*

A toute ma famille.

*A mes meilleures amies, copines et sœurs Zeyneb
et Nesrine et ma collègue Hiba*

HOUMACHE

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Tableau des abréviations

INTRODUCTION GENERALE	01
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1. Le poumon	05
I.1.1. Anatomie macroscopique des poumons	05
I.1.2. aspects des pathologies pulmonaires	07
I.2. Le stress oxydatif pulmonaire chimio-induit par le benzopyrène.....	10
I.2.1. La structure et la pharmacocinétique et dynamique de benzopyrène	10
I.2.2. Pharmacocinétique et dynamique de benzopyrène.....	12
I.2.2.1. Absorption, Distribution et excrétion	12
I.2.2.2. Métabolisme	12
I.2.2.3. La toxicodynamie du benzopyrène	13
I.2.3. Toxicité de benzo(a)pyrène.....	14
I.3. Les dommages de stress oxydatif résultent de l'exposition au benzopyrène.....	15
I.4. La propolis, un traitement antioxydant et anticancéreux.....	17
I.4.1. Propriétés physicochimiques de la propolis	18
I.4.2. La composition de la propolis.....	18
I.4.3. Effets thérapeutiques de la propolis.....	20
II. MATERIEL ET METHODE	22
II.1. Récolte de la propolis	23
II.1.1. Préparation de l'extrait brut éthanolique de propolis.....	23
II.1.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de la propolis.....	23
II.2. Traitement des Animaux	24
II.2.2. Traitement et sacrifice des animaux	24
II.2.2. 1. Traitement des animaux par la propolis	24
II.2.2.2. Induction de la toxicité aigüe par le benzopyrène.....	25

II.2.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du poumon.....	25
II.2.3. Extraction de la fraction cytosolique	25
II.3. Dosage cytosolique des paramètres du stress	26
II.3.1. Mesure du MDA cytosolique	26
II.3.2. Mesure du glutathion cytosolique	28
II.3.3. Evaluation de l'activité enzymatique de la Superoxyde Dismutase (SOD).....	29
II.4. Examen histologique du tissu pulmonaire	29
II.5. Analyse statistique	30
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	32
III.1. Les concentrations en polyphénols totaux et en flavonoïdes de la propolis	33
III.1.1. Résultats de dosage des poly phénols totaux	33
III.1.2. Résultats de dosage des flavonoïdes totaux	34
III.1.3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans la propolis	35
III.2. Effet de la propolis sur le poids des animaux et des poumons.....	36
III.3. Effet du benzopyrène sur le statut oxydatif de la cellule pulmonaire.....	38
III.4. Effet antioxydant de l'extrait de propolis	39
III.5. Modifications histologiques pulmonaires induites par le benzopyrène et l'effet protecteur de la propolis.....	42
CONCLUSION	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	47

Annexe

Liste des figures

<i>Figure 1 : Anatomie générale des poumons.....</i>	<i>05</i>
<i>Figure 2 : Pleurées pariétales et viscérales des poumons.....</i>	<i>07</i>
<i>Figure3 : Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse broncho-pulmonaire.....</i>	<i>10</i>
<i>Figure 4 : Formule chimique du benzopyrène.....</i>	<i>11</i>
<i>Figure 5 : Voie d'activation du B(a)P en diol-époxydes.....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 6 : Voies génomique et non génomique de l'activation du récepteur AhR par le benzopyrène.....</i>	<i>14</i>
<i>Figure 7 : Principe du dosage de malondialdéhyde.....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 8 : principe du dosage du GSH.....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 9 : la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 10 : la courbe d'étalonnage de quercétine.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 11 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de la propolis.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure12 : Variation des concentrations du MDA dans les différents groupes traités.....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 13: Variation des concentrations du GSH dans les différents groupes traités.....</i>	<i>40</i>
<i>Figure 14: Variation des concentrations de la SOD dans les différents</i>	

groupes traités 41

Figure 15 : Études histologique de coupes de poumon vues au microscope

Optique..... 43

Liste des tableaux

<i>Tableau 1. Composition chimique de la propolis brute</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 2 : Densités optiques (DO) de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....</i>	<i>33</i>
<i>Tableau3 : Densités optiques (DO) de la courbe d'étalonnage de la quercétine</i>	<i>34</i>
<i>Tableau 04 : L'effet de l'extrait éthanolique de propolis sur les variations des poids des poumons et sur le poids corporel.....</i>	<i>36</i>

Tableau des abréviations

ADNc	ADN cellulaire
AG	Acide gallique
AhR	Aryle hydrocarbure Receptor
ARNT	Aryle hydrocarbon nucléaire translocateur
B(a)P	Benzo(a)pyrène
BPDE	B(a)P 7,8-diol-9,10-époxyde
DMH	Diméthylhydrazin
EEP	Extrait ethanolique de la propolis
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GSH	Glutathion
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
IP	Intra-péritonéale
MDA	Malondialdehyde
DTNB	Dithiobis nitrobenzoic acid
QR	Quercétine
Rb	Retinoblastoma
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Thiobarbiturique acid
TEP	Tétra Ethoxy Propane
TNB	Thionitrobenzoïque
TNF	Tumor Necrosis Factor

TBARS	Thiobarbiturique acid reactive substances
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XRE	Xenobiotic Responsive Element

Introduction

Les maladies respiratoires sont des troubles hétérogènes qui affectent les voies respiratoires et les autres structures pulmonaires comme les voies ériennes, les bronches et les poumons (Beckett., 2000) ; à cause de divers produits contaminants et des matières polluantes. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) tels que le benzo [a] pyrène sont des contaminants environnementaux répandus formés lors de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matières organiques (Baan et al., 2009) ; particulièrement, le benzo (a) pyrène (B (a) P a été largement étudié en raison de son aptitude à induire un pouvoir cancérrogène et mutagène chez l'homme et l'animal (Kamaraj et al., 2009 ; Kasala et al., 2015).

Cependant, le benzo (a) pyrène, doit être activé métaboliquement sur le métabolite B (a) P-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) avant d'exercer ses effets toxiques. En produisant des espèces réactives de l'oxygène (EOR) (Briede et al., 2004). L'augmentation de la production des EOR et la diminution de l'efficacité des mécanismes de défense antioxydants conduisent à des dommages aux protéines, aux lipides et à l'ADN (Udensi et Tchounwou., 2016) conduit à initie la synthèse de médiateurs de l'inflammation pulmonaire dans les cellules épithéliales du poumon et l'initiation de mécanismes de cancérogénèse . Plusieurs études épidémiologiques ont montré que l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) peut augmenter le risque de cancers multiples, tels que ceux du poumon (Kamaraj et al., 2009 ; Kasala et al., 2015).

Par conséquent, il est nécessaire de développer des traitements curatifs ou préventifs plus efficaces avec peu d'effets secondaires pour réduire de manière significative la mortalité par cancer du poumon. Plusieurs études ont montré l'efficacité de différents produits naturels pour le traitement du cancer du poumon, tels que l'utilisation de la propolis, car leur potentiel thérapeutique pour traiter plusieurs maladies est bien démontré (Banskota et al., 2001).

Des études épidémiologiques et précliniques ont suggéré que les polyphénols et les flavonoïdes de la propolis possèdent des effets antitumoraux et chimio-préventifs directs. Cela a accentué les stratégies de prévention du cancer dans lesquelles la propolis était utilisée comme complément alimentaire (Seydi et al., 2016). Notre travail de recherche s'inscrit dans cette optique et a pour objectifs :

- 1) Evaluer l'effet du stress oxydatif au cours d'une toxicité aiguë pulmonaire comme un stade initiale de cancer de poumon, Ceci a été réalisé par une étude expérimentale in vivo sur des souris Albinos ; induit par le benzo(a)pyrène ; A une concentration élevée, elle produit des dégâts aux macromolécules comme les protéines, les lipides et l'ADN. Les dommages oxydatifs de l'ADN constituent un évènement précoce de la carcinogénèse. La toxicité aigue liée à l'augmentation des EOR et la diminution de la consommation des antioxydants et qui termine par l'initiation et la progression du cancer pulmonaire à long terme.
- 2) Etudier l'effet de la propolis sur le stress pulmonaire : Dans notre étude, nous avons utilisé la propolis de Jijel en administrant oralement de la propolis aux souris Albinos comme un prétraitement contre une toxicité aiguë induite par le B(a)P et d'évaluer les paramètres du stress oxydatif. Les taux du MDA et du glutathion cytosolique (GSH) ainsi que l'activité d'une enzyme antioxydante qui est la superoxyde dismutase (SOD) Sont mesurés par la suite.
- 3) Déterminer les modifications morphologiques dans les cellules des animaux traités par le benzopyrène et par la propolis par rapport au témoin en réalisant des coupes histologiques des tissus pulmonaires.

**Syntése
bibliographique**

Rappels anatomiques et pathologiques

Le système respiratoire peut être divisé en deux parties. Les voies aériennes supérieures comptant la bouche, la cavité nasale, le pharynx et le Larynx. Les voies aériennes inférieures: la trachée, les deux bronches souches, leurs branches et les poumons. Les voies inférieures sont également appelées partie thoracique du système respiratoire, parce qu'elles sont enfermées dans le thorax. Les poumons constituent la majeure partie de l'appareil respiratoire.

I.1. Le poumon

I.1.1. Anatomie macroscopique des poumons

Les poumons sont des organes appariés en forme de pyramide qui sont reliés à la trachée par les bronches droite et gauche. Sur la face inférieure, les poumons sont bordés par le diaphragme. Le diaphragme est le muscle plat en forme de dôme situé à la base des poumons et de la cavité thoracique. Les poumons sont entourés par la plèvre, qui est attachée au médiastin. Le poumon droit est plus court et plus large que le poumon gauche et le poumon gauche occupe un volume plus petit que le poumon droit. L'entaille cardiaque est une empreinte à la surface du poumon gauche et laisse de la place pour le cœur (Figure 1) (Bommas-Ebert., 2008).

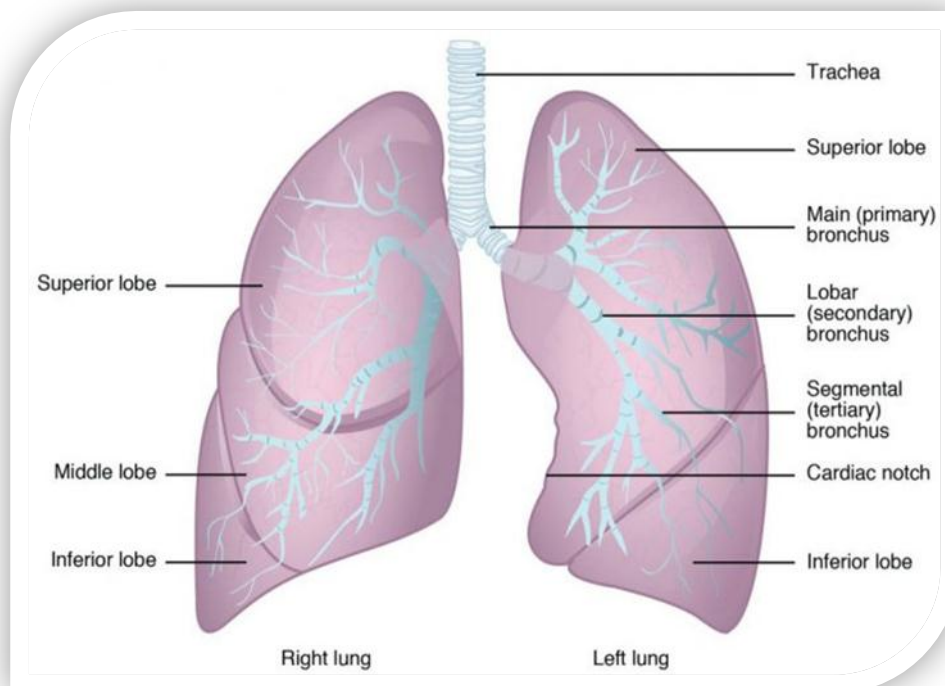


Figure 1. Anatomie générale des poumons (Bommas-Ebert., 2008).

Chaque poumon est composé d'unités plus petites appelées lobes. Les fissures séparent ces lobes les uns des autres. Le poumon droit est constitué de trois lobes: le lobe supérieur, le lobe moyen et le lobe inférieur. Le poumon gauche est constitué de deux lobes: les lobes supérieur et inférieur. Un segment broncho-pulmonaire est une division d'un lobe, et chaque lobe abrite plusieurs segments broncho-pulmonaires. Chaque segment reçoit l'air de sa propre bronche tertiaire et est alimenté en sang par sa propre artère. Certaines maladies des poumons touchent généralement un ou plusieurs segments broncho-pulmonaires et, dans certains cas, les segments malades peuvent être retirés chirurgicalement sans que les segments voisins soient peu influencés. Un lobule pulmonaire est une subdivision formée comme une branche de bronches en bronchioles. Chaque lobule reçoit sa propre grande bronchiole à plusieurs branches. Un septum interlobulaire est une paroi composée de tissu conjonctif qui sépare les lobules les uns des autres (Bommas-Ebert., 2008).

A. La trachée

Un tube, de 10 à 12 cm de longueur, semi-flexible maintenu ouvert par 15 à 20 anneaux cartilagineux situé entre le larynx et les bronches. Au niveau de la bifurcation trachéale, qui correspond à la hauteur de la 4^e/5^e vertèbre thoracique, la trachée se partage en bronches principales: la bronche principale droite et la bronche principale gauche; Comme la trachée, les bronches sont des tubes semi rigides contenant du cartilage (Silverthorn., 2007).

B. Les alvéoles pulmonaires

Sites des échanges gazeux, forment des grappes aux extrémités des bronchioles, représentent la plus grande partie du tissu pulmonaire. Chacun des fins alvéoles se compose d'une seule couche d'épithélium. On trouve deux types de cellules épithéliales dans les alvéoles en nombre à peu près égal, les plus petites mais les plus épaisses sont les cellules alvéolaires de type II; elles synthétisent et sécrètent une substance chimique appelée surfactant. Le surfactant, se mélange à la fine couche de liquide de l'alvéole pour aider le poumon à se dilater pendant l'inspiration (Silverthorn., 2007).

C. Plèvre des poumons

Chaque poumon est entouré par une membrane protectrice, la plèvre, formée par deux Feuillet membranaires dont la face extérieure est tapissée par le feuillet viscéral et la face intérieure par le feuillet pariétal (McKinley et al., 2014). La plèvre est une membrane séreuse qui entoure le poumon. Les pleures droite et gauche, qui entourent respectivement les poumons droit et gauche, sont séparées par le médiastin. La plèvre est constituée de deux couches. La plèvre

viscérale est la couche superficielle des poumons, qui s'étend dans les fissures des poumons et les recouvre (Figure 2). En revanche, la plèvre pariétale est la couche externe qui se connecte à la paroi thoracique, au médiastin et au diaphragme. Les plèvres viscérales et pariétales se rejoignent au niveau du hile. La cavité pleurale est l'espace entre les couches viscérale et pariétale (Silverthorn., 2007).

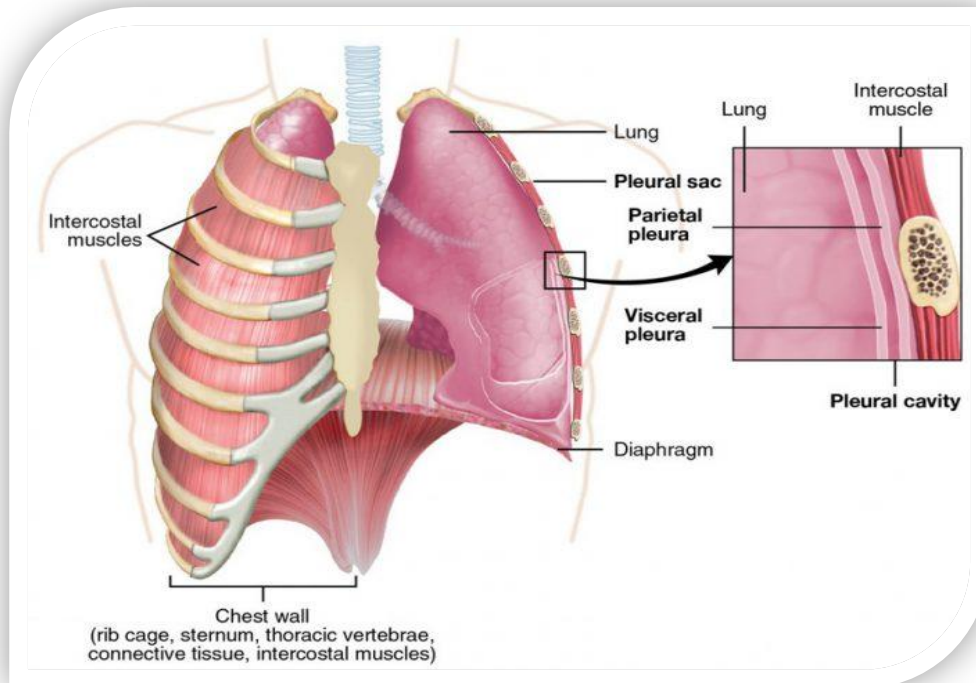


Figure 2. Pleurées pariétales et viscérales des poumons (Silverthorn., 2007).

I.1.2.Aspects des pathologies pulmonaires

Les maladies respiratoires chroniques sont des troubles hétérogènes qui affectent les voies respiratoires et les autres structures pulmonaires comme les voies aériennes, les bronches et les poumons (WHO., 2007), elles englobent communément la bronchite chronique, l'emphysème, l'asthme, les maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et l'obstruction chronique des voies aériennes non classée (Wang et al., 2007).

➤ Le terme « maladie pulmonaire obstructive chronique » (MPOC) désigne un groupe d'affections chroniques caractérisées par une obstruction des voies aériennes partiellement réversible et des symptômes respiratoires ; La limitation des voies respiratoires est

habituellement progressive et associée à une réponse inflammatoire anormale des poumons à des particules ou gaz nocifs (CDC, 2002; ASPC, 2007; GOLD, 2009); Les deux maladies pulmonaires obstructives les plus répandues sont l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO); L'asthme touche essentiellement l'enfant et le jeune adulte et est principalement d'origine allergique; est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une obstruction épisodique et réversible des voies aériennes et une hyperréactivité bronchique. Les manifestations cliniques incluent la respiration sifflante, la toux, la gêne respiratoire et l'oppression thoracique (CDC, 2007; ASPC, 2007; GINA, 2009) et la BPCO est également caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif des bronches mais qui est irréversible majoritairement causé par le tabagisme et survient après 40 ans (Seferian et Simonneau., 2014)

➤ Les poumons sont fortement touchés par des maladies hyper prolifératives au niveau de la circulation : l'hypertension artérielle pulmonaire, caractérisée par un remodelage vasculaire pulmonaire important causé par une prolifération anormalement élevée des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales vasculaires (Lin et Karin., 2007); on se trouve les pathologies aussi touchant le poumon, les infections pulmonaires causées par divers virus ou bactéries qui activés le processus d'inflammation est provoquée par des cellules présentes dans la zone endommagée, comme les plaquettes dans un caillot sanguin, qui sécrètent des facteurs inflammatoires comme le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor : Facteur de croissance plaquettaire) (Wang et Karin., 2015).

➤ Il existe une foule de preuves montrant que chronique l'inflammation peut favoriser le développement du cancer et l'inflammation induite par la tumeur crée une «boule de neige» effet, perpétuant la progression de la tumeur(Wang et Goldenring., 2002). On estime que 20% des cancers sont provoqués par inflammation chronique ou infections persistantes(Watanabe et al.,2012); Les cytokines et les cellules inflammatoires sont impliquées dans tumoregénèse et progression tumorale dans la plupart des sites; Le cancer du poumon évolue à la suite d'une série d'événements mutationnels qui ont été étudiés en détail par de nombreux enquêteurs. Les tumeurs qui se produisent sur les sites de chronique l'inflammation présente une 'inflammation couvant', caractérisée par la présence d'Infiltration de leucocytes, cytokines, chimiokines, facteurs de croissance et enzymes dégradant la matrice (Roche et al., 2006).

Donc les relations entre inflammation et cancer bronchique ont fait l'objet d'une séance thématique très intéressante. Les cellules épithéliales bronchiques sont exposées à des irritants et des agents pathogènes. Une agression chronique et des cycles répétés de réparation tissulaire peuvent induire un cancer. Des événements tels que la production de radicaux oxygénés, l'activation de facteurs de croissance impliqués dans la réparation, l'altération des processus d'activation de la prolifération cellulaire, sont considérés comme des facteurs de risque de cancer (Roche et al., 2006).

➤ Le cancer du poumon, connu aussi sous le nom de cancer broncho-pulmonaire ou

carcinome pulmonaire est un type de tumeur maligne du tissu pulmonaire (Yang et al., 2016), considéré comme l'une des maladies les plus importantes en médecine respiratoire (Silva et al., 2007) ; représente le deuxième cancer le plus fréquent chez les hommes (après le cancer de la prostate) et le troisième plus fréquent chez les femmes (après le cancer du sein et celui colorectal) (Ferlay et al., 2013). Les taux d'incidence du cancer du poumon sont plus élevés dans les pays développés que dans ceux les moins avancés ; ces variations reflètent largement les différences dans le stade et le grade de l'épidémie de tabac (Torre et al., 2015).

Il se développe selon un processus multi étapes, caractérisé par une progression vers le phénotype invasif d'une ou d'un petit nombre de cellules initiées par l'acquisition d'altérations génétiques leur conférant un avantage prolifératif (Hanahan et Weinberg., 2000).

De nombreux agents cancérigènes professionnels ou environnementaux, comme ceux présents dans la fumée du tabac, peuvent induire l'initiation des cellules bronchiques ou alvéolaires et favoriser leur progression. Ces agents affectent souvent l'arbre broncho-pulmonaire dans son ensemble ainsi que, dans le cas de la fume du tabac, l'ensemble des voies aéro-digestives supérieures. (Yokota et Kohno., 2004)

Comme dans la plupart des cancers, les carcinomes broncho-pulmonaires acquièrent au cours de leur développement une variété d'altérations génétiques (mutations, amplifications géniques, pertes d'allèles, instabilités chromosomiques) et épi génétiques (surexpression des gènes, extinction de l'expression par hyperméthylation des promoteurs) (Yokota et Kohno., 2004). Cependant, quel que soit le type histologique, les mêmes voies sont souvent affectées par des mécanismes différents. On peut donc proposer que ces voies jouent un rôle fondamental dans la morphogenèse, les réponses au stress et la régénération après lésion de l'épithélium broncho-

pulmonaire normal, définissant un carrefour régulateur qui intègre la prolifération, l'apoptose, la différenciation et les réponses aux lésions de l'ADN (figure 1) ;

Les principaux composants des voies de signalisation altérées dans les carcinomes broncho-pulmonaires sont représentés ; Ces facteurs coopèrent les uns avec les autres pour réguler quatre grands processus biologiques : la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation, et la réponse aux mutagènes (Torre et al., 2015).

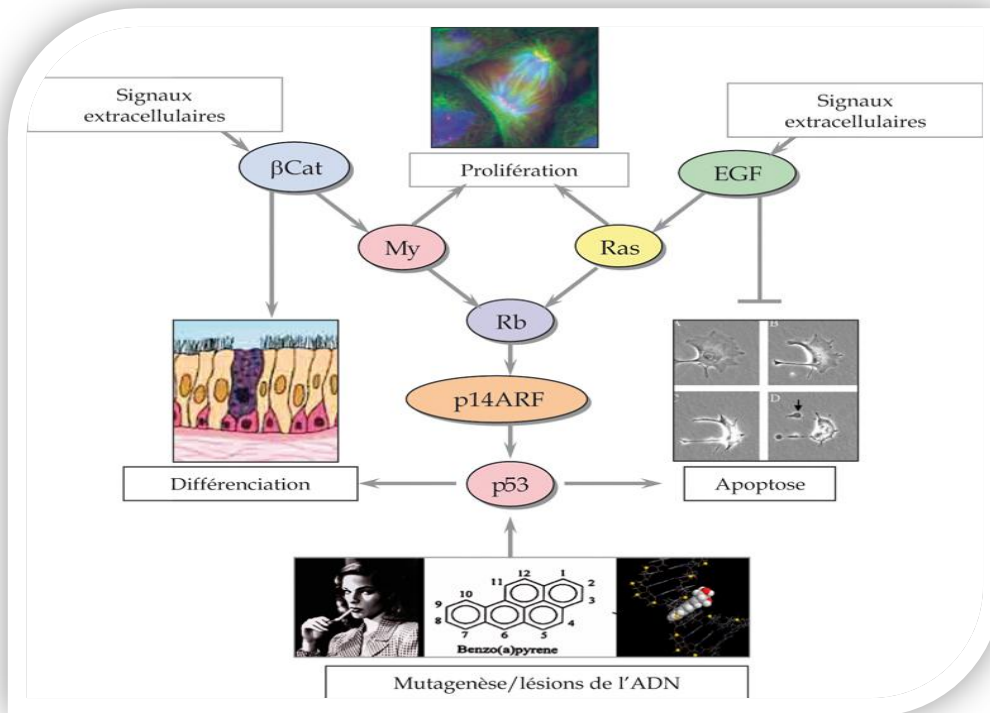


Figure 3. Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse broncho-pulmonaire (Torre et al., 2015)

I.2. Le stress oxydatif chimio-induit par le benzopyrène

I.2.1. La structure et la pharmacocinétique et dynamique de benzopyrène

Le benzo [a] pyrène (BP), est l'agent cancérogène le plus étudié et est le plus prédominant d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans la fumée de cigarette et les polluants atmosphériques (Kroum et al., 2002), qui a été classés comme carcinogène par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) (Hecht., 1999).

Le benzo [a] pyrène et les autres hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants environnementaux répandus formés lors de la combustion incomplète ou de la

pyrolyse de matières organiques. Ces substances se trouvent dans l'air, l'eau, les sols et les sédiments, généralement à l'état de traces, sauf près de leurs sources. Les HAP sont présents dans certains aliments et dans quelques produits pharmaceutiques à base de goudron de houille appliqués sur la peau. La fumée de tabac contient de fortes concentrations de HAP (IARC., 2010). (Baan et al., 2009)

Il est constitué de cinq cycles benzéniques condensés Sa Formule moléculaire C₂₀H₁₂ avec un poids moléculaire de 252.32 g/mol, un point de fusion de 181,1°C et une densité de 1,351 g/cm³. C'est un solide cristallin jaune pâle avec une légère odeur aromatique. Il est relativement insoluble dans l'eau alors qu'il est très soluble dans les solvants organiques comme le benzène, toluène et le xylène, il a une faible volatilité

Il est considéré comme étant très réactive avec ces deux régions ou sites de réactions chimiques : la région k comprise entre le quatrième et cinquième carbone et la région bay comprise entre le neuvième et le douzième carbone. Le carbone 10 est considéré comme le centre actif (α -carbone) en tant que son emplacement se trouve dans la position benzylique à haute réactivité (Miller et Ramos., 2001).

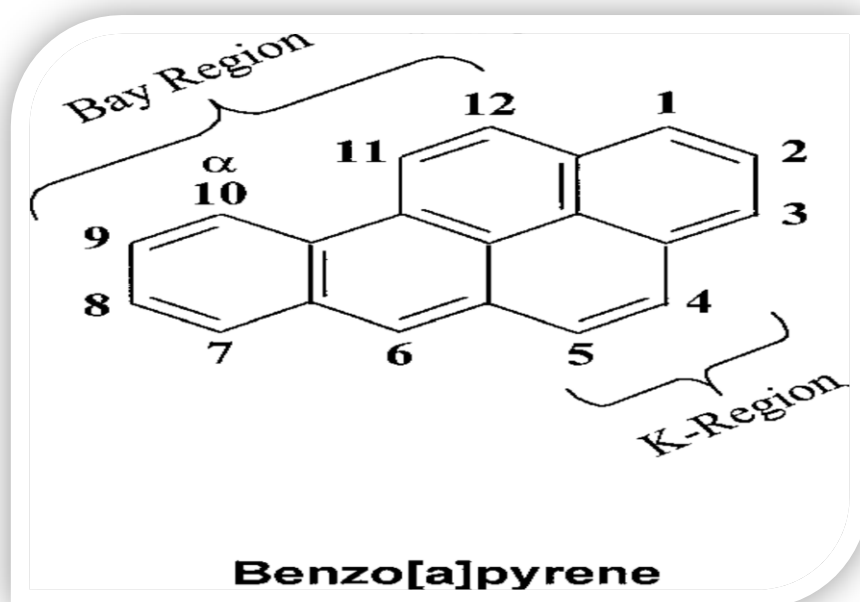


Figure 4. La formule chimique du benzopyrène (Miller et Ramos., 2001).

I.2.2. Pharmacocinétique et dynamique de benzopyrène

I.2.2.1 Absorption, Distribution et Excrétion

Le B(a)P est facilement absorbé dans l'organisme animal et humain suivant différentes voies d'exposition : l'inhalation, l'ingestion et le contact cutané. Les expérimentations animales montrent également que la vitesse d'absorption ainsi que la fraction absorbée du B(a)P dépendent du véhicule utilisé pour l'administration. Le B(a)P rejoint ensuite la circulation systémique où il est rapidement distribué dans les organes (Heredia., 2015).

Peu importe la voie d'administration, des niveaux détectables de B(a)P sont retrouvés dans tous les organes et tissus entre quelques minutes et l'heure suivant l'administration. Comme le B(a)P est une substance liposoluble, il est largement distribué dans les tissus adipeux et les glandes mammaires. Des quantités élevées de B(a)P ont été également trouvées dans le foie. La distribution importante du B(a)P dans le foie facilite la biotransformation par cet organe. Par ailleurs, il a été documenté que le B(a)P peut facilement traverser aussi la barrière placentaire chez le rat et la souris (Madhavan et Naidu., 2000).

Dans les études de Chipman et ses collaborateurs sur des rats ont démontré que l'excrétion biliaire était la principale voie d'élimination du B(a)P, indépendamment de la voie d'administration. Par pourcentage de 60% et une excrétion urinaire de 3% du B(a)P marqué au ^{14}C six heures après une administration intraveineuse (Chipman et al., 1982).

I.2.2.2. Métabolisme

Le B(a)P est principalement métabolisé par le foie, il peut être également biotransformé par d'autres tissus tels que la peau, les poumons et le tractus gastro-intestinal. Le benzo [a] pyrène est métabolisé par les enzymes de phase I et de phase II (Les CYP et les peroxydases) (Baan et al., 2009).

Dans une première étape (phase I) impliquant des processus oxydatifs et hydrolytiques, le B(a)P est activé par les cytochromes CYP1A1 et CYP1B1 (Kimetal., 1998) pour former une série d'oxydes d'arène, de dihydrodiols, de phénols et de quinones. En phase II, ces dérivés réactifs sont conjugués aux acides glucuroniques, aux sulfates et au glutathion pour leur élimination (EPA, 1990) (Heredia., 2015).

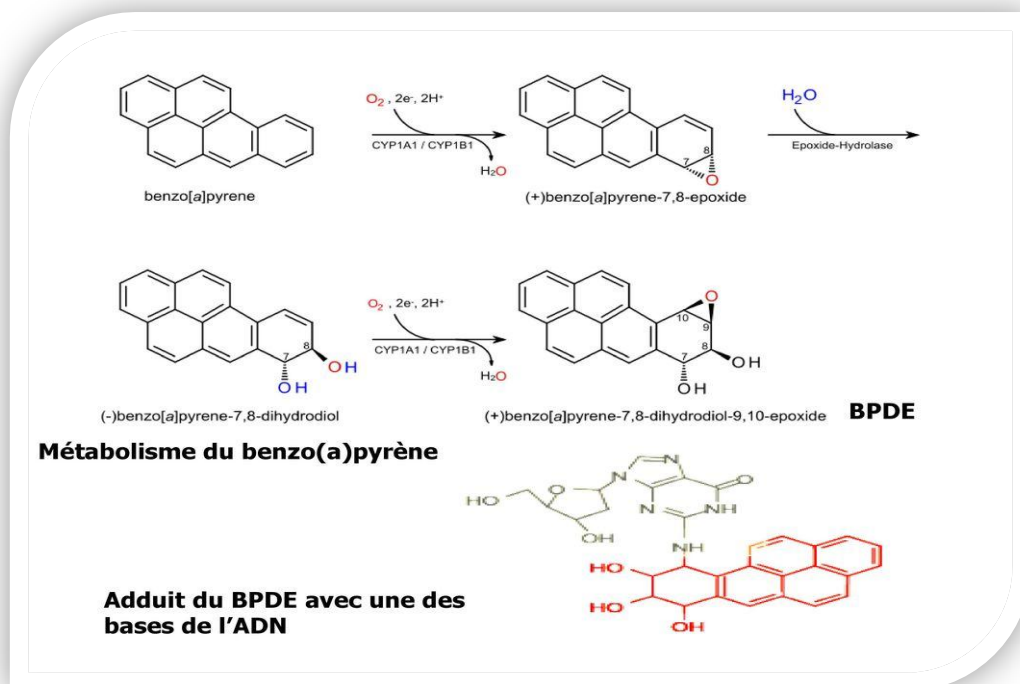


Figure 5. Voie d'activation du B(a)P en diol-époxydes (Trushin et al., 2012).

I.2.2.3. La toxicodynamie du benzopyrène

La toxicodynamie complexe de B(a)P est médiée par la voie du récepteur des hydrocarbures acryliques (AhR) qui est un facteur de transcription activé par un ligand cytosolique qui fonctionne en tant que capteur de signaux extracellulaires et de stress environnementaux affectant la croissance et le développement des cellules. L'AhR contrôle l'expression de gènes codant pour des enzymes métabolisant les xénobiotiques telles que les cytochromes P450 (CYP), l'UDP-glucuronosyltransférase UGT1A6, NAD(P)H : quinone oxydoréductase-1 (NQO1), aldéhyde déshydrogénase (ALDH3A) et -transférases (Hamouchene et al., 2011).

Lorsque le B(a)P entre dans la cellule en traversant la membrane plasmique, il se lie directement à son récepteur Ah (Aryle hydrocarbon) qui est un récepteur nucléaire (Billiard et al., 2002). Cette liaison va engendrer la dissociation de l'AhR des protéines chaperonnes du type HSP90 et l'induction de la translocation du complexe AhR-B(a)P dans le noyau, pour former un hétérodimère avec l'ARNT (aryle hydrocarbon nucléaire translocateur) (Kalabus et al., 2012). Ce dernier va se lier à l'XRE (élément de réponse aux xénobiotiques) dans les promoteurs de gènes cibles codant pour plusieurs enzymes des phases I et II de métabolisation (Hakura et al., 1998) y

compris l'induction d'enzymes du cytochrome (CYP 1A1) importantes pour la conversion du benzo [a] pyrène en métabolites réactifs, c'est la voie génomique classique (Vazquez-Gómez et al., 2018)

Ainsi qu'une voie non génomique par l'activation des kinases SRC et ERK 1/2. En conséquence, l'augmentation de la phosphorylation à la fois de Src et d'ERK 1/2 augmente l'induction de la protéine CYP1A1, la translocation nucléaire AhR et la production d'adduits B(a)P (Vazquez-Gómez et al., 2018)

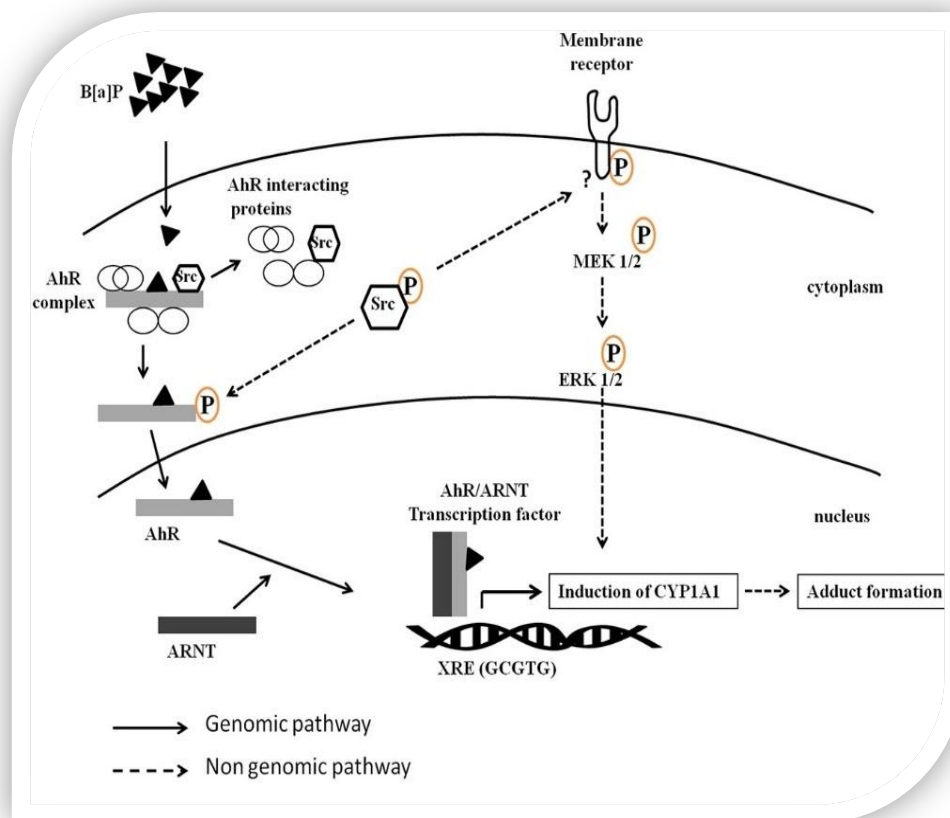


Figure 6. Voies génomique et non génomique de l'activation du récepteur AhR par le benzopyrène (Vazquez-Gómez et al., 2018).

I.2.3. Toxicité de benzo(a)pyrène

Le benzo [a] pyrène est répertorié en tant que substance dangereuse en vertu de la loi CERCLA de 1980 sur les mesures de protection de l'environnement, d'indemnisation et de responsabilité, et se

trouve dans 524 sites de stockage de déchets dangereux de la liste des priorités nationales (NPL). Le benzo [a] pyrène est également inscrit comme contaminant de l'eau potable 2. C'est également l'un des produits chimiques inclus dans le programme de produits chimiques persistants bio accumulatifs et toxiques de l'EPA (Ronald., 2000).

Le benzo [a] pyrène est un cancérigène qui provoque des tumeurs chez de nombreuses espèces animales : les tumeurs du poumon, du foie et de la peau chez les souris, les rats et les hamsters ; tumeurs de l'estomac antérieur chez la souris et le hamster ; et tumeurs des glandes mammaires chez le rat (IARC, 2010) (Baan et al., 2009).

Chez l'homme, l'exposition professionnelle à des mélanges contenant du benzo [a] pyrène a été associée à une série de cancers : il y a suffisamment de preuves scientifiques, à partir d'études chez les travailleurs, pour conclure que le risque de cancer du poumon, de la vessie et de la peau est augmenté lorsqu'on accroît l'exposition cumulative au B(a)P (Baan et al., 2009). 60% des cancers du poumon sont dus aux mutations causées par le B(a)P et autres HAP (Hecht., 1999).

Les connaissances actuelles sur les mécanismes sous-jacents à la cancérogenèse induite par le benzo [a] pyrène chez les animaux de laboratoire reposent presque uniquement sur deux voies complémentaires : celles des diol époxydes (ces métabolites) et des espèces réactives de l'oxygène (Baan et al., 2009).

I.3. Les dommages du stress oxydatif résultent de l'exposition au benzopyrène

L'initiation et la promotion du cancer pulmonaire provoqué par le B(a)P ont été liées à une série de voies biochimiques du stress oxydatif, des dommages oxydatifs de l'ADN, de la stimulation des macrophages, du raccourcissement des télomères, de la modulation de l'expression génique et de l'activation de facteurs de transcription jouant un rôle important dans la carcinogenèse (Valavanidis et al., 2013).

Au cours des dernières années, la corrélation entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), des dommages à l'ADN, la promotion de la tumeur et l'exposition au B(a)p a été de plus en plus évidente (Gadouche., 2010).

Les produits de la métabolisation du B(a)P se font par la voie de cytochromes et principalement par la voie de quinone lors du cycle redox de quinone, produisent facilement les ERO qui sont à des concentrations modérées, les radicaux libres oxygénés, ou plus généralement les espèces

réactives de l'oxygène (ROS), sont des produits du métabolisme cellulaire normal et la plupart de ces ROS physiologiques et bénéfiques (Brihoum et al. 2018); cependant, moins de 5% d'entre eux peuvent être toxiques pour la cellule si leur concentration augmente (Valavanidis et al., 2013).

A des concentrations plus élevées, les radicaux libres et les ROS sont dangereux pour les organismes vivants et peuvent causer des dommages oxydatifs à tous les composants cellulaires majeurs (lipides membranaires, protéines, enzymes, ADN). Nombre des réponses médiées par les ROS protègent les cellules contre le stress oxydatif et rétablissent « l'homéostasie du rédox ». Augmentation excessive ou soutenue de la production de ROS, qui, si elle n'est pas compensée par des enzymes antioxydantes et des défenses antioxydantes cellulaires non enzymatiques, initiant ainsi des dommages oxydatifs à l'ADN cellulaire (ADNc) et à l'ADN mitochondrial, peroxydation des lipides, oxydation protéique. Les conséquences biologiques sont les mutations, les aberrations chromosomiques, les échanges de chromatides sœurs, etc..., qui conduisent à l'activation de cascades de signalisation associées à une promotion et / ou une progression tumorale (Kim et Lee, 1997 ; Valavanidis et al. 2013).

➤ **Dommages oxydatifs à l'ADN :**

Les acides nucléiques sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux libres formés de la métabolisation du B(a)P.

Le OH• ainsi que d'autres comme O₂•⁻ sont impliqués dans les mécanismes d'oxydation des bases de l'ADN qui peut entraîner des mutations (Marnett., 2000).

➤ **Peroxydation lipidique :**

Parmi les composants cellulaires qui peuvent être une cible privilégiée des ROS outre l'ADN, sont les acides gras insaturés, qui constituent 30 à 50% des membranes cellulaires. Les sous-produits de la peroxydation lipidique comme les aldéhydes (le plus connu est le malondialdéhyde (MDA), F₂ iso propanes et le 4 hydroxynonéal sont utilisés en biologie clinique comme des marqueurs de cette peroxydation. Plusieurs études in vivo sur le cancer pulmonaire ont montré une lipoperoxydation hautement significative, soit cellulaire (Kamaraj et al., 2007) ou mitochondrial (Anandakumar et al., 2008) et qui peut être due à la production excessive des radicaux libres par la métabolisation du B(a)P (Brihoum et al., 2018).

➤ Oxydation protéique

Les protéines peuvent être la cible de l'électron non apparié des radicaux libres générés pendant la métabolisation de B(a)P dans le poumon, aboutissant à leur oxydation et donnant comme résultat une fragmentation, une formation de ponts entre protéines ou encore une dénaturation de ces derniers. (Brihoum et al., 2018).

L'une des réactions directes des RLO sur les protéines est l'introduction d'un groupe carbonyle dans ces dernières donnant lieu à des conséquences majeures tels que la perte de leur fonction catalytique et structurelle, un changement de leur stabilité thermique et une augmentation de la sensibilité aux protéases (dégradation protéolytique) (Stadtman et Levine., 2000).

I.4. La propolis, un traitement antioxydant et anticancéreux

Chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, immunothérapie et hormonothérapie substitutive sont les méthodes les plus utilisées pour traiter le cancer, bien qu'elles présentent également un certain nombre d'inconvénients, tels qu'une toxicité grave sur les cellules normales, son inefficacité et une pharmacorésistance progressive des cellules cancéreuses. De nouvelles stratégies sont donc nécessaires pour surmonter ces problèmes. Les composés naturels sont considérés comme une source importante de nouveaux médicaments anticancéreux en raison de leurs effets modulateurs sur l'apoptose et le cycle cellulaire des cellules cancéreuses et de leurs effets inoffensifs sur les cellules normales, Plus de 70% des produits de chimiothérapie sont obtenus directement ou à partir de produits naturels (Demir et al., 2016).

Plusieurs études ont montré l'efficacité de différents produits naturels pour le traitement du cancer du poumon, tels que l'utilisation de la propolis, car leur potentiel thérapeutique pour traiter plusieurs maladies est bien démontré (Banskota et al., 2001).

La propolis est un mélange résineux recueilli sur les arbres par l'abeille *Apis mellifera*, qui sert de matériau isolant pour la construction de la ruche ainsi que pour le maintenir en bonne santé. Il possède d'importantes propriétés pharmacologiques et peut être utilisé à diverses fins en tant qu'agent anti-inflammatoire et hypotenseur, stimulant du système immunitaire et agent bactériostatique et bactéricide, parmi de nombreuses autres utilisations. Toutes ces applications ont accru sa demande pharmaceutique et en ont fait un sujet d'étude intéressant (Lotfy, Mahmoud., 2006), mais l'application et l'utilisation thérapeutiques par l'industrie pharmaceutique sont encore

limitées. Ceci est principalement dû à la variabilité de ses propriétés chimiques (Daleprane et al., 2013).

De nos jours la propolis est largement utilisée comme composant dans les produits pharmaceutiques et cosmétiques à diverses formes posologiques telles que comprimés, gélules, dentifrice, solutions et préparations pour rince-bouche, crème et pommades et elle est également utilisée dans certains aliments et boissons (Silva-Carvalho et al., 2015).

I.4.1. Propriétés physicochimiques de la propolis

La propolis est une substance de consistance solide qui devient friable en dessous de 15°C. Elle deviendra gluante à température élevée entre 30° et 60°C, elle a un goût typique pimenté et brûlant, sa palette de couleur est voisine de celle du miel et du pollen, du jaune au noir en passant par l'orange ; ces multiples teintes s'expliquent par les nombreux pigments qui entrent dans sa composition (Papachroni et al., 2015). Elles sont variables selon sa provenance (situation géographique)

La propolis est insoluble dans l'eau froide et soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme etc. Sa densité est de 1.2 et son point de fusion se situe autour de 70°C, chauffée au bain-marie, elle se divise en une partie visqueuse et un autre liquide c'est la cire de propolis (Mecellem., 2017).

Elle a une odeur spécifique et variable selon son origine botanique et selon l'origine de plusieurs molécules dont les aldéhydes aromatiques (vanilline et iso vanilline), les alcools et les cétones (Kolankaya et al., 2002 ; Kurek-Górecka et al., 2014) avec un goût âcre et pimenté.

I.4.2. La composition de la propolis

La composition chimique de la propolis est très complexe, elle est variable selon l'origine géographique, l'espèce d'abeille (Kurek-Górecka et al., 2014) ainsi que des arbres et des végétaux se trouvant dans son l'écosystème (Marcucci., 1995). Ces variations sont importantes mais de manière constante et relativement stable, elle contient de la résine végétale et le baume (50%), la cire (30%), les huiles essentielles aromatiques (10%), le pollen (5%) et matières diverses organiques et minérales (Cardinault., 2012).

À ce jour, les principaux composés chimiques présents dans la propolis sont les acides gras, les acides aliphatiques et aromatiques, les flavonoïdes, les alcools, les terpènes, les sucres et divers

types d'esters, notamment la chrysin, l'apigénine, l'acacétine, la galangine, le kaempférol, le kaempféride, la quercétine, l'acide cinnamique, l'acide o-coumarique, l'acide m-coumarique, l'acide p-coumarique et l'acide phénylique de l'acide caïque (CAPE) (Noureddine et al., 2017), la β – amylase (Kaczmarek et Debowski., 1983), de nombreux composés poly phénoliques, des flavones, des flavonones, de l'acide phénolique qui ont été identifiés comme propolistodés et des esters et les acides gras (Lotfy., 2006).

La propolis contient des minéraux tels que Mg, Ca, I, K, Na, Cu, Zn, Mn et Fe, ainsi que des vitamines telles que B1, B2, B6, C et E, ainsi qu'un certain nombre d'acides gras. En outre, il contient des enzymes telles que la déshydrogénase succinique, la glucose-6-phosphatase, l'adénosine triphosphate et la phosphatase acide (Lotfy., 2006).

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

Tableau 1 : Composition chimique de la propolis brute (Mecellem., 2017).

La propolis contient également des métabolites végétaux secondaires, mais ils ne sont pas les mêmes partout dans le monde (Cardinault., 2012).

L'hétérogénéité chimique de la propolis est donc facilement compréhensible puisqu'il s'agit d'un mélange complexe de composés dérivés de différentes plantes et traité par les enzymes salivaires des abeilles. Ainsi, la composition de la propolis dépend des plantes, de la saison de collecte et des espèces d'abeilles. Cette diversité chimique apporte une question cruciale sur la normalisation, même si les abeilles, elles même, ne changent pas leur composition chimique (Bankova et al., 2000).

I.4.3. Effets thérapeutiques de la propolis

Depuis une cinquantaine d'années, la littérature scientifique a rapporté et confirmé un bon nombre d'activités thérapeutiques de la propolis qui sont en rapport avec la composition chimique (Cardinault et al., 2012). Il a été démontré que Malgré l'existence de différents types de propolis dans le monde entier, elles ont des caractéristiques communes qui déterminent leurs effets thérapeutiques. La propolis et ses constituent ont un effet antibactérien, antiviraux, anti-inflammatoires, et antifongiques (Debab et al., 2016). La propolis est aussi une substance aux propriétés : immunomodulateurs (Villanueva., 2015), antihypertenseurs (Teles et al., 2015), cicatrisantes (Bolouri et al., 2015), antidiabétiques et antiprotozoaires (Wagh., 2013).

➤ Effet antioxydant

Il est bien établi que le métabolisme cellulaire génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont généralement détoxifiées par des enzymes intracellulaires, telles que le glutathion, la superoxyde dismutase et la catalase (Daleprane et al., 2013). La propolis est une substance constituée de nombreux composés antioxydants : vitamines E et C, des polyphénols, des flavonoïdes et de CAPE (Cardinault et al., 2012). De ce fait, la propolis de peupliers plus riche en polyphénols possède un potentiel antioxydant supérieur (Cardinault et al., 2012).

Les flavonoïdes dans cette antioxydante puissante peuvent agir contre l'oxydation selon deux mécanismes : soit en empêchent la formation ou piègent les ROS responsables de l'initiation de l'oxydation et dans ce cas-là les flavonoïdes sont dits préventifs (ou retardateurs), soit par l'interromptions de la phase de propagation de l'oxydation des radicaux, les flavonoïdes sont dits briseurs de chaîne (Brihoum et al., 2018).

L'ester phénéthylique de l'acide caféique (CAPE), a également été identifié comme l'un des principaux composés chimio préventifs et anti-inflammatoires du cancer dans la propolis, qui bloque la production de ROS dans plusieurs systèmes (Daleprane et al., 2013).

La capacité antioxydante est l'une des propriétés les plus importantes de la propolis. La propolis turque inhibe les dommages induits par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂-) dans l'ADN de fibroblastes en culture (Aliyazicioglu et al., 2012), ce qui peut être lié à son activité chimio-préventive. La propolis rouge de Cuba a montré des effets protecteurs dans les modèles de lésions

hépatiques induites par l'alcool, probablement en raison de ses propriétés antioxydantes (Remirez et al., 1997). L'apoptose des macrophages inhibée par Propolis via des effets sur le glutathion (GSH) (Claus et al., 2000 ; Pascual et al., 1994). De plus, la propolis brésilienne de *Baccharis dracunculifolia* a modulé les lésions de l'ADN induites par la 1,2-diméthylhydrazine (DMH) dans les cellules de colon (De Lima et al., 2005). Isla et al. (Isla et al., 2001) ont décrit l'effet protecteur de la propolis argentine provenant de différentes sources contre la modification par oxydation concédée de lipides dans du sérum non fractionné. La propolis chilienne possède également des propriétés antioxydantes, corrélées à sa composition chimique (Russo et al., 2004). La propolis rouge chinoise avait une activité antioxydante plus élevée que la propolis d'autres sources, ce qui était attribué principalement au CAPE (Izuta, et al., 2009).

Les différents types de propolis indiquant que les flavonoïdes peuvent éliminer les radicaux libres, tels que le superoxyde, protégeant les lipides sériques de l'oxydation (Daleprane et al., 2013).

➤ **Effet cytotoxique et anticancéreux**

Des activités anti carcinogènes des composés polyphénoliques de la propolis ont été signalé dans de nombreux travaux scientifiques réalisés sur des modèles de tumeurs murines, et cela au cours de tous les stades de développement du cancer. Au stade avancé, les flavonoïdes ont montré une capacité de supprimer le processus tumoral en inhibant la synthèse de l'ADN, en inhibant l'angiogénèse et en induisant l'apoptose des cellules tumorales. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré la capacité de l'apigenin, kaempferol et la quercétine, a augmenté nettement l'apoptose en modulant l'expression et en renforçant l'activité apoptotique du « ligand induisant l'apoptose associée au facteur de nécrose de tumeurs » (TRAIL) contre les cellules du cancer qui sont résistantes à la cytotoxicité médiée par ce dernier. Il a été aussi montré que la propolis affecte les deux voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque et régule l'activité du facteur de transcription NF- κ B (Brihoum et al., 2018)

Matériels et méthodes

II.1. Récolte de la propolis

La propolis a été récoltée par la méthode des grilles en plastique des ruches de la coopérative apicole de la commune de Kaous (Jijel) entre le mois de juillet et octobre de l'année 2017 et 2018. Afin d'éviter la dégradation de ses composants, la propolis brute a été stocké au congélateur à -20°C à l'abri de la lumière.

II.1.1. Préparation de l'extrait brut éthanolique de propolis

100 grammes de propolis brute sont additionnés de 900 ml d'éthanol 80° et laissés à macération pendant 10 jours. La solution est ensuite filtrée et évaporée à 65°C . L'extrait résineux obtenu constitue l'extrait brut final. (Lahouel et al., 2016).

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

La propolis obtenue va subir plusieurs dilutions dans différents solvant selon chaque expérimentation pour l'évaluation in vitro de son activité antioxydante.

II.1.2. Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes de la propolis

A. Dosage des polyphénols totaux de la propolis

Principe

La teneur des polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif Folin-Ciocalteu, suivant la méthode de Singleton et Rossi (1965). 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.

Mode opératoire

Pour le dosage $500\mu\text{l}$ de l'extrait dilué au $1/100^{\text{ème}}$, sont ajouté à 2.25ml d'eau distillée et $250\mu\text{l}$ du réactif de Folin-Ciocalteu 5%. Après 5 mn de repos, 2ml de Na_2CO_3 7.5% (bicarbonate de sodium) ont été additionné puis le mélange est ensuite incubé pendant 60mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. Enfin la densité optique (DO) est lue à 760nm (Spectrophotomètre UV-Visible UV-mini 1240, SHIMADZU, China).

La teneur en composés phénoliques dans l'extrait est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique ($50\mu\text{g/ml}$, $12.5\mu\text{g/ml}$, $6.25\mu\text{g/ml}$, $3.125\mu\text{g/ml}$, 1.56

µg/ml, µg/ml, 0.78 µg/ml, 0.39 µg/ml, 0.2 µg/ml, 0.1 µg/ml, 0.005 µg/ml). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent d'acide gallique par gramme de propolis (Dewanto et al., 2002).

B. Dosage des flavonoïdes totaux de la propolis

Principe

Le dosage des flavonoïdes se fait par la méthode colorimétrique basée sur la formation d'un complexe jaune entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium Selon Dewanto et al., (2002).

Mode opératoire

250 µl de l'extrait dilué au 1/1000^{ème} sont mélangés avec 75µl de NaNO₂ (5%). Après un repos de 6mn, 150 µl d'AlCl₃ (2%) et 500 µl de NaOH (1M) sont ajoutés. Le volume est complété jusqu'à 3 ml d'eau distillée, ensuite la DO est lue à 510 nm.

La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en microgramme équivalent de quercétine par gramme de l'extrait, en utilisant une courbe d'étalonnage de la quercétine ;(200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25µg/ml, 12.5 µg/ml, 6.5 µg/ml, 3.25 µg/ml) (Miliauskas et al., 2004).

Tous les dosages sont réalisés en triplicate .

II.2. Traitement des Animaux

II.2.1. Entretien des animaux

16 souris Albinos de 22 à 30 g environ obtenus de l'institut Pasteur d'Alger sont placés dans des cages en plastiques à raison de 5 souris par cage avec un accès libre à l'aliment et à l'eau. L'hébergement des animaux se fait dans une animalerie maintenue à température ambiante (20° - 26°C), humidité relative : 55–60% et un cycle jour-nuit 12h-12h ; Les souris sont mises en quarantaine 7 jours avant leur utilisation.

II.2.2. Traitement et sacrifice des animaux

II.2.2. 1. Traitement des animaux par la propolis

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

II.2.2.2. Induction de la toxicité aigüe par le benzopyrène

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

Les animaux ont été répartis également en 4 lots comme suit :

Groupe 1 (Témoins (T)) : 03 souris, Chaque membre de ce groupe n'a reçu ni benzopyrène ni propolis

Groupe 2 (Benzo[a]pyrène (B)) : 03 souris recevant une seule injection de 0,2 ml de B(a)P d'une dose de 100 mg/kg dissout dans 1 ml de l'huile d'olive+1% de DMSO par voie IP.

Groupe 3 (Propolis + Benzo[a]pyrène (PB)) : 05 souris recevant de 0,4ml de la propolis à une dose de 25 mg/souris par voie orale quotidiennement pendant 5 jours et suivi par une injection intrapéritonéale unique du B(a)P 100 mg/kg administré au 6ème jour.

Groupe 4 (Propolis (P)) : 05 souris ont été soumis à la propolis dans une dose unique quotidienne de 25mg/ml sans benzopyrène par voie orale pendant 05 jours consécutifs.

II.2.2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du poumon

Après 48h de traitement de benzopyrène, les animaux sont sacrifiés, ensuite les poumons sont soigneusement prélevés, rincés dans une solution de chlorure de sodium, puis pesés. L'un est congelé à (-20 °C) pour les dosages tissulaires des paramètres de stress oxydatif (MDA, GSH, SOD) et l'autre est fixé dans la solution de formol tamponné 10% pour l'étude histologique.

II.2.3. Extraction de la fraction cytosolique

Selon la méthode décrit par (Iqbal et al., 2003), Pour cela, 0.5 g du poumon sont coupés et homogénéisés avec trois volumes de tampon phosphate (0,1 M à pH 7,4) contenant du KCl 1,17 % à l'aide du broyeur de DOUNCE, l'homogénat est centrifugé à 2000 tours pendant 15 min à 4°C pour éliminer les débris nucléaires ; le surnageant est ensuite centrifugé à 9 600 tour/min) pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant final est utilisé comme source d'enzymes cytosoliques (Brihoum et al., 2018).

➤ Dosage des protéines

Principe

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.

Mode opératoire

Pour le dosage 1ml de Bleu de Coomassie a été ajouté à 25 μ l 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. La concentration en protéines a été déterminée à partir d'une gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions avec de l'albumine sérique bovine (BSA) aux concentrations (0-1mg/ml).

II.3. Dosage cytosolique des paramètres du stress

II.3.1. Mesure du MDA cytosolique

Principe

La peroxydation lipidique dans le poumon est évaluée par la quantification du malondialdéhyde (MDA) qui est un produit métabolique résultant de l'attaque des lipides membranaires (acides gras polyinsaturés) par les radicaux libres. La détermination de la concentration du MDA au niveau de la fraction cytosolique est réalisée par la méthode Ohkawa et al.,(1979) en utilisant l'acide thiobarbiturique (TBA). En effet, la détection du MDA présent dans les échantillons biologiques se base sur la réaction au cours de laquelle, une molécule de MDA en milieu acide (pH 2 à 3) et chaud (100°C) est condensée avec deux molécules de TBA pour former un complexe coloré en rose (figure 7) susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde $\lambda = 532$ nm (Laguerre et al., 2007).

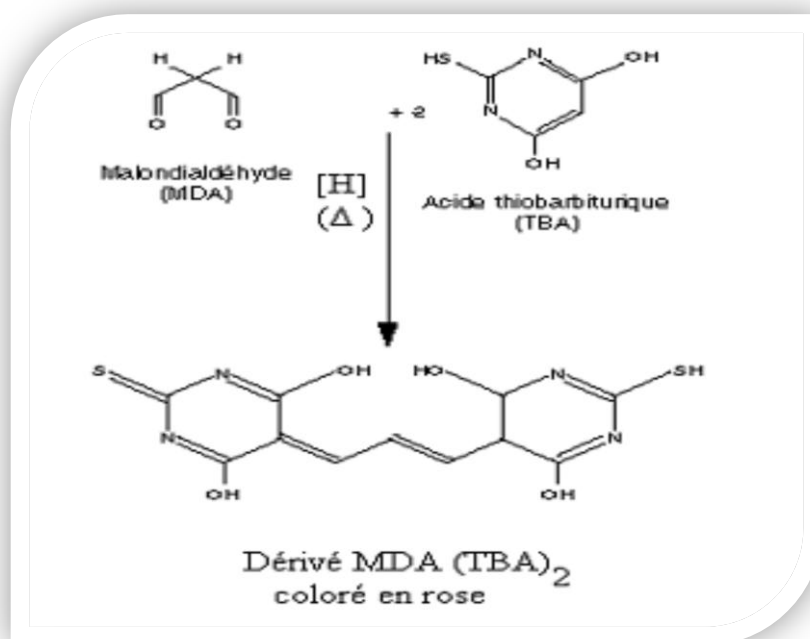


Figure 7 : Principe du dosage de malondialdéhyde (Laguerre et al., 2007).

Mode opératoire

A 0.25ml de la fraction cytosolique, nous avons additionné 0.25 ml d'acide trichloracétique (TCA20%) et 0.5 ml d'acide thiobarbiturique (TBA0.67%). Par la suite le mélange est placé dans le bain marie pour chauffage de 15 minute à 100°C, refroidi à l'eau de robinet pour stopper la réaction et additionné de 2 ml du n-butanol. Le tout est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 rpm.

Une fois la centrifugation terminée, le surnageant est récupéré pour la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 532 nm contre un blanc fait de 0,5 ml d'eau distillée traité de la même façon. Les absorbances ont été converties en équivalents du MDA en nmol/mg de protéines (Laguerre et al., 2007).

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

$$DO = \xi * L * c$$

ξ : coefficient d'extinction molaire du MDA ($1.53 * 100000 \text{ M /Cm}$)

L : longueur du trajet optique (1cm).

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

II.3.2. Mesure du glutathion cytosolique

Principe

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique décrite par Ellman (1959) pour évaluer le taux de glutathion réduit chez les souris, en utilisant le réactif DTNB (Acide 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman qui sera réduit par les groupes thiol (SH) pour donner l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque (TNB), produit de coloration jaune présentant une absorbance à une longueur d'onde de 412 nm (Sedlak et Rayond, 1967).

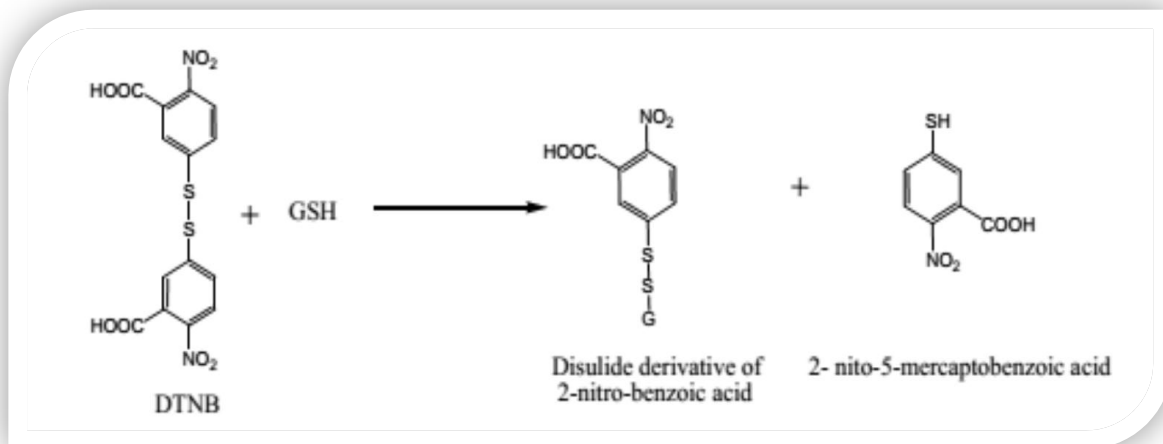


Figure 8 : principe du dosage du GSH (Sedlak et Rayond., 1967).

Mode opératoire

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

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

II.3.3. Evaluation de l'activité enzymatique antioxydante de la superoxyde dimutase (SOD)

Principe

Évaluation la quantité de la SOD selon la méthode décrite par Beauchamp and Fridovich (1971) par sa capacité à inhiber le flux d'anions superoxydes, produits suite à la photo réaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine, responsable de la réduction du nitroblue-tétrazolium (NBT) en bleu de formazan dont l'absorbance est quantifiée à 560 nm.

Mode opératoire

On prend 850ul de tampon Tris Hcl (50mM) et 100ul EDTA à (10Mm) à pH=8.2

Et on met ce mélange dans la cuve en verre , et on ajoute 15ul de la fraction cytosolique du poumon et 15ul du pyrogallol (15 mM), et le changement d'absorbance est suivi pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 420 nm et les valeurs de la SOD sont exprimées en UI/mg de protéines.

Le contrôle de la réaction a été préparé dans les mêmes conditions mais en absence de la source enzymatique.

Une unité d'activité de la SOD est définie en tant que la quantité d'enzymes requise pour empêcher 50 % de l'autoxydation du Pyrogallol.

$\% \text{ d'inhibition} = [(\Delta\text{Abs du contrôle} - \Delta\text{Abs de l'essai}) / \Delta\text{Abs du contrôle}] * 100$

$\text{SOD UI/mg de protéines} = \% \text{ d'inhibition} / n * 50$ (Kim et al., 1994 ;Arian et al., 2004).

II.4. Examen histologique du tissu pulmonaire

➤ Fixation et inclusion

Au moment du sacrifice des animaux, un petit morceau de poumon rincé de chaque lot est immédiatement fixé dans le formol pour permettre la conservation morphologique des structures tissulaires et cellulaires.

Pour la préparation des coupes histologiques, les Biopsies pulmonaires sont préalablement déshydratées en remplaçant par de la paraffine, mais ces milieux ne sont pas miscibles entre eux, on procède donc par passage de chaque prélèvement dans une série de bains d'alcool de xylène de concentration croissante : l'eau par un alcool (70°,95°,100°), l'alcool par un solvant organique (Toluène), Toluène par la paraffine

L'imprégnation des tissus dans la paraffine afin de le rigidifier pour pouvoir le couper ensuite, elle a été effectuée grâce à un distributeur automatique de paraffine (Shander Citadel., 2000, thermo scientific, Germany). Après refroidissement, on obtient un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse par un distributeur automatique de paraffine (Shandon Histocenter 3, Thermo electron corporation, Germany), son but est de permettre la réalisation des coupes fines et régulières. (Brihoum et al., 2018)

➤ **Coupes histologiques et étalement**

Les coupe des blocs de paraffine effectués au microtome nous a permis de réaliser des coupes fines de 4 à 6 microns d'épaisseur. Les coupes ainsi obtenues sont déposées et collées sur des lames en verre puis séchées pendant une nuit dans une étuve réglée à une température entre 35-42°C avant d'être déparaffinées.

➤ **Déparaffinage et réhydratation**

Les coupes histologiques sont déparaffinées au xylène et réhydratées afin de la colorer dans des bains d'alcools de concentration décroissantes (toluène, alcool 100°, 95°, 70°, eau). Pour permettre la mise en évidence des différentes structures tissulaire et cellulaire.

➤ **Coloration et montage des coupes**

Les coupes obtenues sont colorées par l'hématoxyline/éosine ; technique de coloration usuelle associant un colorant nucléaire hématoxyline et un colorant cytoplasmique éosine. Permet une coloration violet du noyau et rose du cytoplasme. Enfin l'examen au microscope optique permettant l'évaluation des changements pathologiques tissulaires du poumon.

II.5. Analyse statistique

Les résultats numériques et graphiques ont été représentés sous forme de moyennes \pm les écarts-types. La signification de la différence entre le groupe témoin et les autres groupes a été vérifiée en utilisant le test de Student. La valeur trouvée par le calcul du t peut confirmer que les populations sont différentes avec un risque d'erreur p tel que :

- ❖ $P > 0,05$ = la différence n'est pas significative ns.
- ❖ $0,05 > p > 0,01$ = la différence est significative *.
- ❖ $0,01 > p > 0,001$ = la différence est hautement significative **.
- ❖ $P < 0,001$ = la différence est très hautement significative ***.
- ❖ 1 (comparaison avec le témoin) et 2 (comparaison avec le traité par le B(a)p).

Résultats et discussion

III.1. Les concentrations en polyphénols totaux et en flavonoïdes de la propolis

III.1.1. Résultats de dosage des polyphénols totaux

L'étude quantitative d'extrait de la propolis au moyen du dosage par spectrométrie, avait pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et des flavonoïdes dans cet extrait. Deux courbes d'étalonnage ont été tracées ; la première réalisée avec de l'acide Gallique à différentes concentrations, l'autre avec la Quercétine ; les mesures de densité optique ont été réalisées à 776nm pour les polyphénols et à 510 nm pour les flavonoïdes.

Les quantités des polyphénols et des flavonoïdes correspondants ont été rapportées en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminées par deux équations linéaires de type : $Y = aX+b$

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

Après la préparation des solutions de différentes concentrations de l'acide gallique et préparation de la gamme d'étalonnage (répéter 3fois), nous avons obtenu les valeurs d'absorbances dans le tableau ci-dessous :

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

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

La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations utilisées (figure 9). L'équation de la courbe ($y = 0,0744x + 0,0043$) et le coefficient de corrélation ($R^2 = 0,9993$) ;

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

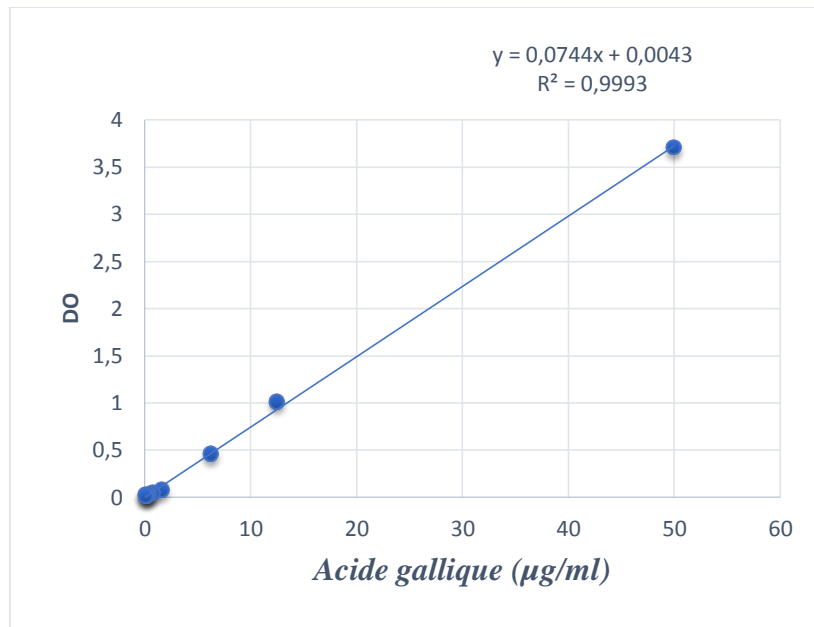


Figure 9 : la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

III.1.2. Résultats de dosage des flavonoïdes totaux

B- La courbe d'étalonnage de quercétine

Après la préparation des solutions de différente concentration de quercétine et préparation la gamme d'étalonnage (répéter 3fois) nous avons obtenu les valeurs d'absorbances dans le tableau ci-dessous:

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

Tableau 3: Densités optiques (DO) de la courbe d'étalonnage de la quercétine

La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations utilisées (**figure 10**).

L'équation de la courbe ($y = 0,0008x + 0,0088$) et le coefficient de corrélation ($R_2 = 95,71 \%$) ;

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

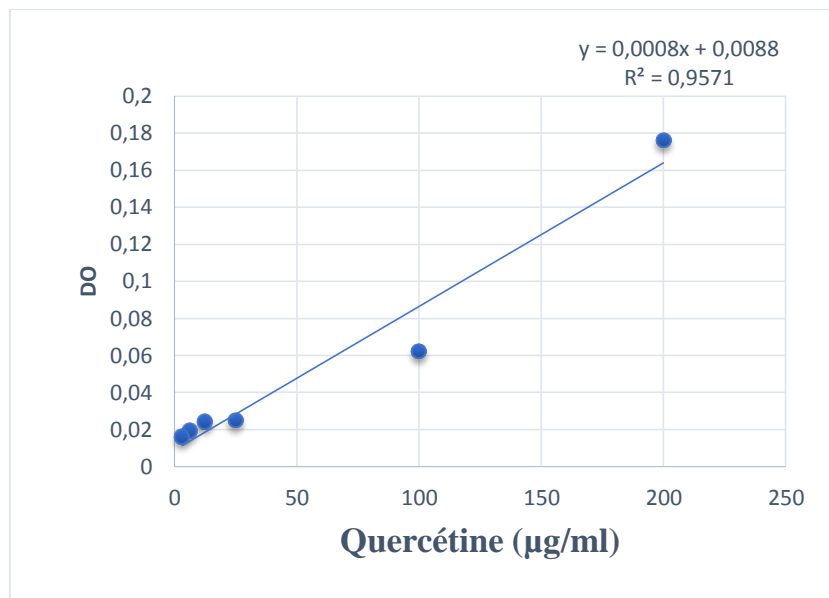


Figure 10 : la courbe d'étalonnage de quercétine.

III.1.3. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans la propolis

La quantité des polyphénols et des flavonoïdes totaux dans l'EPP, exprimée en µg EAG/g de propolis et mg EQ/g de propolis respectivement, est illustrée dans la figure 11.

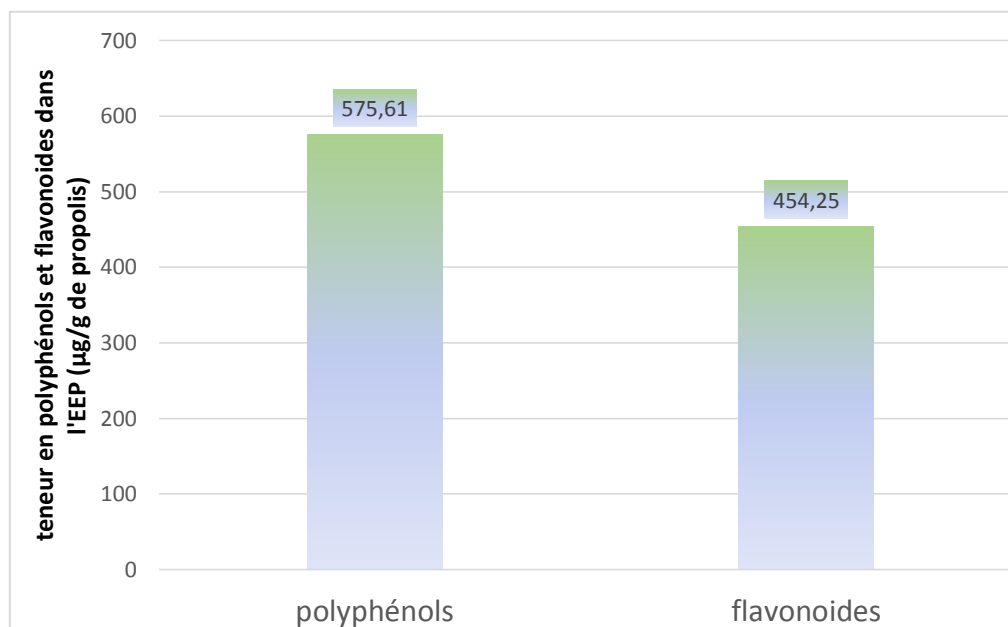


Figure 11 : Teneur en polyphénols et flavonoïdes dans l'extrait de la propolis

Nous avons constaté que la teneur en polyphénols de l'EEP est importante 575.61 ± 21.45 mg EAG/g de propolis, et le taux de flavonoïdes totaux représente une concentration de 454.25 ± 2.5 mg EQ/g de propolis.

Notre extrait est riche en polyphénols et en flavonoïdes ce qui pourrait expliquer leur activité antioxydante et anticancéreuse car la propolis contient plusieurs composants phénoliques anticancéreux selon Boutabet et al (2011).

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

Et d'une part les études épidémiologiques et précliniques ont montré que les polyphénols et les flavonoïdes de la propolis possèdent des effets antitumoraux et chimio-préventifs directs. L'activité anticarcinogène des flavonoïdes dans la propolis peut inhiber la croissance tumorale en inhibant l'angiogenèse et en induisant l'apoptose des cellules tumorales (Szliszka et al., 2011) ; Il a été rapporté que la propolis agit en inhibant directement la croissance des cellules tumorales et en induisant l'apoptose (Valente et al., 2011) ou indirectement en éliminant les ROS et en augmentant les activités des enzymes antioxydantes (Oršolić et al., 2011 et 2013).

III.2. Effet de la propolis sur le poids des animaux et des poumons

À la fin des traitements les animaux par la propolis 25mg/kg, nous avons évalué l'effet du traitement sur les variations du poids corporel et le poids des poumons dont les résultats sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Les paramètres	Groupe 1 Témoin	Groupe 2 B (a)p +EEP	Groupe 3 B(a)p	Groupe 4 EEP
Le nombre des animaux examinés	03	05	03	05
Le poids corporel (g)	25.86 ± 1.07	35.78 ± 3.31	24.87 ± 1.17	34.56 ± 3.19

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le poids du poumon (g)	0.30 ±0.11	0.36 ±0.12	0.22 ±0.07	0.36 ±0.12
Le poids relatif des poumons PP/PC (%)	1.16	1.006	0.885	1.042

Tableau 4 : l'effet de l'extrait éthanolique de propolis 25mg/kg pendant 5jours sur les variations du poids des poumons et sur le poids corporel chez les souris traités par une dose 100mg/kg de B(a)P.

Au moment du sacrifice et après la pesée des animaux, nous avons observé une diminution significative (<0.05) du poids corporel des souris traitées par B(a)p par rapport au témoin (g). Et une augmentation très significative ($p\leq 0.01$) du poids corporel de lot prétraité par le B(a)p +propolis par rapport au témoin. Et aussi une augmentation très significative ($p\leq 0.01$) chez le lot préventif (traité seulement par la propolis).

Et nous avons observé aussi une augmentation très significative ($p\leq 0.01$) chez le groupe prétraité par l'extrait éthanolique de la propolis + B(a)p par rapport au groupe traité par B(a)p que similaire au lot traité seulement par la propolis.

Par contre une diminution significative ($P\leq 0.05$) du poids relatif des poumons des souris traités par le B(a)p ($0.885\% \pm 0.07$ g) par rapport aux souris témoins ($1.16\% \pm 0.11$ g) ont été constaté. Par contre nous avons enregistré une augmentation très significative ($p\leq 0.01$) chez le groupe traité par la propolis par rapport au groupe traité par B(a)p.

La Réduction du gain de poids corporel observée chez le lot de benzo (a) pyrène due à la détérioration de la fonction pulmonaire et à la privation nutritionnelle. Et aussi due à la cachexie, à l'anorexie, en raison de l'effet toxique des métabolites réactifs au médicament. En outre, l'évaluation du poids relatif des poumons a été utilisée pour étudier changements potentiels dans la taille des poumons. Dans les études précédentes, ils ont trouvé une augmentation significative du poids relatif des poumons a été noté chez le lot de benzo (a) pyrène ce qui pourrait être dû à une incidence accrue des cellules en prolifération et de l'inflammation (Blackwill et al., 2005) (Kasala et al., 2016).

Nos résultats ne refuse pas ces études mais vue que c'est une toxicité aigüe, et qu'il y a pas assez de temps pour la formation de cancer, la diminution du poids de poumon expliquée par le stress oxydatif produit, et qu'il va suivre à long terme d'une l'inflammation et le développement du tissu tumoral et alors l'augmentation de poids des poumons.

III.3. Effet du benzopyrène sur le statut oxydatif de la cellule pulmonaire

La présente étude a été réalisée pour évaluer le statut oxydatif des poumons. Les résultats concernant les activités du MDA dans les poumons indiquent que l'administration de B (a) P peut induire un stress oxydatif. Ce stress oxydatif et le dysfonctionnement mitochondrial sont associés à la maladie et au processus toxique. Il résulte de la production de ROS, conduisant souvent à la peroxydation de phospholipides membranaires et production de réactifs les aldéhydes (Hanasaki et al., 1994 ; Ferrari., 1996 ; Korshunov et al., 1997 et Morin et al., 2001a). Ce processus provoque une diminution de la fonction de la membrane, une intégrité structurelle réduite, une diminution de la fluidité et une inactivation d'un certain nombre d'enzymes liées à la membrane et de récepteurs de protéines (Alyane et al., 2008). Le MDA tissulaire, comme produit final de la cascade lipopéroxydative, est reporté pour être un marqueur fiable de la peroxydation lipidique (Camkur et al., 2017).

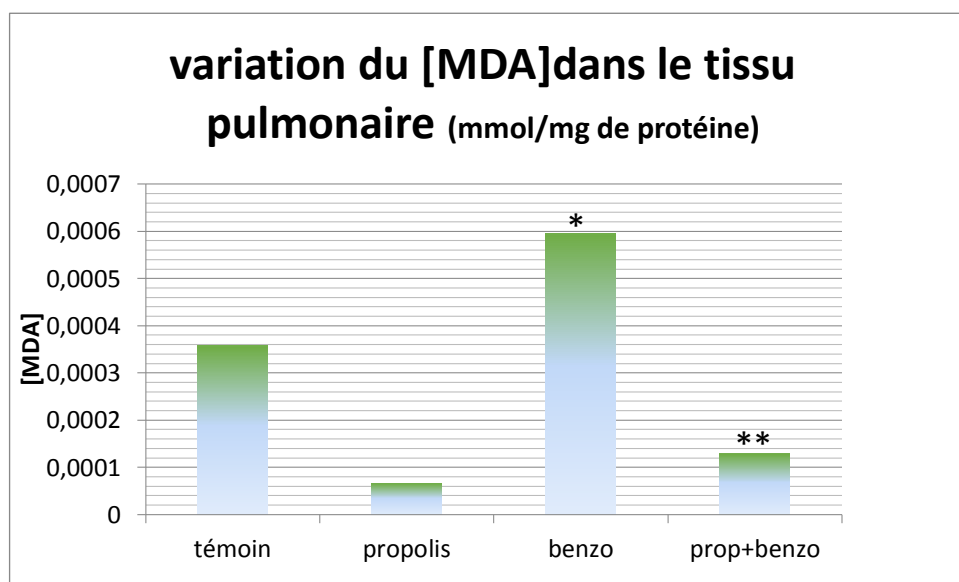


Figure 12 : Variation des concentrations du MDA dans les différents groupes traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

Nous avons observé une augmentation significative ($p < 0.05$) du taux de MDA cytosolique des souris traitées par B(a)p (0,00059 mmol/mg) comparé au groupe témoin (0,00035 mmol/mg)

Cette augmentation du taux de MDA conduit à une augmentation des effets délétères des B(a)p et production excessive de radicaux libres et à l'inhibition des enzymes de piégeage des radicaux

libres et aussi impliqués dans la formation des tumeurs en interagissant avec l'ADN pour former des adduits MDA-ADN qui induisent des altérations génétiques conduisant à une cancérogenèse. Une énorme quantité de radicaux libres générés par des agents cancérigènes réagit avec les lipides causant la peroxydation lipidique (Kim et al., 2000a, b). Les produits de la peroxydation lipidique comprennent le malondialdéhyde, qui interagit avec diverses molécules conduisant à un stress oxydatif et qui serait impliqué dans la formation de tumeurs (Ramakrishnan et al., 2007).

Une étude a montré que le B(a)P était le plus efficace dans la production de MDA, avec animaux intoxiqués au benzo (a) pyrène (Venugopalan et al 2015) ; ce qui suggère que l'effet toxique du benzo (a) pyrène initie la formation des radicaux libres. Aussi d'autres études ont montré que le B(a)P était le plus efficace dans la production de MDA dans le sérum et les poumons chez animaux (Kasala et al., 2016).

Le prétraitement par l'extrait de la propolis a provoqué une diminution très significative ($p < 0.01$) du taux de MDA (0,00013 mmol par mg de protéines) par rapport au groupe traité par B(a)p (0,00059 mmol par mg de protéines). Cette diminution est due à l'effet scavenger des polyphénols de la propolis qui a la capacité de réduire le taux de ROS et d'augmenter les capacités antioxydantes tissulaires et à la présence de flavonoïdes peut contribuer à cet effet, car ils se sont révélés être un potentiel inhibiteur de la peroxydation lipidique (Siegers et Younes. 1981).

Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par (Yildiz et al., 2008 ; Kasala et al., 2016) qui ont démontré les effets protecteurs des polyphénols contenus dans la propolis, tels que la chrysin et le CAPE, contre les dommages oxydatifs dans les poumons des rats, qui suppriment la LPO et inhibent l'activité de la lipoxigénase. Ces résultats sont en accord avec nos résultats selon lesquels la concentration en MDA était inhibée dans le groupe traité avec EEP, ajouté après le traitement par B (a) P, et confirmait l'activité antioxydante et piégeant les radicaux libres de notre EEP pour réduire les effets délétères de B (a) P.

III.4. Effet antioxydant de l'extrait de propolis

La propolis a un effet antioxydant par sa capacité de renforcer la synthèse de défenses antioxydantes tel que le glutathion, un des cofacteurs des voies de détoxification et de régulation du potentiel redox, ainsi que l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes (Oršolić et al., 2013), ce qui permet de réduire l'effet néfaste des ROS en les inactivant, d'où le faible taux de MDA observé.

Influence de l'EEP sur le niveau du glutathion des cellules pulmonaires

Le taux de GSH va nous donner une idée sur l'effet des ROS générées du métabolisme de benzopyrène sur l'activité des antioxydants qu'ils soient enzymatiques ou non, ainsi que l'effet de l'EEP sur ces activités.

Le GSH qui est un tripeptide ubiquitaire important, est considérée par certains auteurs comme un véritable marqueur du statut oxydatif et de l'état de santé d'un individu ;il est très important comme système biologique antioxydant, en particulier dans les cellules pulmonaires en cas de protection contre les lésions oxydantes.

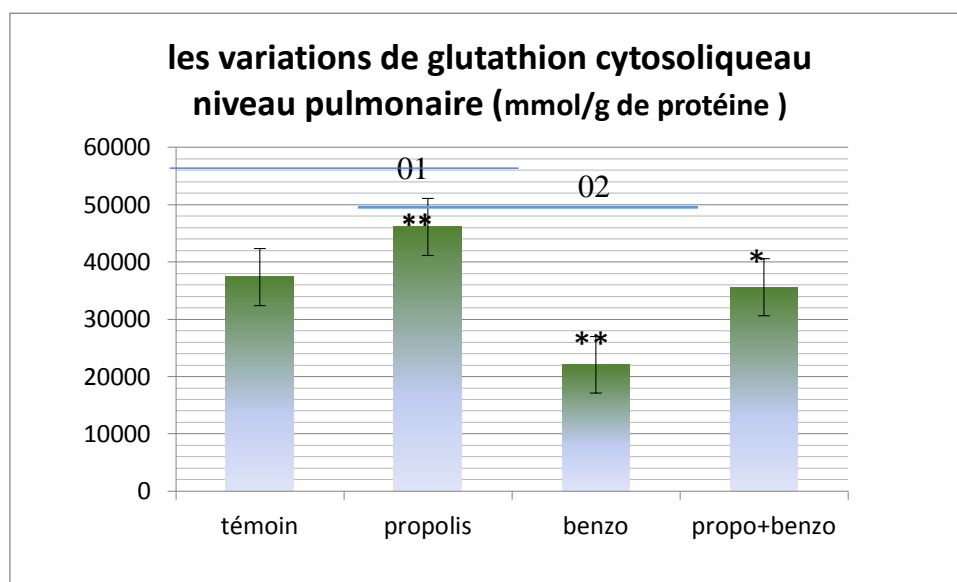


Figure 13: Variation des concentrations du GSH dans les différents groupes traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type (n=16). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($p \leq 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p \leq 0.001$).

01 : comparaison par rapport au contrôle, 02 : comparaison par rapport au B(a)P

Comme le montre la figure 13, l'administration de B(a)P a provoqué un appauvrissement très significatif ($p < 0,01$) des taux de GSH cellulaire ($22048,27 \pm 0,21$) mM / g respectivement par rapport au groupe témoin ($37397,28 \pm 0,31$) mM / g.

La diminution de GSH dans le groupe B(a)p dépend de la production importante de ROS ainsi que par sa consommation et son utilisation importante par les cellules pulmonaires dans les réactions de conjugaison avec le BPDE, le métabolite cancérigène ultime du B(a)P,

Par ailleurs, dans le groupe B(a)p + propolis , Le prétraitement des animaux avec de l'EEP (25mg / kg) avant le traitement à la B(a)P a normalisé la teneur en GSH, une élévation et normalisation du niveau du GSH épuisé dans le poumon par rapport aux groupe B(a)P ($p < 0,01$) est très claire, quia montré que la propolis augmentait les groupes sulfidryles, probablement par ses composés phénoliques qui sont capables de capter les radicaux libres, maintenant ainsi les niveaux de GSH élevés (Capucho et al., 2012)

Influence de l'EEP sur le niveau de SOD des cellules pulmonaires

Le stress oxydatif représente l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des ERO, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances et la capacité de défense des antioxydants (Koelchlin- Ramonatxo, 2006). La superoxyde dismutase et la catalase sont les principales enzymes impliquées dans le mécanisme de défense antioxydante puisqu'elles sont impliquées dans l'élimination directe des ROS. Donc la détermination du statut oxydatif d'un individu est devenue un sujet de priorité en termes de prévention de maladies.

La détermination du statut antioxydant enzymatique dans le cadre de notre étude comprend la mesure de l'activité de l'enzyme de SOD. La fonction principale de la SOD qui est l'unique enzyme perturbatrice des radicaux superoxydes, est de protéger la cellule contre les dommages oxydatifs causés par la peroxydation lipidique et l'anion superoxyde en le convertissant en H_2O_2 (Kamaraj et al., 2009),

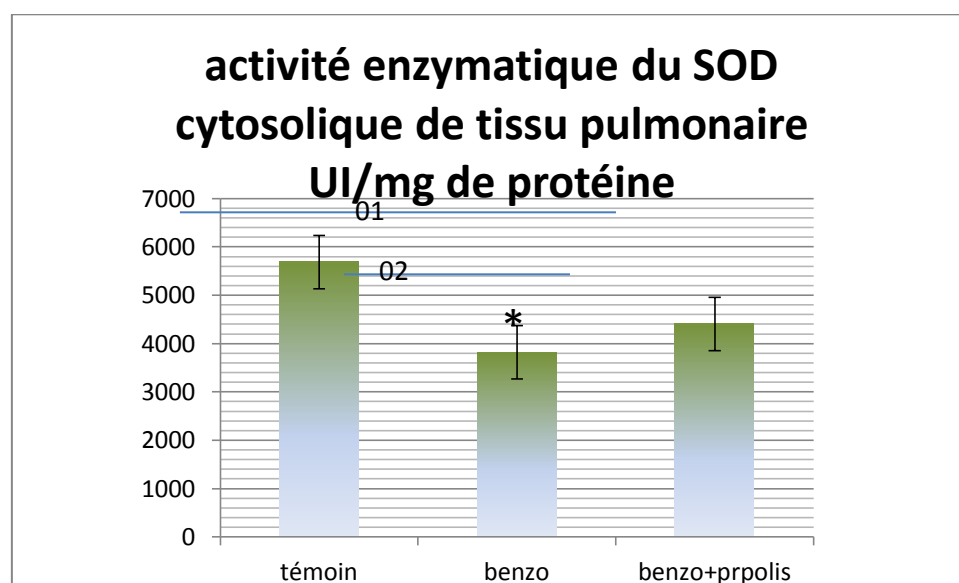


Figure 14 : Variation de l'activité enzymatique de la SOD dans les différents groupes traités. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type ($n=16$). Test de Student : (ns) désigne un effet non significatif ($p > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($p < 0.05$), (**)

désigne un effet très significatif ($p \leq 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($p < 0.001$).

1 : comparaison par rapport au contrôle, 2 : comparaison par rapport au B(a)P

L'activité de la SOD cytosolique dans les quatre groupes de traitement est différente dans le groupe du B(a)P, l'activité enzymatique de la SOD cytosolique a diminué, arrivant à des taux bas ($3818,72 \pm 0,03$ UI/mg de protéines) par rapport au groupe témoin avec un taux de $5689,02 \pm 0,008$ UI/mg de protéines

Ce résultat est confirmé par celui de Jaruga et al., (1994) et Kasala et al., (2016) qui ont rapporté la présence de faibles concentrations en SOD et en catalase dans les tissus atteints d'un cancer du poumon et qui pourrait être liée à l'augmentation des dommages oxydatifs à l'ADN et aux protéines ou à l'accumulation d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène ce qui entraînerait la consommation de ces enzymes (Jaruga et al., 1994 ; Kasala et al., 2016). La présence de certaines modifications ou mutation de certains gènes impliqués dans le contrôle de l'expression de ces enzymes peut être considérée comme l'une des causes de cette diminution.

Dans le groupe de souris traités par la B(a)P + propolis , l'augmentation de taux de la SOD été bien claire arrivant à $4409,49 \pm 0,13$ UI/mg de protéines par rapport au groupe de B(a)P de $3818,72 \pm 0,03$ UI/mg de protéines, la propolis a inversé de manière significative tous les changements induits par le B(a)P grâce aux flavonoïdes qui constituent d'importants composants de la propolis et qui peuvent montrer une augmentation de l'activité SOD dans les poumons d'animaux d'expérience (Kamaraj et al., 2009).

III.5. Modifications histologiques pulmonaires induites par le benzopyrène et effet protecteur de la propolis

Après le traitement préventif par l'EEP pendant 5 jours ;suivi par un traitement par le B(a) p, Le jour du sacrifice nous avons préparé les coupes histologiques visualisés par microscope optique après coloration hématoxyline/éosine

Nous avons observé des modifications histologiques induites par le B (a)p (figure 15).

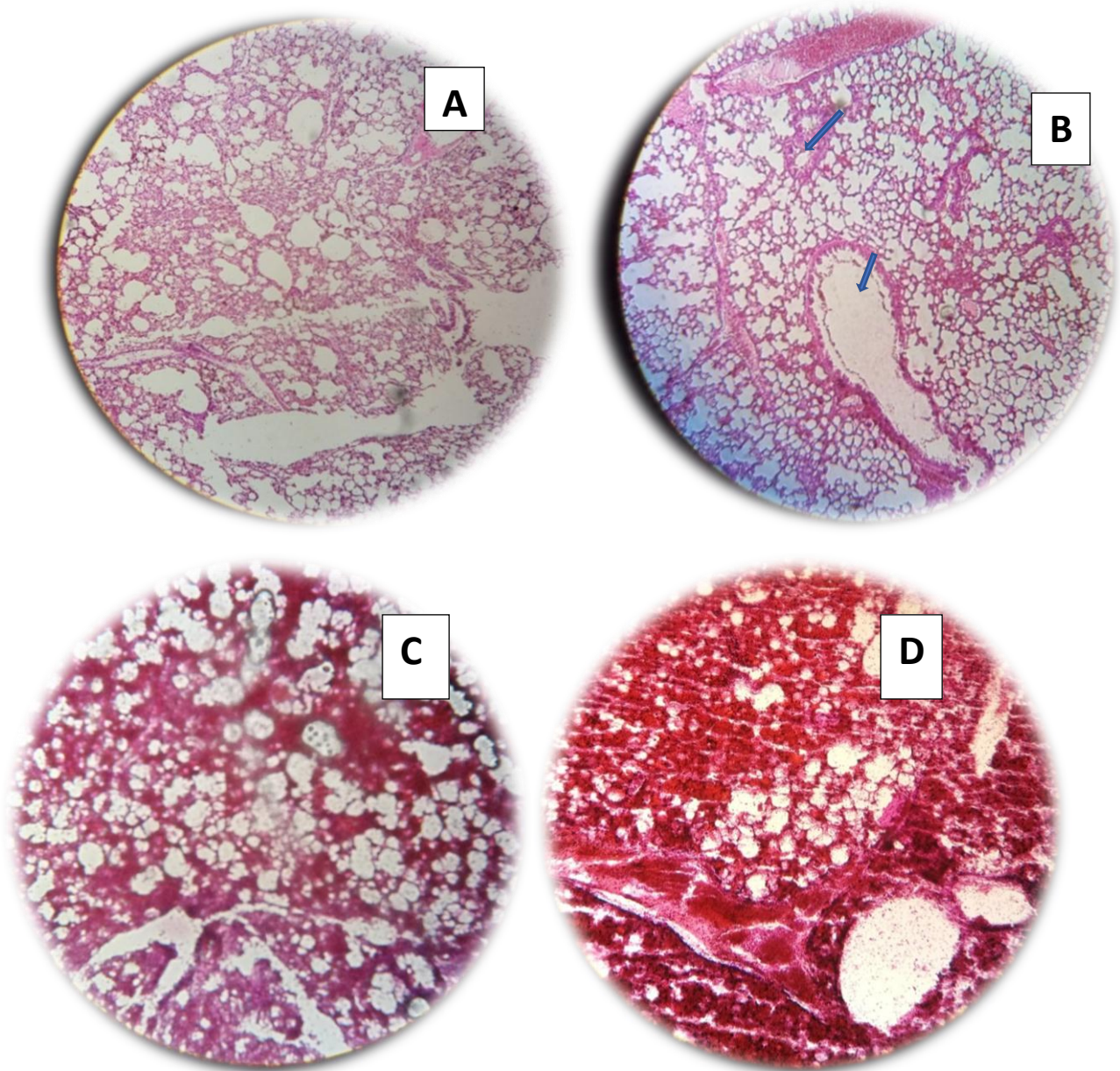


Figure 15 : Études histologique de coupes de poumon vues au microscope optique (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine [H & E]) dans les groupes témoin et traités. (Grossissement à 100)

(A) Animaux témoins présentant une architecture normale avec des espaces alvéolaires de taille régulière (10 × H & E). (B) Animaux induits par le benzo (a) pyrène présentant une architecture condensée avec des alvéoles, un épaissement alvéolaire septal détruits, inflammation des voies respiratoires et noyaux hyperchromatiques dans les cellules de la paroi alvéolaire, Les flèches indiquent une infiltration inflammatoire péri bronchique et les cercles indiquent une infiltration septale alvéolaire intense. (C) animaux traités par le B(a)p +propolis indique une infiltration de cellules inflammatoires (10 × H & E) une histo-architecture révéla une amélioration. L'épaisseur des doublures épithéliales était réduite significativement. La taille et la forme des cellules est apparue presque normale. (D) animaux traités seulement par l'EEP présente une nette amélioration de la histo-architecture des poumons. L'administration d'EEP a significativement réduit l'infiltration de lymphocytes et de macrophages intra-parenchymateux par rapport à celle du groupe B (a) P.

Une toxicité aigüe a été observée dans une section traitée à la B(a)P (Figure 1 B) ; Les noyaux ont été déformés, l'épaississement de l'épithélium et des masses de cellules sans structure ont été visibles, avec une diminution du contenu cytoplasmique.

Chez les animaux recevant EPP+B(a)P (figures 1 C), nous avons observé une histo-architecture révélée une amélioration. L'épaisseur des doublures épithéliales était réduite significativement. La taille et la forme des cellules sont apparues presque normales.

D'autre part, des tissus du traitement seulement par l'EPP (Figure 1 D) ont montré une nette amélioration de la histo-architecture des poumons. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Brihoum et al (2018) qui ont démontré l'efficacité chimio préventive de l'EPP contre l'effet toxique de B(a)p et la progression tumorale.



Conclusion

Notre travail avait pour but d'étudier l'effet de l'extrait de propolis de Jijel sur le stress pulmonaire in vivo, sur un modèle animal de carcinogénèse pulmonaire chimique induite par le benzo(a)pyrène B(a)P, Nous avons pu démontrer que :

La toxicité du B(a)P est associée au stress oxydatif, par une synthèse importante de ROS conduisant à une inflammation et une transformation maligne du tissu pulmonaire, cette augmentation du stress oxydatif est remarquée par la diminution de taux des antioxydants enzymatiques (SOD) et non enzymatique (GSH) et l'augmentation des dégâts macromoléculaire comme la peroxydation lipidique.

La propolis inverse la toxicité du benzopyrène, ses composants qui jouent le rôle d'agents antioxydants permettent de renforcer les défenses antioxydantes enzymatique (SOD) et non enzymatique (GSH) et de protéger les macromolécules (lipides) ainsi que de limiter les dommages de ce stress en diminuant le taux de MDA

Cette étude est l'une des plusieurs études entreprises sur la propolis, qui ont permis de montrer que celle-ci pouvait être un puissant antioxydant et une alternative efficace dans bon nombre de troubles et pathologies, Il reste cependant très surprenant que, bien que la composition en principes actifs diffère fortement en fonction de l'origine botanique, mais ses effets thérapeutiques soient les mêmes. Des études de standardisation seraient alors souhaitables.

Références bibliographiques

Alexandrov, K., Cascorbi, I., Rojas, M., Bouvier, G., Kriek, E., & Bartsch, H. (2002). CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo [a] pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. *Carcinogenesis*, 23(12), 1969-1977.

Ali, R., Shahid, A., Ali, N., Hasan, S. K., Majed, F., & Sultana, S. (2017). Amelioration of benzo [a] pyrene-induced oxidative stress and pulmonary toxicity by naringenin in Wistar rats: a plausible role of COX-2 and NF-κB. *Human & experimental toxicology*, 36(4), 349-364.

Aliyazicioglu, Y., Demir, S., Turan, I., Cakiroglu, T., Akalin, I., Deger, O., & Bedir, A. (2011). Preventive and protective effects of Turkish propolis on H₂O₂-induced DNA damage in foreskin fibroblast cell lines. *Acta Biologica Hungarica*, 62(4), 388-396.

Alyane, M., Kebsa, L. B. W., Boussenane, H. N., Rouibah, H., & Lahouel, M. (2008). Cardioprotective effects and mechanism of action of polyphenols extracted from propolis against doxorubicin toxicity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(3).

Anandakumar, P., Kamaraj, S., Jagan, S., Ramakrishnan, G., Vinodhkumar, R., & Devaki, T. (2008). Capsaicin modulates pulmonary antioxidant defense system during benzo (a) pyrene-induced lung cancer in swiss albino mice. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(4), 529-533.

Asamura, H., Chansky, K., Crowley, J., Goldstraw, P., Rusch, V. W., Vansteenkiste, J. F., et al. (2015). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming 8th edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(12), 1675-1684.

Azari, M. R., Mohammadian, Y., Pourahmad, J., Khodaghali, F., Peirovi, H., Mehrabi, Y., et al. (2019). Individual and combined toxicity of carboxylic acid functionalized multi-walled carbon nanotubes and benzo a pyrene in lung adenocarcinoma cells. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

Baan, R., Grosse, Y., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., et al. (2009). A review of human carcinogens—part F: chemical agents and related occupations. *The lancet oncology*, 10(12), 1143-1144.

Badr, M. O., Edrees, N. M., Abdallah, A. A., Hashem, M. A., El-deen, N. A., Neamat-allah, A. N., & Ismail, H. T. (2015). Biochemical and antioxidant effect of Doxorubicin hydrochloride and Propolis on N-methyl-N-nitrosourea (MNU) Induced Adenocarcinoma in Rats. *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 72(2).

Bak, Y., Jang, H. J., Seo, J. H., No, S. H., Chae, J. I., Hong, J., & Yoon, D. Y. (2018). Benzo [a] pyrene alters the expression of genes in A549 lung cancer cells and cancer stem cells. *Journal of microbiology and biotechnology*, 28(3), 425-431.

Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., & Kadota, S. (2001). Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy research*, 15(7), 561-571.

- Beckett, W. S.** (2000). Occupational respiratory diseases. *New England Journal of Medicine*, 342(6), 406-413.
- Benguedouar, L., Lahouel, M., C Gangloff, S., Durlach, A., Grange, F., Bernard, P., & Antonicelli, F.** (2016). Ethanolic extract of algerian propolis and galangin decreased murine melanoma T. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 16(9), 1172-1183.
- Benguedouar, L., Boussenane, H. N., Kebsa, W., Alyane, M., Rouibah, H., & Lahouel, M.** (2008). Efficiency of propolis extract against mitochondrial stress induced by antineoplastic agents (doxorubicin and vinblastin) in rats.
- Bolouri, A. J., Pakfetrat, A., Tonkaboni, A., Aledavood, S. A., Najafi, M. F., Delavarian, Z.** (2015). An investigation of propolis in the treatment and prevention of radiation induced Mucositis in head and neck cancers. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5.
- Bolouri, A. J., Pakfetrat, A., Tonkaboni, A., Aledavood, S. A., Najafi, M. F., Delavarian, Z.** (2015). Preventing and therapeutic effect of propolis in radiotherapy induced mucositis of head and neck cancers: a triple-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Iranian journal of cancer prevention*, 8(5).
- Bommas-Ebert, U., Teubner, P., & Voss, R.** (2008). *Cours d'anatomie*. De Boeck Supérieur.
- Braik, A., Lahouel, M., Merabet, R., Djebbar, M. R., & Morin, D.** (2019). Myocardial protection by propolis during prolonged hypothermic preservation. *Cryobiology*, 88, 29-37.
- Briedé, J. J., Godschalk, R. W., Emans, M. T., de Kok, T. M., van Agen, E., van Maanen, J. M.** (2004). In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo [a] pyrene metabolism. *Free radical research*, 38(9), 995-1002.
- Brihoum, H., Maiza, M., Sahali, H., Boulmeltout, M., Barratt, G., Benguedouar, L., & Lahouel, M.** (2018). Dual effect of Algerian propolis on lung cancer: antitumor and chemopreventive effects involving antioxidant activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1).
- Cardinault, N., Cayeux, M. O., & du Sert, P. P.** (2012). La propolis: origine, composition et propriétés. *Phytothérapie*, 10(5), 298-304.
- Chansky, K., Detterbeck, F. C., Nicholson, A. G., Rusch, V. W., Vallières, E., Groome, P., et al.** (2017). The IASLC lung cancer staging project: external validation of the revision of the TNM stage groupings in the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(7), 1109-1121.
- Chen, J., Yakkundi, P., & Chan, W. K.** (2018). Down-regulation of p23 in normal lung epithelial cells reduces toxicities from exposure to benzo [a] pyrene and cigarette smoke condensate via an aryl hydrocarbon receptor-dependent mechanism. *Toxicological Sciences*, 167(1), 239-248.
- Chipman, J. K., Bhave, N. A., Hiron, P. C., & Millburn, P.** (1982). Metabolism and excretion of benzo [a] pyrene in the rabbit. *Xenobiotica*, 12(6), 397-404.

Claus, R., Kinscherf, R., Gehrke, C., Bonaterra, G., Basnet, P., Metz, J., & Deigner, H. P. (2000). Antiapoptotic effects of propolis extract and propol on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzneimittelforschung*, 50(04), 373-379.

Daleprane, J. B., & Abdalla, D. S. (2013). Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013.

Darshan, Telange R. (2012). An overview of propolis as potential of new drug development. 3(2).

Debab, M., Toumi-Benali, F., & Dif, M. M. (2017). Antioxidant activity of propolis of West Algeria. *Phytothérapie*, 15(4), 230-234.

Decroisette, C., Abelleira, M., Bocquillon, V., & Confavreux, C. B. (2017). Les métastases osseuses des cancers broncho-pulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 9(2), 259-270.

De Lima, R. O. A., Bazo, A. P., Said, R. A., Sforcin, J. M., Bankova, V., Darros, B. R., & Salvadori, D. M. (2005). Modifying effect of propolis on dimethylhydrazine-induced DNA damage but not colonic aberrant crypt foci in rats. *Environmental and molecular mutagenesis*, 45(1), 8-16.

De Leyn, P., Doms, C., Kuzdzal, J., Lardinois, D., Passlick, B., Rami-Porta, R., et al. (2014). Preoperative mediastinal lymph node staging for non-small cell lung cancer: 2014 update of the 2007 ESTS guidelines. *Translational lung cancer research*, 3(4), 225.

Demir, S., Aliyazicioglu, Y., Turan, I., Misir, S., Mentese, A., Yaman, S. O., et al. (2016). Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. *Nutrition and cancer*, 68(1), 165-172.

De Paepe, M. E. (2016). Pathology of bronchopulmonary dysplasia. In *Bronchopulmonary Dysplasia* (pp. 149-164). Humana Press, Cham.

Eberhardt, W. E., Mitchell, A., Crowley, J., Kondo, H., Kim, Y. T., Turrisi III, et al. (2015). The IASLC lung cancer staging project: proposals for the revision of the M descriptors in the forthcoming eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *Journal of thoracic oncology*, 10(11), 1515-1522.

Gadouche, L. (2010). Identification de médicaments interagissant sur la génotoxicité du Benzo (a) pyrène.

Gelboin, H. V. (1980). Benzo [alpha] pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiological reviews*, 60(4), 1107-1166.

Guibert, N., Milia, J. D., & Mazieres, J. (2016). Épidémiologie moléculaire du cancer bronchique. *Revue des Maladies Respiratoires*, 33(8), 675-681.

Hamouchene, H., Arlt, V. M., Giddings, I., & Phillips, D. H. (2011). Influence of cell cycle on responses of MCF-7 cells to benzo [a] pyrene. *BMC genomics*, 12(1), 333.

- Hashemi, J. H.** (2016). Biological effect of bee propolis: a review. *European Journal of Applied Sciences*, 8(5), 311-318.
- Hecht, S. S.** (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), 1194-1210.
- Heredia Ortiz, R.** (2015). Modélisation toxicocinétique du benzo (a) pyrène et 3-hydroxybenzo (a) pyrène pour l'interprétation des données de surveillance biologique de l'exposition chez les travailleurs.
- Hussein, S. A., Abdel-Aal, S. A., Amin, A., &Khalaf, H. A.** (2016). Caspase-3, Bcl-2, p53, CYP1A1 and COX-2 as a potential target in chemoprevention of Benzo (a) pyrene-induced lung carcinogenesis in mice: Role of thymoquinone. *Natural Science*, 4(3), 430-441.
- Isla, M. I., Moreno, M. N., Sampietro, A. R., &Vattuone, M. A.** (2001). Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 76(2), 165-170.
- Izuta, H., Shimazawa, M., Tsuruma, K., Araki, Y., Mishima, S., & Hara, H.** (2009). Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 45.
- Kalabus, J. L., Cheng, Q., Jamil, R. G., Schuetz, E. G., & Blanco, J. G.** (2012). Induction of carbonyl reductase 1 (CBR1) expression in human lung tissues and lung cancer cells by the cigarette smoke constituent benzo [a] pyrene. *Toxicology letters*, 211(3), 266-273.
- Kalabus, J. L., Cheng, Q., Jamil, R. G., Schuetz, E. G., & Blanco, J. G.** (2012). Induction of carbonyl reductase 1 (CBR1) expression in human lung tissues and lung cancer cells by the cigarette smoke constituent benzo [a] pyrene. *Toxicology letters*, 211(3), 266-273.
- Kamaraj, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Jagan, S., &Devaki, T.** (2009). Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in mice. *Investigational New Drugs*, 27(3), 214-222.
- Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Sriram, C. S., &Gogoi, R.** (2015). Benzo (a) pyrene induced lung cancer: role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports*, 67(5), 996-1009.
- Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Madhana, R. M., Dahiya, V., Budhani, M. K., et al.** (2016). Chemopreventive effect of chrysin, a dietary flavone against benzo (a) pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. *Pharmacological Reports*, 68(2), 310-318.
- Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Barua, C. C., Sriram, C. S., &Gogoi, R.** (2015). Benzo (a) pyrene induced lung cancer: role of dietary phytochemicals in chemoprevention. *Pharmacological Reports*, 67(5), 996-1009.
- Kim, K. H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J.** (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment international*, 60, 71-80.
- Kolankaya, D., Selmanoğlu, G., Sorkun, K., &Salih, B.** (2002). Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chemistry*, 78(2), 213-217.

- Kurek-Górecka, A., Rzepecka-Stojko, A., Górecki, M., Stojko, J., Sosada, M., & Świerczek-Zięba, G.** (2014). Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*, 19(1), 78-101.
- Lahouel, A., Kebieche, M., Lakroun, Z., Rouabhi, R., Fetoui, H., Chtourou, Y.** (2016). Neurobehavioral deficits and brain oxidative stress induced by chronic low dose exposure of persistent organic pollutants mixture in adult female rat. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(19), 19030-19040.
- Lahouel, M., Boutabet, K., Kebsa, W., & Alyane, M.** (2010). Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(10), 712-720.
- Lahouel, M., Boulkour, S., Segueni, N., & Fillastre, J. P.** (2004). The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathione concentration. *Pathologie-biologie*, 52(6), 314-322.
- Latimer, K. M., & Mott, T. F.** (2015). Lung cancer: diagnosis, treatment principles, and screening. *American family physician*, 91(4).
- Leprieur, E. G., & Revel, M. P.** (2018). Bilan d'extension et classification TNM actualisée du cancer bronchique non à petites cellules. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 10(3), 248-254.
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R.** (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental gerontology*, 36(9), 1495-1502.
- Lin, W. W., & Karin, M.** (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1175-1183.
- Lotfy, M.** (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *AsianPac J Cancer Prev*, 7(1), 22-31.
- Luo, X., Zang, X., Yang, L., Huang, J., Liang, F., Rodriguez-Canales, J., et al.** (2017). Comprehensive computational pathological image analysis predicts lung cancer prognosis. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(3), 501-509.
- Madhavan, N. D., & Naidu, K. A.** (2000). Purification and partial characterization of peroxidase from human term placenta of non-smokers: metabolism of benzo (a) pyrene-7, 8-dihydrodiol. *Placenta*, 21(5-6), 501-509.
- Malhotra, A., Nair, P., & Dhawan, D. K.** (2010). Modulatory effects of curcumin and resveratrol on lung carcinogenesis in mice. *Phytotherapy research*, 24(9), 1271-1277.
- Marnett, L. J.** (2000). Oxyradicals and DNA damage. *carcinogenesis*, 21(3), 361-370.
- Mecellem, E. H., & Bachir Bey, M. E.** (2017). Étude comparative des paramètres physicochimiques et propriétés antioxydantes des produits de la ruche: gelée royale, miel, pollen, propolis et cire d'abeille.

Mukherjee, A., Sikdar, S., &Khuda-Bukhsh, A. R. (2016). Evaluation of ameliorative potential of isolated flavonol fractions from *Thujaoccidentalis* in lung cancer cells and in Benzo (a) pyrene induced lung toxicity in mice. *Med, 1*, 1-13.

Munn, L. L. (2017).Cancer and inflammation.*Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, 9*(2), e1370.

Noureddine, H., Hage-Sleiman, R., Wehbi, B., Fayyad-Kazan, H., Hayar, S., Traboulssi, M. (2017).Chemical characterization and cytotoxic activity evaluation of Lebanese propolis.*Biomedicine & Pharmacotherapy, 95*, 298-307.

Papachroni, D., Graikou, K., Kosalec, I., Damianakos, H., Ingram, V., &Chinou, I. (2015).Phytochemical analysis and biological evaluation of selected African propolis samples from Cameroon and Congo.*Natural product communications, 10*(1), 1934578X1501000118.

Pascual, C., Gonzalez, R., &Torricella, R. G. (1994).Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals.*Journal of Ethnopharmacology, 41*(1-2), 9-13.

Rajesh, V., & Kala, M. B. (2015).Antiproliferative and chemopreventive effect of *Annonamuricata* Linn.on Ehrlich ascites carcinoma and Benzo [a] pyrene induced lung carcinoma. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 15*(4), 239-256.

Rami-Porta, R., Bolejack, V., Giroux, D. J., Chansky, K., Crowley, J., Asamura, H., &Goldstraw, P. (2014). The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology, 9*(11), 1618-1624.

Rami-Porta, R., Bolejack, V., Crowley, J., Ball, D., Kim, J., Lyons, G., et al. (2015). The IASLC lung cancer staging project: proposals for the revisions of the T descriptors in the forthcoming eighth edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology, 10*(7), 990-1003.

Ravella, L., Barritault, M., Bringuier, P. P., Chalabreysse, L., Thivolet-Bejui, F., Maury, J. M., et al. (2018, June). Adénocarcinomes pulmonaires multiples: primitifs ou métastases?. In *Annales de Pathologie* (Vol. 38, No. 3, pp. 202-205). Elsevier Masson.

Remirez, D., González, R., Rodriguez, S., Ancheta, O., Bracho, J. C., Rosado, A., et al.(1997). Protective effects of propolis extract on allyl alcohol-induced liver injury in mice.*Phytomedicine, 4*(4), 309-314.

Roche, N., Housset, B., & Postel-Vinay, N. (2006). Bronchopneumopathie chronique obstructive. *Rev Mal Respir, 23*, 2S39-2S48.

Ronald, W. P. (2000). Toxicity of polyaromatic hydrocarbons other than benzo (a) pyrene: a review. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology, 19*(1), 55-67.

Russo, A., Cardile, V., Sanchez, F., Troncoso, N., Vanella, A., & Garbarino, J. A. (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life sciences, 76*(5), 545-558.

Schmidt- Hansen, M., Baldwin, D. R., Hasler, E., Zamora, J., Abraira, V., & i Figuls, M. R. (2014). PET-CT for assessing mediastinal lymph node involvement in patients with suspected resectable non-small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (11).

Seferian, A., & Simonneau, G. (2014). Pulmonary hypertension: definition, diagnostic and new classification. *Presse medicale (Paris, France: 1983)*, 43(9), 935-944.

Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, 30(6), 894-905.

Seydi, E., Hosseini, S. A., Salimi, A., & Pourahmad, J. (2016). Propolis induce cytotoxicity on cancerous hepatocytes isolated from rat model of hepatocellular carcinoma: Involvement of ROS-mediated mitochondrial targeting. *PharmaNutrition*, 4(4), 143-150.

Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., & Almeida-Aguiar, C. (2015). Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

Silverthorn, D. U. (2007). *Physiologie humaine: une approche intégrée*. Pearson Education France.

Teles, F., da Silva, T. M., da Cruz Júnior, F. P., Honorato, V. H., de Oliveira Costa, H., Barbosa, A. P. F. (2015). Brazilian red propolis attenuates hypertension and renal damage in 5/6 renal ablation model. *PLoS One*, 10(1), e0116535.

Trushin, N., Alam, S., El-Bayoumy, K., Krzeminski, J., Amin, S. G., Gullett, J., ...& Prokopczyk, B. (2012). Comparative metabolism of benzo [a] pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes. *Journal of carcinogenesis*, 11.

Udensi, U. K., & Tchounwou, P. B. (2016). Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 139.

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K., & Loridas, S. (2013). Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *International journal of environmental research and public health*, 10(9), 3886-3907.

Vázquez-Gómez, G., Rocha-Zavaleta, L., Rodríguez-Sosa, M., Petrosyan, P., & Rubio-Lightbourn, J. (2018). Benzo [a] pyrene activates an AhR/Src/ERK axis that contributes to CYP1A1 induction and stable DNA adducts formation in lung cells. *Toxicology letters*, 289, 54-62.

Villanueva, M., Gonzalez, M., Fernandez, H., Wilson, M., Manquian, N., Oth, C., & Oth, L. (2015). In vitro antibacterial activity of Chilean propolis against *Helicobacter pylori*. *Revista chilena de infectología: organooficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 32(5), 530-535.

Wagh, V. D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in pharmacological sciences*, 2013.

Walser, T., Cui, X., Yanagawa, J., Lee, J. M., Heinrich, E., Lee, G., et al. (2008). Smoking and lung cancer: the role of inflammation. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5(8), 811-815.

Wang, K., & Karin, M. (2015). Tumor-elicited inflammation and colorectal cancer. In *Advances in cancer research* (Vol. 128, pp. 173-196). Academic Press.

Wang, T. C., & Goldenring, J. R. (2002). Inflammation intersection: gp130 balances gut irritation and stomach cancer. *Nature medicine*, 8(10), 1080.

Watanabe, M., Kato, J., Inoue, I., Yoshimura, N., Yoshida, T., Mukoubayashi, C., et al. (2012). Development of gastric cancer in nonatrophic stomach with highly active inflammation identified by serum levels of pepsinogen and Helicobacter pylori antibody together with endoscopic rugal hyperplastic gastritis. *International journal of cancer*, 131(11), 2632-2642.

Wided, K., Hassiba, R., & Mesbah, L. (2014). Polyphenolic fraction of Algerian propolis reverses doxorubicin induced oxidative stress in liver cells and mitochondria. *Pak J PharmSci*, 27(6), 1891-1897.

Who, U. (2007). *Iccidd. Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination*, 2.

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* (Doctoral dissertation, Université Clermont Auvergne).

Zabaiou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., & Lobaccaro, J. M. A. (2017). Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chemistry and physics of lipids*, 207, 214-222.

Zhang, F., Tian, C., Liu, W., Wang, K., Wei, Y., Wang, H., et al. (2018). Determination of Benzopyrene-Induced Lung Inflammatory and Cytotoxic Injury in a Chemical Gradient-Integrated Microfluidic Bronchial Epithelium System. *ACS sensors*, 3(12), 2716-2725.

Annexe 1

Concentrations de protéines :

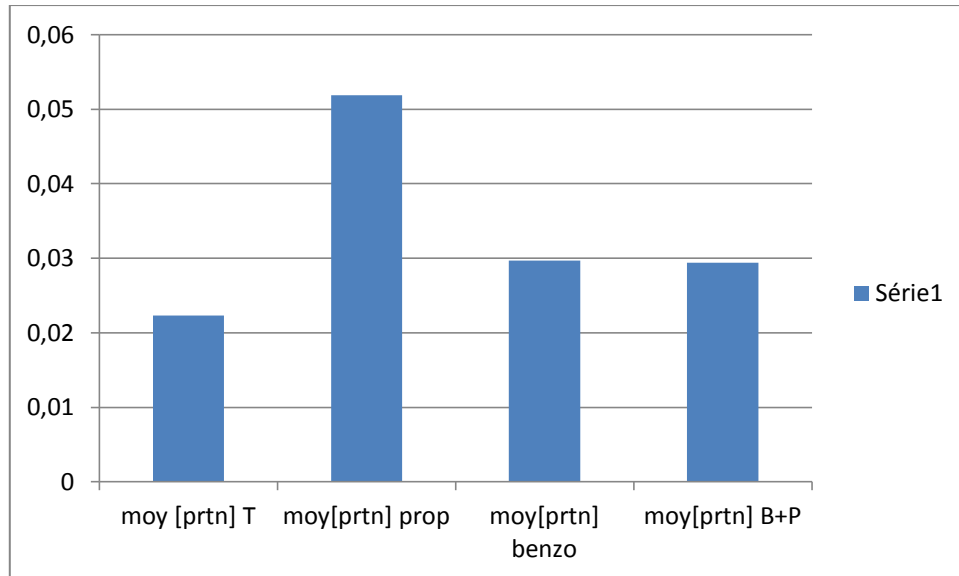


Figure : concentration de protéines dans chaque lot (mg/ml)

Annexe 2

Gamme étalon de GSH :

[]mg/ml	20mg/ml	10mg/ml	5mg/ml	2,5mg/ml	1,25mg/ml	0,6mg/ml	0,3mg/ml
DO1	1,21	0,97	0,43	0,2	0,16	0,1	0,002
DO2	1,406	0,305	0,358	0,173	0,053	0,09	0,01

Tableau : valeurs de densité optique de la gamme d'étalonnage de GSH

Résumé :

Au cours des dernières années, la propolis a beaucoup attiré l'attention en tant que substance bioactive à multiples activités biologiques même si sa composition se trouve un peu complexe. Il est considéré comme un produit utile ayant déjà été utilisé comme médicament de remplacement. Depuis peu, son utilisation suscite un intérêt croissant dans les secteurs de la thérapie curative et préventive.

Compte tenu de cela, nous avons évalué si les composés de polyphénols de la propolis de Jijel avaient des propriétés préventives contre le stress oxydatif pulmonaire induit par le B(a)P in vivo chez les souris albinos. Nous trouvons que le B(a) à la dose unique de 100 mg / kg de poids corporel a également provoqué une déplétion marquée des teneurs en GSH réduit et une inhibition des activités enzymatiques (SOD). Le B(a)P augmente la peroxydation lipidique cytosolique, comme en témoigne le contenu en MDA. D'autre part, concernant l'effet préventif de la propolis, nos résultats suggèrent des effets antioxydants et protecteurs de remarquables contre les stress oxydatifs induits par le B(a)P en renforçant les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques et en diminuant les dommages tels que la peroxydation lipidique.

Mots Clés : Poumon, Stress Oxydatif, Benzopyrène, Propolis, Cancer.

Summary :

In recent years, propolis has attracted much attention as a bioactive substance with multiple biological activities even though its composition is a little complex. It is considered a useful product that has already been used as a replacement medicine. Recently, its use is attracting increasing interest in the areas of curative and preventive therapy.

In view of this, we evaluated whether the polyphenol compounds of Jijel propolis had preventive properties against B (a) P-induced pulmonary oxidative stress in vivo in albino mice. We found that B (a) at a single dose of 100 mg / kg body weight also caused marked depletion of reduced GSH levels and inhibition of enzyme activities (SOD). B (a) P increases cytosolic lipid peroxidation, as evidenced by the content of MDA. On the other hand, concerning the preventive effect of propolis, our results suggest remarkable antioxidant and protective effects against B (a) P-induced oxidative stress by reinforcing enzymatic and non-enzymatic antioxidants and reducing damage such as than lipid peroxidation.

Key Words: Lung, Oxidative Stress, Benzopyrene, Propolis, Cancer.

خلاصة

في السنوات الأخيرة ، جذب البروبوليس الكثير من الاهتمام باعتباره مادة نشطة بيولوجياً مع أنشطة بيولوجية متعددة على الرغم من أن تركيبها معقد قليلاً. يعتبر منتجاً مفيداً تم استخدامه بالفعل كدواء بديل. في الأونة الأخيرة، يجذب استخدامه اهتماماً متزايداً في مجالات العلاج العلاجي و الوقائي.

في ضوء ذلك ، قمنا بتقييم ما إذا كانت مركبات البوليفينول في بروبوليس جيجل لها خواص وقائية ضد الإجهاد التأكسدي الرئوي الناتج عن البنزوبيرين في الجسم الحي في الفئران البيضاء. لقد وجدنا أن البنزوبيرين بجرعة وحيدة من 100 ملغم / كغم من وزن الجسم تسبب أيضاً في استنزاف ملحوظ لمستويات منخفضة ل GSH وتنشيط أنشطة الإنزيم SOD. البنزوبيرين يزيد من بيروكسيد دهني خلوي ، كما يتضح من محتوى MDA. من ناحية أخرى ، فيما يتعلق بالتأثير الوقائي للبروبوليس ، تشير نتائجنا إلى تأثيرات مضادة للأكسدة ووقائية ملحوظة ضد الإجهاد التأكسدي الناتج عن البنزوبيرين عن طريق تعزيز مضادات الأكسدة الأنزيمية وغير الأنزيمية وتقليل الأضرار مثل من بيروكسيد الدهون.

الكلمات المفتاحية: الرئة ، الإجهاد التأكسدي ، البنزوبيرين ، البروبوليس ، السرطان