

جامعة محمد الصديق بن يحيى  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
المكتبة : 1893  
رقم الجرد : .....

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

*République Algérienne Démocratique et Populaire*

*Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*



*Université de JIJEL*  
*Faculté des Sciences Exactes et des*  
*Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Biologie Moléculaire*  
*et Cellulaire*

جامعة جيجل  
كلية العلوم الدقيقة و علوم الطبيعة و الحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

**Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master en  
biologie**

**Option : Pharmacologie expérimentale**

**Thème**

**Effet cardioprotecteur de l'extrait ethanologique de la propolis  
contre la toxicité cardiaque induite par l'aflatoxines B1  
chez le rat**

**Membres de jury :**

- Président : M<sup>me</sup> Lamia BENGUEDOUAR
- Examinateur : Dr. Hocine RECHRECHE
- Encadreur : M<sup>me</sup> Hassiba ROUIBAH

**Présenté par :**

- Assia BOUBERTAKH
- Rokia BOUHALLOUS
- Dahbia AIBECHÉ

**Année universitaire : 2011-2012**

## Remerciements

*On tient d'abord à remercier Dieu, le plus puissant, de nous avoir donné le savoir et la faculté de pouvoir poursuivre nos études et de réaliser ce travail.*

*Ce travail a été effectué au laboratoire de pharmacologie et de toxicologie de la faculté des sciences de l'université de Jijel.*

*Un méga énorme merci à M<sup>me</sup> Hassiba RUIBAH, maître de conférences à l'université de Jijel, d'avoir accepté de diriger ce travail. On est très reconnaissantes envers elle pour son aide, ses conseils, sa compétence et sa présence malgré ses circonstances.*

*On remercie infiniment M<sup>me</sup> Lamia BENGUEDOUAR, maître de conférences à l'université de Jijel, d'avoir accepté de présider le jury.*

*On remercie vivement le Dr. Hocine RECHRECH, maître de conférences à l'université de Jijel, d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*On remercie très sincèrement M<sup>me</sup> Widad KEBBA, maître de conférences à l'université de Jijel, pour sa précieuse aide durant les moments les plus difficiles. Que dieu la bénisse !*

*Un merci spécial au Pr. Mesbah LAHOUEL, maître de conférences de l'université de Jijel, de nous avoir fourni l'aflatoxine et qui nous donne la chance de travailler sur ce produit, mais aussi son aide et sa gentillesse.*

*Un méga gigantesque merci à nos parents à la fois pour leur soutien infatigable, leur patience admirable et leur affection continuelle.*

*Un immense merci à tous nos très chers enseignants, pour leur précieuse aides, et pour leurs encouragements.*

*Un méga énorme merci à nos très chères amies et collègues, aussi bien pour leur amitié que pour leur fidélité, qui ont grandement contribué à entretenir un climat de confiance.*

*En fin, On remercie tout ce qu'ont collaboré de pré ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## Sommaire

Liste des abréviations .....	v
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux .....	viii
I. Introduction .....	1
II.1. Le cœur, anatomie et physiologie.....	4
II.2. Rôle des ROS dans les maladies cardiaques.....	5
II.3. Les biomarqueurs cardiaques.....	5
II.3.1. La lactate déshydrogénase (LDH).....	5
II.3.2. La créatine phosphokinase totale (CPK ou CK).....	5
II.3.3. L'aspartate aminotransférase (transaminase glutamate oxaloacétate .....	6
II.2. Les espèces réactives de l'oxygène (EOR).....	7
II.2.1. Source et formation.....	7
II.2.1.1. Sources endogènes.....	8
II.2.1.1.1. Sources exogènes.....	10
II.2.3. Le stress oxydatif.....	11
II.2.4. Dégâts oxydatifs.....	11
II.2.4.1. La peroxydation des lipides.....	11
II.2.4.2. L'oxydation des protéines.....	11
II.2.4.3. Dommage oxydatif de l'ADN.....	12
II.2.5. Rôle physiologique de l'entité oxydante.....	12
II.2.6. Système de défense antioxydants.....	12
II.2.6.1. Les antioxydants enzymatiques.....	13
II.2.6.2. Les antioxydants non-enzymatiques.....	15
II.3. L'aflatoxine B1.....	17
II.3.1. Pharmacocinétique.....	18
II.3.2. Mode de la toxicité.....	19
II.3.3. Mécanisme de la toxicité .....	20
II.4.1 Les polyphénols.....	21
II.4.2. Classification des polyphénols.....	21
II.4.3. Biosynthèse .....	23
II.4.4. La biodisponibilité des polyphénols .....	23
II.4.5. Activité antioxydante des polyphénols.....	24
II.4.5.1. Inhibition enzymatique .....	24
II.4.5.2. Chélation des ions métalliques .....	25
II.4.5.3. Le piégeage direct des ROS .....	25
II.4.6. La propolis comme source de polyphenols.....	26
III. Matériel et méthode.....	28
III.1. Matériel végétal .....	29
III.1.1. Dosage des polyphénols totaux.....	29
III.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	29
III.1.3. Analyse de la propolis par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (CPG/SM). .....	30
III.1.4. Mesure de l'effet <i>scavenger</i> ou piégeur des ROS du DPPH <i>in vitro</i> .....	30
III.2. Animaux.....	31
III.2.1. Traitement.....	31
III.2.2. Étude qualitatif de L'AFB1 par l'HPLC dans le sang et les urines.....	32
III.2.3. L'évaluation de l'effet cardioprotecteur de l'extrait éthanolique de la propolis.....	32
III.2.3.1. Dosage des paramètres biochimiques.....	32
III.2.3.2. Dosage des paramètres du stress.....	32

IV. Résultat et discussion.....	38
V. Conclusion .....	64
Référence.....	66
Annexe	
Résumé	

## Liste des abréviations

<b>A</b>	Absorbance
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADP</b>	Adénosine di-phosphate
<b>AFB1</b>	Aflatoxine B1
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Trichlorure d'aluminium
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CPG</b>	La chromatographie en phase gazeuse
<b>CPK</b>	La créatine phosphokinase
<b>DO</b>	Densité optique
<b>DPPH</b>	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>DTNB</b>	5-5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)
<b>EEP</b>	Extrait éthanolique de la propolis
<b>Eq</b>	Equivalent
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>ECG</b>	Electrocardiogramme
<b>FAD</b>	Flavine adénine dinucleotide
<b>G</b>	Gramme
<b>GR</b>	Glutathion réductase
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>GSH-Px</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSSG</b>	Glutathion oxydé
<b>GST</b>	Glutathion-s-transférase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HO•</b>	Radical hydroxyle
<b>HOCl</b>	Acide hypochlorique
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>L</b>	Litre
<b>LDH</b>	Lactate déshydrogénase
<b>MAC</b>	Maladies des artères coronaires
<b>MDA</b>	Malonyldialdéhyde
<b>Mg</b>	Milligramme
<b>MMPs</b>	Métalloproteinases matricielles
<b>MPO</b>	Myéloperoxydase
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotineamide adenine dinucléotide
<b>NADH,H<sup>+</sup></b>	Nicotineamide adenine dinucléotide réduit
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotineamide adenine dinucléotide phosphate
<b>NADPH,H<sup>+</sup></b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
<b>NBT</b>	Nitro blue Tetrazolium
<b>NO•</b>	Oxyde nitrique
<b>NOS</b>	Monoxyde d'azote synthase
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion superoxyde
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxygène singulet
<b>ONOOH</b>	Nitroperoxyde
<b>R•</b>	Radical d'acide gras
<b>RH</b>	Acide gras polyinsaturé

<b>ROO•</b>	Radical peroxy
<b>RH</b>	Acide gras polyinsaturé
<b>ROO•</b>	Radical peroxy
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species
<b>SOD</b>	Superoxyde dismutase
<b>TBA</b>	Acide thiobarbiturique
<b>TBARS</b>	Thiobarbituric acid-reactive substances
<b>TCA</b>	Acide trichloroacétique
<b>TGO</b>	Transaminase glutamate oxaloacétate
<b>TNB</b>	Thionitrobenzoïque
<b>UI</b>	Unité internationale
<b>UV</b>	Ultra violet
<b>µg</b>	Microgramme

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b>	Localisation anatomique du cœur.....	3
<b>Figure 2 :</b>	Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants.....	11
<b>Figure 3 :</b>	Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métallique.....	14
<b>Figure 4 :</b>	Structure chimique de l'aflatoxine B1.....	17
<b>Figure 5 :</b>	Biotransformation de phase I.....	19
<b>Figure 6 :</b>	Squelette de base des flavonoïdes.....	22
<b>Figure 7 :</b>	Les sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $Me^{+2}$ ) par les Flavonoïdes.....	25
<b>Figure 8 :</b>	Piégeage des ROS par les flavonoïdes.....	26
<b>Figure 9 :</b>	Les chromatogrammes de la propolis des trois régions.....	40
<b>Figure 10:</b>	Pouvoir antiradicalaire d'extrait ethanoliq. de la propolis d'Ouedjena, de l'acide gallique et la quercétine .....	43
<b>Figure 11:</b>	Pouvoir antiradicalaire d'extrait ethanoliq. de la propolis d'El-Milia, de l'acide gallique et la quercétine .....	43
<b>Figure 12:</b>	Pouvoir antiradicalaire d'extrait ethanoliq. de la propolis d'El-Milia, de l'acide gallique et la quercétine .....	44
<b>Figure 13:</b>	Le pic de l'AFB1 détecté par HPLC.....	45
<b>Figure 14:</b>	Les chromatogrammes de l'AFB1 dans le sang détecté par HPLC chez le témoin et le groupe traité par l'AFB1 après 24h .....	45
<b>Figure 15:</b>	Les chromatogrammes de l'AFB1 dans le sang détecté par HPLC chez les deux groupes prétraités après 24h .....	46
<b>Figure 16 :</b>	Les chromatogrammes de l'AFB1 dans les urines détectés par HPLC chez le témoin et le groupe traité par l'AFB1 après 24h .....	46
<b>Figure 17:</b>	Les chromatogrammes de l'AFB1 dans les urines détectés par HPLC après 24 h chez les deux groupes prétraités.....	46
<b>Figure 18:</b>	L'activité sérique de LDH chez tous les groupes après 24 h et 72 h de l'administration de l'AFB1.....	48
<b>Figure 19:</b>	L'activité sérique de CPK chez tous les groupes après 24 h et 72 h de l'administration de l'AFB1 .....	49
<b>Figure 20:</b>	L'activité sérique de la TGO pour tous les groupes mesurés après 24 h ,48 h et 72 h de l'administration de l'AFB1.....	51
<b>Figure 21:</b>	Les valeurs plasmatiques des protéines de pour tous les groupes mesurés après 24 h ,48 h et 72 h de l'administration de l'AFB1.....	52
<b>Figure 22:</b>	Variation des taux du MDA cytosoliques cardiaques après 7 jours de l'administration de l'AFB1.....	54
<b>Figure 23:</b>	Variation des taux du GSH cytosoliques cardiaques après 7 jours de l'administration de l'AFB1.....	57
<b>Figure 24:</b>	Dosage de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique .....	59
<b>Figure 25:</b>	Dosage de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique.....	60
<b>Figure 26:</b>	Dosage de l'activité enzymatique de la GST cytosolique.....	62

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b>	Espèces réactives de l'oxygène.....	8
<b>Tableau 2:</b>	Quelque propriétés physicochimiques de l'AFB1.....	18
<b>Tableau 3:</b>	Représentation des principales classes des flavonoïdes avec leurs exemples et structures.....	22
<b>Tableau 4:</b>	Les pourcentages des extraits par rapport à la quantité initiale de la propolis.....	38
<b>Tableau 5:</b>	La teneur en polyphénols et flavonoïdes des différents échantillons de la propolis.....	38
<b>Tableau 6:</b>	Les acides aliphatiques (pourcentages et temps de rétention).....	41
<b>Tableau 7:</b>	Les acides aromatiques (pourcentages et temps de rétention).....	41
<b>Tableau 8:</b>	Les flavonoïdes (pourcentages et temps de rétention).....	42
<b>Tableau 9:</b>	Les pourcentages des autres composés et les composés non identifiés.....	42

## I. Introduction

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques. Toutefois, il peut former des espèces partiellement réduites et fortement toxiques appelées les radicaux libres ou encore les espèces réactives oxygénées (ERO). Aux doses faibles, les ERO sont très utiles pour l'organisme et jouent des rôles important dans divers mécanismes physiologiques tels que la transduction du signal. Aux doses excessives, les ERO deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme. La surproduction des ERO au-delà des capacités antioxydantes, des systèmes biologiques donne lieu au stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies telles que les maladies cardiaques l'athérosclérose, les ischémies et l'infarctus de myocarde.

Les aflatoxines sont des métabolites produits par des moisissures du genre *Aspergillus* et plus particulièrement *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* dont le plus redoutable c'est l'aflatoxine B1, durant son processus métabolique elle contribue à la génération des espèces réactives de l'oxygène. La toxicité de l'aflatoxine B1 a été intensivement étudiée au niveau du foie en tant qu'un potentiel hépatocarcinogène et hépatotoxique. Cependant, son mécanisme de toxicité n'est pas entièrement compris. Des études récentes ont indiqué l'implication de l'aflatoxine B1 dans la dérégulation de certaines voies métaboliques cardiaques. Cependant, jusqu'à présent aucun mécanisme moléculaire n'a été proposé pour expliquer les dommages oxydatifs de l'aflatoxine B1 au niveau du cœur.

La propolis ou la colle d'abeille est un mélange complexe de plusieurs composés organiques et inorganiques, utilisé par l'abeille comme colle, enduit et antibiotique. Cette matière balsamique gommeuse a attiré l'attention de l'homme depuis l'antiquité. Dans le monde entier, de nombreuses études sont consacrées à la propolis, source important de composés phénoliques, notamment les flavonoïdes. Ces composés sont impliqués dans plusieurs mécanismes antioxydants grâce à leurs structures et leurs potentiels redox. Dans ce contexte, s'inscrit ce travail dont l'objectif vise d'une part à étudier l'effet cardiotoxique de l'aflatoxine B1 et d'autre part à évaluer l'effet préventif de l'extrait de la propolis contre cette toxicité induite *in vivo* chez le rat.

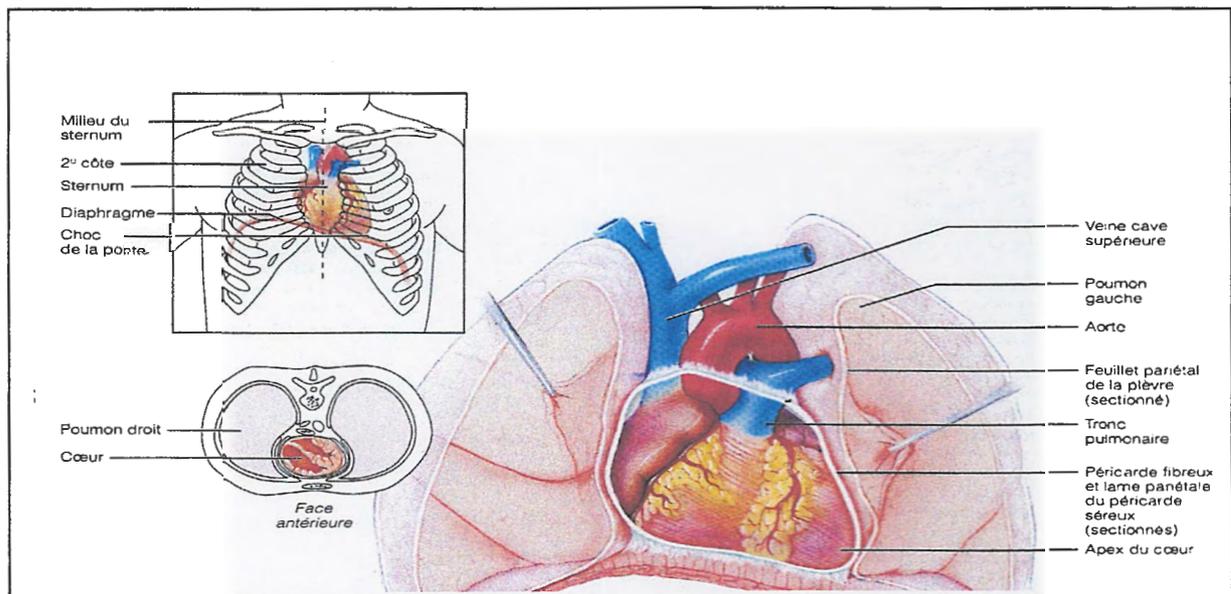
Notre stratégie expérimentale a été basée sur l'étude de la cardiotoxicité de l'aflatoxine B1, analyse chimique de différents échantillons de la propolis et l'évaluation de l'effet antioxydant et cardioprotecteur de l'extrait brute de la propolis.

# **II- Analyse bibliographique**

## II.1. Le cœur, Anatomie et physiologie

Le cœur est une machine infatigable dont la paroi musculaire se contracte rythmiquement tout au long de l'existence, ne se reposant que pendant de brèves pauses entre les contractions (Unglaub D. et al., 2007). Cette machine est une pompe creuse musculaire puissante. L'anatomie du cœur décrit sa structure, sa localisation et sa forme (Cabasson A., 2008).

Le poids du cœur varie entre 250 et 350 g. Le cœur est logé à l'intérieur du thorax osseux est bordé latéralement par les poumons (figure 1). L'apex du cœur pointe vers le bas en direction de la hanche gauche et repose sur le diaphragme, à la hauteur du cinquième espace intercostal. La base du cœur, sa face postéro-supérieure, plus large est le point d'émergence de tous les gros vaisseaux du corps; située en dessous de la deuxième côte, elle fait à l'épaule droite (Elaine N., 2005).



**Figure 1: Localisation anatomique du cœur (Elaine N., 2005)**

Le cœur est enveloppé dans une membrane sérofibreuse à double paroi appelée le péricarde. Il comprend deux parties : le péricarde fibreux et le péricarde séreux. La paroi cardiaque est constituée de trois couches ; l'endocarde, le myocarde et l'épicarde (Abraham L., 2006).

Le cœur est constitué de deux parties ; cœur droit et cœur gauche. Chacune est formée de deux cavités oreillette et ventricule et munie des artères coronaires et des veines qui l'entourent (RossBoyd D. et Chairman V., 1995 ; Ramé A. et Thérond S., 2007).

La capacité de dépolarisation et contraction du muscle cardiaque est intrinsèque, c'est à-dire qu'elle ne repose pas sur le système nerveux. En effet, même lorsqu'il s'est détaché de toutes ses connexions nerveuses, le cœur continue de battre régulièrement (Elaine N., 2005).

L'activité du cœur est due à deux facteurs : la présence de jonctions ouvertes et le système de commande «intégré » du cœur (système de conduction du cœur) (Elaine N., 2005).

Le tracé des changements électriques enregistrés durant chaque cycle cardiaque est appelé électrocardiogramme. Il est composé d'ondes suivantes : une onde P (dépolarisation auriculaire), un complexe QRS (début de la dépolarisation ventriculaire), l'intervalle PQ représente le temps de conduction entre le début de l'excitation auriculaire et le début de l'excitation ventriculaire et le segment S-T représente la phase de dépolarisation complète des myocytes contractiles ventriculaires (Gerard J. et Bryan A., 2007).

## II.2. Rôle des ROS dans les maladies cardiaques

Un apport constant de l'oxygène est indispensable pour la viabilité et le fonctionnement cardiaque. Cependant, le rôle de l'oxygène dans le cœur est complexe, il peut être bénéfique ou contribuer au dysfonctionnement cardiaque, car l'oxygène est un participant critique de la formation des ROS et de nombreux processus cellulaires. Des études sur le cœur ont indiqué que même les brèves expositions aux ROS ont comme conséquence, une diminution de phosphate à haute énergie, perte de fonction contractile et causent des anomalies structurales. Les ROS sont capable de réagir avec les lipides insaturés et l'initiation des chaînes de réactions de peroxydation des lipides membranaires (Wattanapitayakula S. K. et Bauerb J. A., 2001).

Etant donné que les maladies des artères coronaires (MAC) sont consécutives de l'ischémie de myocarde et de la nécrose, elles sont l'une des principales causes de l'insuffisance cardiaque.

Il est important de noter que les ROS peuvent jouer un rôle important dans la genèse et la progression de (MAC). En effet, les ROS contribuent à la formation des LDL oxydés, des contributeurs majeur à la pathogenèse de l'athérosclérose, les ROS associés à l'activation des métalloproteinases matricielles (MMPs) qui peuvent jouer un rôle important dans la rupture des plaques, initiateurs de la thrombose et l'occlusion coronarienne (Aurino de pinho R. et al., 2010). Dans le cadre de l'infarctus de myocarde (IDM), les ROS sont censés à jouer un rôle important dans la nécrose tissulaire causant des lésions du myocarde, l'IDM est un déterminant majeur du fonctionnement cardiaque et d'éventuelle progression vers l'insuffisance cardiaque. Ce qui concerne l'hypertrophie cardiaque, les ROS peuvent contribuer au processus de remodelage dans un certains nombres de façon y compris l'activation de MMPs qui participent à la

reconfiguration de la matrice extracellulaire, agissant en tant que molécule de signalisation dans le développement de mesures compensatoires d'hypertrophie cardiaque (Giordano F. J., 2005).

### II.3. Les biomarqueurs cardiaques

Les biomarqueurs cardiaques existent à l'heure actuelle de nombreux marqueurs biologiques de la souffrance cardiaque permettant un diagnostic rapide et plus souvent une datation de l'atteinte. Ils sont classés en deux catégories : marqueurs de l'atteinte aiguë (infarctus du myocarde) et marqueurs de l'atteinte chronique (dysfonctionnements ventriculaires et insuffisance cardiaque). Un bon marqueur cardiaque est un paramètre biologique mesurable dans le sang, qui a une bonne spécificité au tissu myocardique, une bonne sensibilité, facilement mesurable par une technique rapide d'application, facile à mettre en œuvre, fiable et peu coûteux.

#### II.3.1. La lactate déshydrogénase (LDH)

La lactate déshydrogénase est une enzyme cytoplasmique qui catalyse la transformation du pyruvate en lactate en présence de  $\text{NAD}^+/\text{NAD}$  selon la réaction ci-dessous (Shoei-Lung Li S., 1989 ; Jiang A. et al., 2000).



Le muscle cardiaque contenant la LDH qui est utilisée dans le diagnostic d'infarctus du myocarde. Suite d'un infarctus, l'activité de LDH totale dans le sérum augmente de 12 à 18 heures après les premiers symptômes, atteint son maximum après 48 à 72 h et revient à des valeurs proche de la normale après 6 à 10 jours (Frédérique P. et al. 2010).

#### II.3.2. La créatine phosphokinase totale (CPK ou CK)

La créatine phosphokinase (CK) est une enzyme intracellulaire qui catalyse la phosphorylation réversible de créatine en créatine phosphate par le complexe  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP (Frédérique P. et al., 2010). Trois isoenzymes de cette enzyme, avec deux sous-unités appelés M (pour muscle) et B (brain : cerveau), ont été identifiées. La CPK existe donc sous forme de trois isoenzymes: le CK-MM, la CK-BB et la CK-MB qui est l'enzyme prédominant dans le tissu myocardique. Le dosage de la créatine kinase totale dans le sérum mais surtout de son isoenzyme cardiospécifique CK-MB est utilisé dans le diagnostic de l'infarctus de myocarde. En effet, elle est déchargée rapidement dans un délai de 4 à 6 heures dans la circulation après l'infarctus, elle fait une pointe à 24 heures et retour aux niveaux normaux de 36 à 72 heures (Wallimann T. et al., 1992 ; Mclean A.S. et al., 2009).

**II.3.3. L'aspartate aminotransférase (transaminase glutamate oxaloacétate TGO=AST)**

L'aspartate aminotransférase est une enzyme intracellulaire qui catalyse le transfert réversible du groupe aminé  $-NH_2$  sur l'acide alpha acétique. Cette enzyme se retrouve dans de nombreux tissus, principalement le cœur, le foie, les reins, le pancréas, les poumons, muscles squelettiques et les érythrocytes (Reynier C., 2011). Son activité la plus élevée se retrouve au niveau du cœur d'où l'intérêt d'inclure l'AST dans le bilan cardiaque pour le diagnostic de l'infarctus. Elle est déchargée des 6 heures de l'atteinte, et fait une pointe de 24 à 48 heures et retour aux niveaux normaux de 4 à 5 jours (Frédérique P., 2010).

## II.2. Les espèces réactives de l'oxygène (EOR)

Les espèces oxygénées réactives incluent les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc...) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote (Delattre J., 2003 ; Belkheiri N., 2010). Les principales espèces réactives de l'oxygène sont regroupées dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Espèces réactives de l'oxygène (Bertrand., 2009).**

	Non	Symbole
Espèces radicalaires	Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
	Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
	Monoxyde d'azote	$NO^{\cdot}$
Espèces non radicalaires	Peroxydes d'hydrogènes	$H_2O_2$
	Acide hypochlorique	$HOCl$
	Oxygène singulier	$^1O_2$
	Peroxyde d'azote	$ONOO^-$

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant au moins un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche externe et sont en générale très réactifs et instables (Valko M. et al. 2006 ; Maquart P.K. et al. 2006). La présence de cet électron confère à ces molécules une grande possibilité d'oxyder ou de réduire de nombreux composés afin de stabiliser leur orbital externe (Ronald M., 2011).

### II.2.1. Source et formation des EOR

Notre organisme est soumis à l'agression de différent agents capables de donner naissance à des radicaux libres, essentiellement des espèces de l'oxygène dont la formation est liée aussi bien à des facteurs exogènes qu'endogènes (Valko M. et al., 2006).



## II.2. Les espèces réactives de l'oxygène (EOR)

Les espèces oxygénées réactives incluent les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde, radical hydroxyle, monoxyde d'azote, etc...) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde d'azote (Delattre J., 2003 ; Belkheiri N., 2010). Les principales espèces réactives de l'oxygène sont regroupées dans le tableau 1.

**Tableau 1 : Espèces réactives de l'oxygène (Bertrand., 2009).**

	Non	Symbole
Espèces radicalaires	Anion superoxyde Radical hydroxyle Monoxyde d'azote	$O_2^{\bullet-}$ $OH^{\bullet}$ $NO^{\bullet}$
Espèces non radicalaires	Peroxydes d'hydrogènes Acide hypochlorique Oxygène singulier Peroxynitrite	$H_2O_2$ $HOCl$ $^1O_2$ $ONOO^-$

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) possédant au moins un électron célibataire (ou non apparié) sur leur couche externe et sont en générale très réactifs et instables (Valko M. et al. 2006 ; Maquart P.K. et al. 2006). La présence de cet électron confère à ces molécules une grande possibilité d'oxyder ou de réduire de nombreux composés afin de stabiliser leur orbital externe (Ronald M., 2011).

### II.2.1. Source et formation des EOR

Notre organisme est soumis à l'agression de différent agents capables de donner naissance à des radicaux libres, essentiellement des espèces de l'oxygène dont la formation est liée aussi bien à des facteurs exogènes qu'endogènes (Valko M. et al., 2006).

### II.2.1.1.Sources endogènes

Dans notre organisme il ya plusieurs réactions biochimiques susceptibles d'être à l'origine d'une production des radicaux libres oxygénés. Les sources de ces ROS sont enzymatiques et non enzymatiques (Valko M.et al., 2006).

#### II.2.1.1.1. NAD(P)H oxydase

La NAD(P)H oxydase est une enzyme localisée au niveau de la membrane cytoplasmique. Chez les phagocytes on la trouve aussi dans la membrane du phagosome et aussi dans la membrane des granules des neutrophiles (Wattanapitayakul S.K. et Bouer A.J., 2007 ; Spooner R. et Yilmaz O., 2011). La NAD(P)H oxydase permet de catalyser la réduction monoélectrique de l'oxygène en utilisant le NADH ou le NADPH intracellulaires comme donneur d'électrons selon la réaction suivante :



Elle joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et dans la lutte contre les micro-organismes (Lagadic L. et al., 1997 ; Servais S., 2004).

#### II.2.1.1.2. La xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme soluble qui génère des ROS en réduisant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Valco M. et al., 2006 ; SinghPP., 2009) cette enzyme est présente dans le sang , les cellules endothéliales des capillaires et de façon très importante dans le foie et les intestins. La localisation cellulaire de cette enzyme est principalement cytoplasmique. La production des ROS par la xanthine oxydase est faible en condition basale, mais jouerait un rôle important dans l'ischémie -reperfusion (Servais S., 2004).



#### II.2.1.1.3. La NO synthase

C'est une enzyme responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) à partir de l'atome d'azote terminale d'une L-arginine en présence de l'oxygène et de différents cofacteurs comme le nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADPH) et la flavine adénine dinucleotide (FAD) (Gaté L.et al. 1999 ; Wendy K., 2001) selon la réaction suivante :

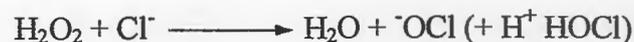


#### II.2.1.1.4. Le peroxyosome

Le peroxyosome intervient dans la production cellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> car cet organelle contient de nombreuses enzymes générant du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Toutefois, ce dernier est utilisé comme substrat pour la catalase peroxyosomale afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présente dans le foie et le rein. Il semble cependant que seule une faible quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit au niveau de peroxyosome pourrait échapper à la catalase (Servais S., 2004 ; Garait B., 2006).

#### II.2.1.1.5. Les lysosomes

Les lysosomes sont des vésicules sphériques entourées de membranes et sont situées dans le cytosol. Ils servent à détruire les différentes particules exogènes grâce à la myéloperoxydase (MPO) lysosomale qui est responsable de la formation de l'agent bactéricide, l'acide hypochloreux.



L'acide hypochloreux peut engendrer d'autres ERO par d'autres réactions. L'intérêt actuel pour la MPO au cours du stress oxydant résulte de sa fonction primordiale dans la transformation du peroxyde d'hydrogène en d'autres espèces de l'oxygène hautement réactives (Bouayed J., 2007).

#### II.2.1.1.6. Les ions métalliques

Les ions du fer (Fe<sup>2+</sup>) et de cuivre (Cu<sup>2+</sup>) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Ils peuvent être, soit des constituants des hémoprotéines, soit des cofacteurs des différentes enzymes du système de défense antioxydant (Fe<sup>2+</sup> pour la catalase et Cu<sup>2+</sup> pour la superoxyde dismutase). Mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réaction de peroxyde d'hydrogène selon la réaction de fenton (Ercal N., 2001).



#### II.2.1.1.7. La mitochondrie

Elle est considérée comme une des principales sources des ROS dans la cellule par le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Essentiellement à travers la fuite des électrons au niveau de complexe I et III (Le Bras M., 2004 ; Andreyev A. Yu., 2005). Au niveau du complexe I, un centre fer/souffre serait la source de l'addition directe d'un électron à l'oxygène ou indirecte via la réduction de quinones exogènes hydrophiles. Ces quinones alors

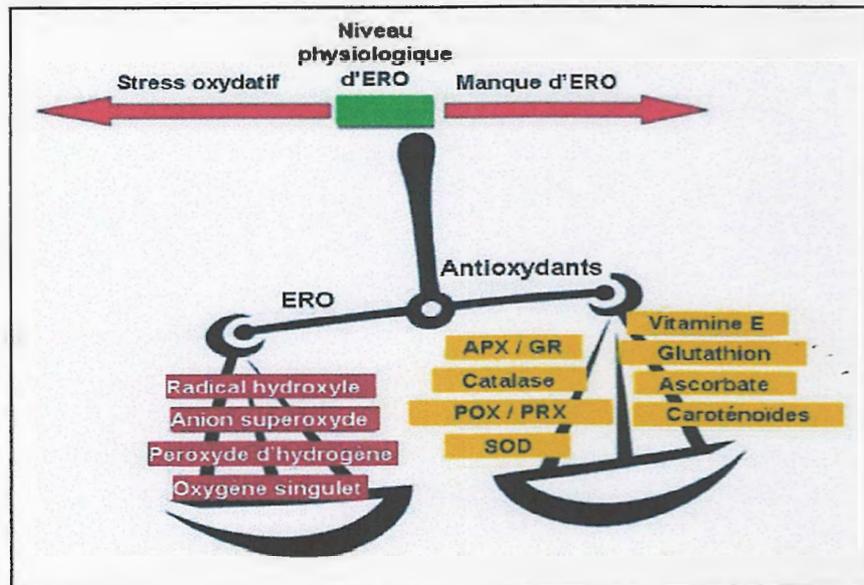
sous la forme semiquinone sont très instable et peuvent réduire l'oxygène en  $O_2^{\bullet-}$ . Au niveau de complexe III, le coenzyme Q sous sa forme ubisemiquinone  $QH^{\bullet}$  est responsable de la production d' $O_2^{\bullet-}$  qui peut être transformé en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) puis en radicale hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) (Kowaltowski A.J. et al., 2009; Murphy M. P., 2009 ; Hamanaka R. B. et Chandel N. S., 2010).

### II.2.1.2.Sources exogènes

L'organisme humain soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des radicaux libres. Les rayonnements UV Conduisant à la synthèse de radicaux libres ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $^1O_2$ ) et de molécules génératrices des radicaux libres ( $H_2O_2$ ) par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Les radiations ionisantes qui peuvent générer les radicaux libres dérivés de l'oxygène (Pouget J.P., 2000). L'ingestion d'alcool est suivie la formation des radicaux libres selon divers mécanisme ; la xanthine oxydase et l'aldehyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde avec production d' $O_2^{\bullet-}$  (Defeng W. et Arthur I.C., 2003 ; Dennis R. K., 2006). Les toxiques dont les plus réponsus sont l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>), présents dans notre environnement, participent à la formation de radicaux libres. Les médicaments Comme les anthracyclines et la doxorubicin sont également capable de générer des radicaux libres et la formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action et de leur toxicité (Schimmeli K. et al., 2004 ; Ferreira A. et al., 2008)

### II.2.3. Le stress oxydatif

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre le système oxydants (radicaux libres) et antioxydant en faveur des radicaux libres entraînant des dommages cellulaires (Barouki R., 2006 ; Storz G. et Imlay J.A., 1999). Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agent pro-oxydant d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydant ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Guye P., 2007 ; Touati S., 2010). Ce déséquilibre entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire (figure 2) (Soarais A., 2005).



**Figure 2 : Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants**  
(Bertrand P., 2008).

#### II.2.4. Dégâts oxydatifs

Les dommages induits par les ROS sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines et des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (Haton C., 2005).

##### II.2.4.1. La peroxydation des lipides

Les cibles des ROS sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence de nombreuses double liaisons comme l'acide linoléique ou l'acide eicosapenténoïque (Niki A. et al., 2005). Les membranes riches en acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Garait B., 2006). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs, la plupart des aldéhydes produits après la lipoperoxydation sont le 4-hydroxynonanal (4HNE), le dialdéhyde malonique (MDA) et les acides thiobarbituriques (TRABS). Ils réagissent avec des antioxydants comme le glutathion, augmentant le stress radicalaire, mais aussi permettant de ce fait leur détoxification (Min B. et Ahn D.U., 2005).

##### II.2.4.2. L'oxydation des protéines

Presque tous les acides aminés peuvent être oxydés par les ERO, en effet, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine et tryptophane) sont les plus sensibles (Viljanen K., 2005), l'oxydation des protéines provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Garait B., 2006 ; Haton C., 2005). Ces réactions d'oxydations sont

fréquemment influencées par les cations métalliques comme le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  (Garait B., 2006). Elles sont classées en deux catégories: celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne peptidique, et celles qui modifient des peptides par addition de produit issus de la peroxydation lipidiques comme le 4HNE (Servais S., 2004). Ces changements conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité à la protéase ...) (Garait B., 2006).

#### **II.2.4.3. Dommage oxydatif de l'ADN**

L'oxydation des différents constituants de l'ADN induit la formation de 4 grandes catégories de lésions : les coupures simples et doubles brins, la modification de bases, la formation de sites abasiques et les pontages ADN-protéines (Garait B., 2006 ; Haton C., 2005). Les ERO sont à l'origine d'une grande variété de dommages de bases comme la 8-oxo-7,8-dihydroxyguanine (8-oxoG), résultant de l'addition d'un radical hydroxyle sur le C8 d'une guanine. Ce dérivé de la guanine est une liaison prémutagénique, car si elle n'est pas réparée à temps, elle induit durant la réparation de l'ADN un mésappariement conduisant à la transversion de la guanidine en thymine. L'attaque de l'ADN par des radicaux libres ouvre le cycle imidazole de la guanine et donne la 2,6-diamino-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FaPyGua). Les 8-oxoG et les FaPyGua sont les lésions prédominantes suite à une attaque radicalaire (Wiseman H. et Halliway B., 1996 ; Gadès-Albert M. 2003).

#### **II.2.5. Rôle physiologique de l'entité oxydante**

Les espèces réactives radicalaires (OH) ou non ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) existant dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurable. Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme (D'Autréaux B. et Toledano M.B., 2007). Elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir dans la défense immunitaire, agir comme un second messager, intervenir dans les voies de transduction du signal et ainsi réguler les fonctions cellulaires (Auberval N., 2010 ; Boonstra J. et Post J.A., 2004).

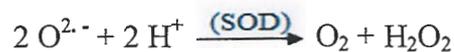
#### **II.2.6. Système de défense antioxydants**

Toute substance capable à concentration relativement faible, de neutraliser ou retarder l'oxydation de substrats est considérée comme un antioxydant (Zarrouki B., 2007).

## II.2.6.1. Les antioxydants enzymatiques

### II.2.6.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxydes dismutases SOD sont des enzymes ubiquitaires réalisant la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Ces enzymes induisent la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Trois formes ont été décrites chez les mammifères : la SOD à cuivre /zinc présent dans le cytoplasme, la SOD à manganèse présente dans les mitochondries et une SOD extracellulaire caractérisée au niveau de la lymphe et du plasma: c'est une SOD à cuivre / zinc (Januel C., 2003 ; Pelomont J., 1993).

### II.2.6.1.2. La Catalase (CAT)

La catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et d'oxygène, en utilisant le fer comme un cofacteur, elle est essentiellement localisée dans les peroxysomes et présente en forte concentration dans le foie et les globules rouges (Jonas N., et Elias S. J.A., 2001 ; Ronald M., 2011).

### II.2.6.1.3. Les glutathions peroxydases (GPx) et réductases (GR)

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec le SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$ . Ce sont majoritairement des séléno-enzymes. elle utilise le glutathion (GSH) comme un cofacteur selon la réaction suivante (Nzengue Y., 2008 ; Maritim A.C. et al., 2002).



La glutathion réductase joue un rôle de régénérer le (GSH) à partir du glutathion disulfure (GSSG) grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction, ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries (Parris M., 1997 ; Garait B., 2006).

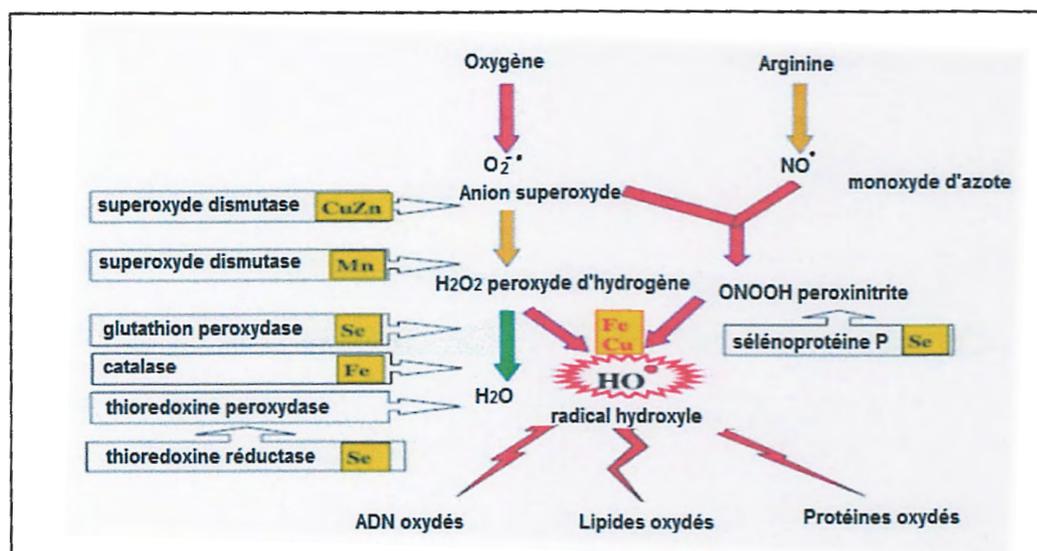
### II.2.6.1.4. La glutathions-S-transférase (GST)

Glutathion S-transférase est une famille des enzymes multifactorielles présentes chez tous les organismes (Renuka W. et al., 2003). La GST est un système très important dans la protection de la cellule contre les espèces réactives de l'oxygène, par sa capacité de conjugaison avec les composés électrophiles et la réduction des peroxydes (Zhihua J. et al., 2004 ; Gattas G. et al., 2004). En plus elle est associée avec d'autres processus biologiques. En effet, quelques GST sont impliquées dans la modulation des canaux ioniques (Dulhunty A. et al., 2001), d'autres dans la synthèse des eicosanoïdes, leukotriènes et les prostaglandines (Bartling D. et al., 1993 ; Fernandez-Canon J. et Penalva M., 1998). L'activité de conjugaison du GST avec les composés électrophiles est présentée comme suit:



### II.2.6.1.5. Les thiorédoxines

Elles sont localisées dans les mitochondries, le cytosol, les peroxysomes et sont associées aux noyaux et aux membrane, grâce à leur activité peroxydase, elle neutralise le peroxyde d'hydrogène, le peroxydite et de nombreux hydroperoxydes, malgré une activité plus faible que le GPx la lactase, elle pourraient jouer un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes, du fait de leur quantité importante (0.6 à 0.8 % de protéines solubles cellulaires) et de leurs distribution large dans la cellule (figure : 3 ) (Zarrouki B.,2007).



**Figure 3: Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métallique (Zarrouki B., 2007).**

## II.2.6.2. Les antioxydants non-enzymatiques

### II.2.6.2.1. La vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédantes des activités biologiques identiques à celle de la famille des tocophérols. Sa forme naturelle inclut quatre tocophérols isomères ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) avec une activité antioxydante variable. L'alpha-tocophérol ( $\alpha$ -TOCH) est la forme la plus active de la classe des tocophérols (Pastre C., 2005 ; Finaud J. et al., 2006). Cette vitamine protège les membranes lipidiques contre la peroxydation lipidique. Elle réagit directement sur les peroxydes ce qui produit à son oxydation en radical tocophérol selon la réaction ci-dessous (Veach J., 2004). La vitamine C et / ou le glutathion réagissent en synergie avec la vitamine E permettant ainsi sa régénération par la réduction du radical tocophérol. (Bouayed J., 2007).



### II.2.6.2.2. La vitamine C

La vitamine C ou acide ascorbique (AA) est un antioxydant hydrosoluble, présent sous sa forme anionique (AH<sup>-</sup>) au PH physiologique. Elle est capable de réagir directement sur les ROS et en particulier  $\text{O}_2^{\bullet-}$  selon la réaction ci-dessous (Blokhina O. et al., 2003). Elle limite la peroxydation lipidique en piégeant les radicaux peroxy et assure la régénération de la vitamine E par réduction spontanée du radical tocophéryl (Barus C., 2008 ; Iqbal KH. et al., 2004).



### II.2.6.2.3. Le zinc

Cet oligo-élément est l'un des cofacteurs essentiels de la SOD. Il protège les groupements thiols des protéines, il peut également inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (Koh J., 2010 ; Soares A., 2005).

### II.2.6.2.4. Le sélénium

Le sélénium est un constituant de la glutathion peroxydase, l'enzyme qui joue le rôle intracellulaire antioxydant. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire. Par conséquent la détoxification serait responsable des effets anticancéreux et antiviellissement attribués au sélénium (Zarrouki B., 2007 ; Soares A., 2005).

#### **II.2.6.2.5. L'acide $\alpha$ -lipoïque**

C'est un cofacteur des enzymes impliquées dans le processus de décarboxylation oxydative. (Qiu-Gang M. et al. ,2011) Il exerce son rôle sous forme réduite, l'acide  $\alpha$ -dihydrolipoate. Son utilisation permet de réduire l'effet du stress oxydant (Evans J.L. et Goldfine I.D. ,2000).

#### **II.2.6.2.6. Glutathion (GSH)**

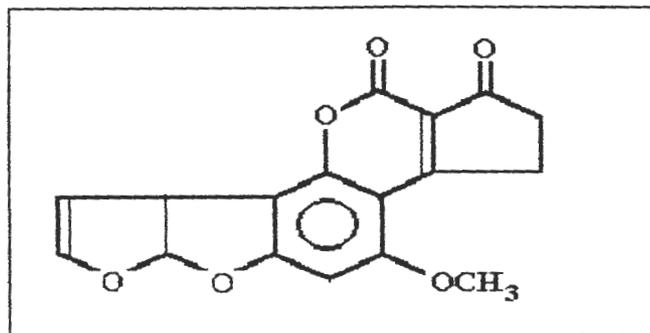
C'est une molécule riche en soufre ce qui lui confère son rôle de piègeur de radicaux libres, et il peut également chélater les ions cuivreux et limiter la réaction de Fenton (Parris M. K., 1997). Il existe des enzymes responsables de la synthèse, de la dégradation ou de recyclage du glutathion. Certaines de ces enzymes ont un rôle crucial pour la stabilisation de ce composé et le maintien de l'équilibre redox. Le glutathion oxydé (glutathion disulfide, GSSG) est réduit par la GSSG réductase. Le statut redox du couple 2GSSG/2GSH constitue un indicateur important du statut redox cellulaire (Townsend D. M. et al., 2003).

### II.3. L'aflatoxine B1

Les aflatoxines sont des mycotoxines extrêmement toxiques, mutagènes et cancérigènes (Fangeat L., 2008). Elles sont des métabolites secondaires synthétisés par des souches *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius* (Verma J., 2004 ; Rawal S., 2010 ; Psoy L., 2010). Elles sont largement abondantes dans les oléagineux, les récoltes du coton et des céréales notamment le blé et le maïs (Zinedine A., 2004 ; Tozlovanu M., 2008). Le stockage de ces aliments dans des conditions humides ou chaudes peut augmenter la synthèse d'aflatoxines (Domngupiapo F. et al., 1989 ; Zinedine A., 2004).

Les aflatoxines constituant un groupe de 18 composés structurellement proches (un assemblage d'une coumarine et de 03 fuomne). Les plus courantes sont l'AFB<sub>1</sub>, l'AFB<sub>2</sub>, l'AFM<sub>1</sub>, l'AFG<sub>1</sub> et l'AFG<sub>2</sub> (Jard G., 2009).

L'aflatoxine B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>) est l'une des plus célèbres mycotoxines possédant le profil toxique le plus sérieux. Généralement le cycle lactone de l'AFB<sub>1</sub> semble être responsable de sa toxicité (figure 4). L'aflatoxine B<sub>1</sub> est la plus étudiée et la plus toxique (Prokofjeva B.G., 2005 ; Jard G., 2009).



**Figure 4 : Structure chimique de l'aflatoxine B1.**

L'aflatoxine B1 est soluble dans certains solvant organiques, très peu soluble dans l'eau et insoluble dans les solvants non polaires (Fremy J.M. et Thormam C., 2004). L'aflatoxine est un composé thermorésistant stable même à des températures de 250 pendant 20 minutes à l'état cristallisé. Le tableau 2 résume quelques propriétés physicochimiques de l'AFB<sub>1</sub> (Zenedine A., 2004).

**Tableau 2 : Quelques propriétés physicochimiques de l'AFB1 (Zenedine A., 2004).**

La propriété	La valeur
Poids moléculaire	312
Température de fusion	268-269°C
Pouvoir rotatoire	-560
RF chloroforme / méthanol	0.56
Formule brute	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>

### II.3.1. Pharmacocinétique

L'absorption de l'aflatoxine B1 se réalise par diffusion passive au niveau du duodénum, elle est importante puisque plus de 70 % des doses administrées par voie orale ont pu être détectées après élimination dans les urines et les fèces. Le volume de distribution de l'AFB1 est relativement faible et se limite aux organes impliqués dans le métabolisme et l'épuration des toxiques, essentiellement le foie et les reins ( Galtier P., 2005).

La phase I de la métabolisation de l'AFB1 correspond au processus de bioactivation par oxydation via des monooxygénase à cytochrome p450, elle est principalement réalisée dans le foie mais la muqueuse gastro-intestinale possède aussi des enzymes capables de bioactiver l'AFB1 (Hussein S., 2001 ; Gonzalo J., 2010), il existerait un rôle prépondérant de l'isoforme cyp 1A2 dans les réactions d'oxydation de l'AFB1 en AFM1 (4-hydroxy AFB1) et AFB1 8,9 éoxyde. Le cyp 3A4 a une affinité plus modeste (Hong J., 2005 ; Even P., 1996 ; Yunus A.w., 2011). L'expression prépondérante de cyp 3A4 en fait un acteur majeur de la métabolisation de l'AFB1 (Guindon K., 2008 ; Gatier P., 2005). L'O-déméthylation de l'AFB1 conduit à l'aflatoxine P1 (AFP1) qui est ensuite détoxiquée par une UDP-glucuronyl-transférase (Ayub M.Y., 1997). L'aflatoxicol est un métabolite issu de la réduction réversible de la fonction céton en C<sub>1</sub> de AFB1 via une réductase NADPH dépendante cytosolique (figure 5) (Gatier P., 2005).

La phase II du métabolisme correspond à la détoxification de l'AFB1 8,9-époxyde, elle est principalement assurée par une réaction de conjugaison réalisée par glutathion S-transférase (GST) sur la fonction époxydes hydrolases conduisant à l'AFB1-dihydrodiol puis à l'AFB1 dialdéhyde ensuite transformé en AFB1-dialcool par l'AFB1 aldéhyde réductase (figure 9) (Galtier P., 2005 ; Ganzalo J., 2010).

Les glutathion -conjugués et glucorono-conjugués sont éliminés majoritairement dans la bile et aussi dans les urines, les adduits aflatoxine-guanine sont aussi retrouvés dans les urines et

peuvent servir de biotraceur comme les adduits aflatoxine-albumine plasmatiques (Galtier P., 2005).

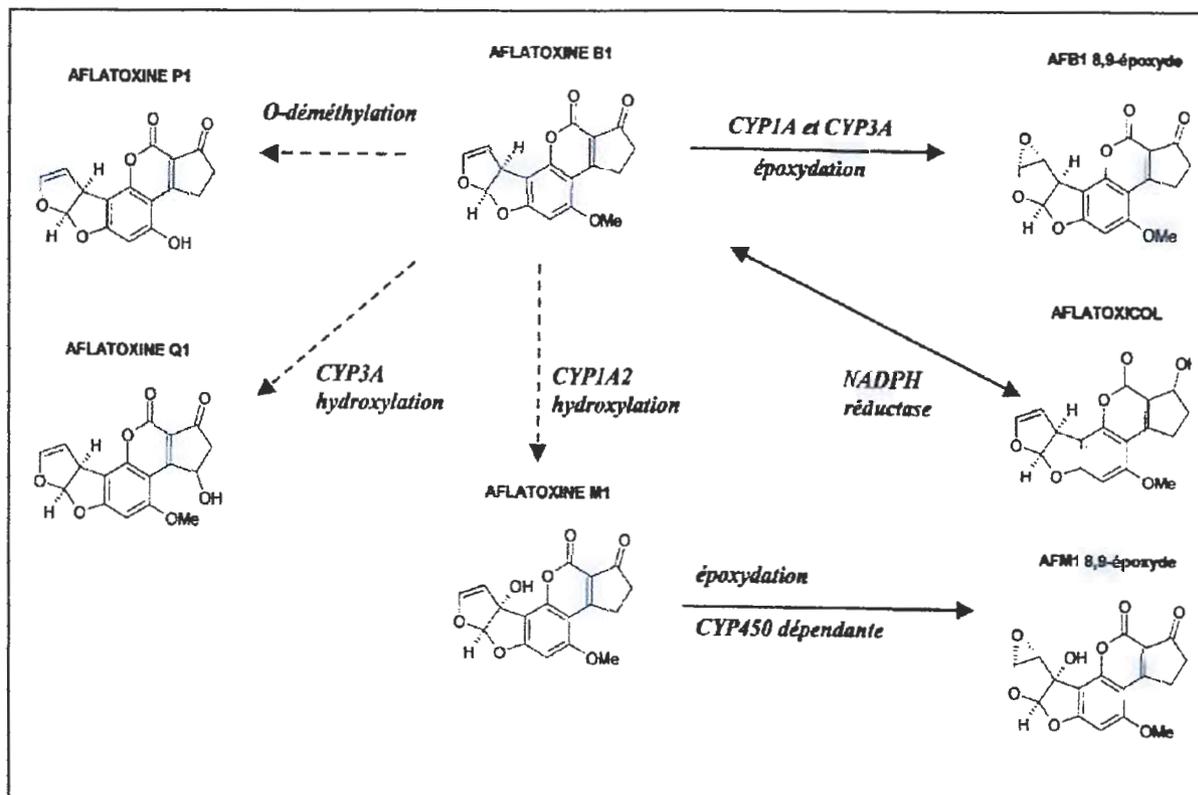


Figure 5 : Biotransformation de phase I (Galtier P., 2005).

### II.3.2. Mode de la toxicité

L'aflatoxicose aiguë se produit suivant l'ingestion des doses élevées des aflatoxines sur une période relativement courte. Ce qui peut inclure l'hémorragie, dommages aigus de foie, œdème, changement de digestion, absorption et/ou métabolisme de nourriture, perte du poids et probablement mort (Petchkongkaew A., 2007). Sur le plan histologique, on retrouve un foie décoloré, de volume augmenté, une prolifération des canaux biliaires, des lésions de nécrose, d'infiltration graisseuse du foie, des hémorragies hépatiques, pulmonaires, rénales et une congestion des poumons (Prokofjeva A. et Brochard G., 2005). L'évaluation classique de la toxicité de ces composés porte sur la détermination des valeurs de LD50 ; la dose létale qui correspond à la concentration capable d'entraîner la mort de la moitié de la population testée, elle est dépendante du sexe, d'âge et du poids des espèces. En effet, elle est de 7 mg/kg par voie orale chez les rats et 9 mg/kg chez les souris (Eaton D. L. et Groopman E. P., 1994 ; Galtier p. et al., 2009).

L'aflatoxicose chronique se produit suivant l'ingestion répétée des doses faibles dans une période prolongée. Les effets peuvent être subcliniques ou difficiles pour reconnaître et peuvent conduire au cancer chez diverses espèces animales (Agag B. I., 2004). En effet, l'AFB1 induit des tumeurs hépatiques aussi, des tumeurs des reins, de la vésicule biliaire, du pancréas, de la vessie, et ils peuvent également avoir lieu des leucémies. La fréquence de tumeurs rénales et d'adénome du colon est augmentée en cas de déficience en vitamine A (Prokof Jeva Brochard G., 2005).

### II.3.3. Mécanisme de la toxicité

Les aflatoxines comptent parmi les substances ayant le potentiel cancérigène et mutagène, l'AFB1 est considérée comme étant le plus puissant cancérigène naturel (Prokofjeva B.G., 2005). Il a des propriétés hépatotoxiques, cardiotoxiques, tératogènes et immunotoxiques et empêche également plusieurs systèmes métaboliques (Al Khoury A., 2007; Ameen Abdulmajeed N., 2010). Le mécanisme de la toxicité de l'AFB1 a été intensivement étudié. En effet, est activée par le système enzymatique hépatique, le cytochrome P450 pour produire fortement un réactif intermédiaire, AFB1-8,9-epoxide qui se lie aux sites nucléophiles dans l'ADN par conséquent l'adduit principal 8,9-dihydro- 8-(N7guanyl)-9-hydroxy-AFB1 (AFB1 N7-Gua) est formé. La formation des adduits d'AFB1-ADN est considérée comme une étape critique dans le déclenchement de la carcinogenèse. Bien que le mécanisme de la toxicité des aflatoxines ne soit pas entièrement compris, plusieurs rapports suggèrent cette toxicité qui peut s'ensuivre par la génération des espèces réactifs de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxide ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyl ( $OH^\bullet$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Pendant le processus de métabolisation de l'AFB1 par le cytochrome P450 dans le foie, ces espèces peuvent attaquer des composés solubles des cellules comme ceux des membranes, ils sont menés par la suite de l'affaiblissement de fonctionnement des cellules et la cytolyse (Ameen Abdulmajeed N., 2010).



## II.4. Les polyphénols

Les polyphénols sont des composés aromatiques synthétisés par les plantes lors du métabolisme secondaire, ils sont généralement impliqués dans la défense contre les rayonnements ultraviolets ou agressions par des microbes pathogènes (Aguie V., 2008 ; Zlata L., 1992). Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire de 500 à 3000 Dalton et contenant au moins un noyau benzénique lié directement par un groupe hydroxyde libre ou engagé dans une fonction éther, ester, hétéroside, ils peuvent se combiner avec des protéines en formant des complexes ( Bouhadjera K., 2005 ; Gianmaria F., 2011).

### II.4.1. Classification

Les polyphénols peuvent se classer en différents groupes selon le nombre d'atomes constitutifs et la structure de squelette de base. Les principales classes les plus largement répandues sont : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tannins et lignines, les plus rares les coumarines et les stilbènes (Nkhili E.Z., 2009 ; Hongxiang L., 2007).

#### II.4.2.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont classés en deux groupes : dérivés de l'acide benzoïque et dérivés de l'acide cinnamique (Manach C. et al., 2004).

Les acides hydroxybenzoïques sont des dérivés de l'acide benzoïque ayant une structure générale de base de type (C6-C1), dont les plus répandus sont l'acide salicylique, l'acide gallique et l'acide vanillique, ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Donatien K., 2009 ; D'Archivio M. et al., 2007).

Les acides hydroxycinnamiques sont des dérivés de l'acide cinnamique ayant une structure générale de base de type (C6-C3), dont les plus abondants sont l'acide caféique et l'acide férulique, ils existent souvent sous forme combinées avec des molécules organiques (Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006)

#### II.4.2.2. Les flavonoïdes

De nos jours, des milliers des flavonoïdes ont été identifiées en classes et sous classes (tableau 3). Ils regroupent une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. Ils se trouvent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme d'hétéroside (Hadj S., 2009 ; Lopez-Lazaro M., 2009). Ils ont tous une origine biosynthétique commune et par conséquent,

possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (figure 6) (Tapas A.R., 2008 ; Stefek M., 2011).

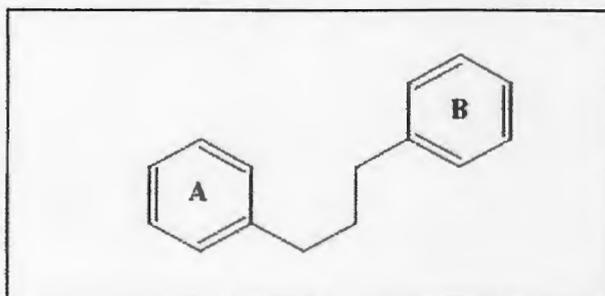


Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes (Marfak A., 2003).

Tableau 3 : Représentation des principales classes des flavonoïdes avec leurs exemples et structures (Kelly E. et al., 200 ; Rajnarayana K. et al, 2000).

Flavonols	Flavanones	Flavanols	Flavones	Anthocyanins	Isoflavones
Quercetin	Hesperetin	Epicatechin	Apigenin	Cyanidin,	Daidzein
Kaempferol	Eriodictyol	Catechins	Luteolin	Delphinidin	Genistein
Myricetin,		Gallocatechin		Malvidin	Glycitein
Isorhamnetin		EGC, ECG		Pelargonidin	Biochanin A
		EGCG		Peonidin	Formononetin
		Theaflavin		Petunidin	

#### II.4.2.3. Les tannins

Les tannins représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse et concise car il n'y a pas de structure chimique de base. Leurs structures chimiques sont variées et rassemblées en famille en fonction d'activités communes (Frutos P., 2004). On distingue deux groupes des tannins qui sont :

**Tannins hydrolysables :** Ils sont souvent constitués par une molécule de sucre (le glucose plus souvent) estérifiée par l'acide gallique ou un de ses dérivés. Ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (Hagerman A. E., 2002 ; Mueller-Harvey I., 2001).

**Tannins condensés :** Ce sont des produits de la polymérisation de flavan-3-ol (Catéchines) et flavan-3,4-diols (leucoanthocyanidines). Ils sont aussi désignés sous le nom de « tannins catéchiques » et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides (Khanbabaee K. et Van Ree T., 2001).

#### II.4.2.4. Lignines

Ce sont des polymères tridimensionnels résultant de la condensation (copolymérisation) de trois alcools phénylpropéniques, ils servent de précurseurs pour les composés de types phénylpropanoïdes (Gerhard R., 1993 ; Muanda F. N., 2010).

#### II.4.3. Biosynthèse des polyphénols

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ces composés sont issus par deux voies métaboliques :

Elle conduit à la formation du précurseur immédiat par des phénols par désamination de phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence de phénylpropanoïde, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques. Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes de composés phénoliques ( Rong T., 2010 ; Wiley J. et Ltd S., 2002).

Elle conduit par condensation répétée à des systèmes aromatiques comme les chromones, les isocoumarines et les quinones. La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité très fréquente par une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration des composés mixtes comme les flavonoïdes, les stilbènes et les xanthones (Bouheroum M., 2007).

#### II.4.4. La biodisponibilité des polyphénols

Il est très important de noter que les polyphénols qui sont les plus communs dans le régime humain ne sont pas nécessairement les plus actifs dans le corps, parce qu'ils ont une faible activité intrinsèque, ou parce qu'ils sont mal absorbés dans l'intestin, fortement métabolisés, ou rapidement éliminés (Manach C. et al., 2004).

Dans la nourriture, tous les flavonoïdes, exceptés les flavonols, sont trouvés sous la forme glycosylées, la plupart des glycosides résistent à l'hydrolyse acide dans l'estomac et arrivent probablement ainsi intact dans le duodénum (Gee J. M. et al., 1998), seulement les aglycones et quelques glycosides peuvent être absorbés par l'intestin grêle (Kanti Bhooshan Pandey K. et Ibrahim Rizvi S., 2009). La flore microbienne hydrolyse les glycosides des polyphénols qui ne sont pas absorbés dans l'intestin grêle en aglycones, et métabolise intensivement les aglycones aux différents acides aromatiques (Rodrigo R. et al., 2010 ; Del Rio D. et al., 2009 ; Williamson G. et Manach C., 2005). Les aglycones sont dédoublées par l'ouverture de l'hétérocycle à différents endroits selon leur structure chimique. Les métabolites microbiens

sont absorbés et conjugués avec la glycine, l'acide glucuronique, ou le sulfate (Griffiths L. A. et Smith G. E., 1972), quelques métabolites microbiens peuvent avoir un effet physiologique ; par exemple, des acides hydroxyphenylacétiques ont une activité contre l'agrégation plaquettaire (Kim D. H. et al., 1998).

Une fois absorbés, les polyphénols sont soumis à 3 principaux types de conjugaison : la méthylation, la sulfatation, et la glucuronidation (Wu X. et al., 2002). L'importance relative de ces 3 types de conjugaison semble changer selon la nature du substrat et de la dose ingérée (Scalbert A. et al., 2002 ; D'Archivio M. et al., 2010). L'équilibre entre la sulfatation et la glucuronidation des polyphénols semble également être affecté par l'espèce, le sexe, et le régime alimentaire (Piskula M. K., 2000).

Les métabolites des polyphénols peuvent suivre 2 voies d'excrétion, par la voie biliaire ou la voie urinaire (Crespy V. et al., 2003). Ils sont sécrétés par la voie biliaire dans le duodénum, où ils sont soumis à l'action des enzymes bactériennes, particulièrement de la B-glucuronidase, dans les segments distaux de l'intestin, ensuite ils peuvent être réabsorbés. Cette réutilisation entérohépatique peut mener à une plus longue présence des polyphénols dans le corps (Scalbert A. et Williamson G., 2000). Les métabolites conjugués, sont largement éliminés dans la bile, sauf celles qui sont petits tels que les monosulfates qui sont préférentiellement excrétés dans les urines (Crespy V. et al., 2003).

#### **II.4.5. Activité antioxydante des polyphénols**

Les mécanismes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre le piégeage direct des ROS, l'inhibition des enzymes responsables de la production des ROS, comme la xanthine oxydase, la chélation des traces métalliques responsables de la production des ROS et la protection des systèmes de défense antioxydant tel que l'augmentation des taux de glutathion (1994 Bravo L., 1998 ; Horakova L., 2011).

##### **II.4.5.1. Inhibition enzymatique**

Des études ont déterminés la relation entre la structure chimique des polyphénols et leur activité inhibitrice, ils ont montrés l'importance de la double liaison C2-C3 dans l'inhibition de certaines enzymes comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase. En effet, l'absence du groupe hydroxyle en C3 augmente légèrement l'activité inhibitrice des polyphénols. Les polyphénols glycosylés ont des activités inférieures à celles des composés non glycosylés (Cos P., 1998).

### II.4.5.2. Chélation des ions métalliques

Les polyphénols sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques en formant des complexes stables, dont les sites de chélation sont : un noyau catéchol sur le cycle B, les groupes 3-hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre le cycle A et B, ils sont alors capables d'inhiber la réaction de fenton (figure 7) (Havsteen B.H., 2002 ; Cook N.C. et Samman S., 1996).

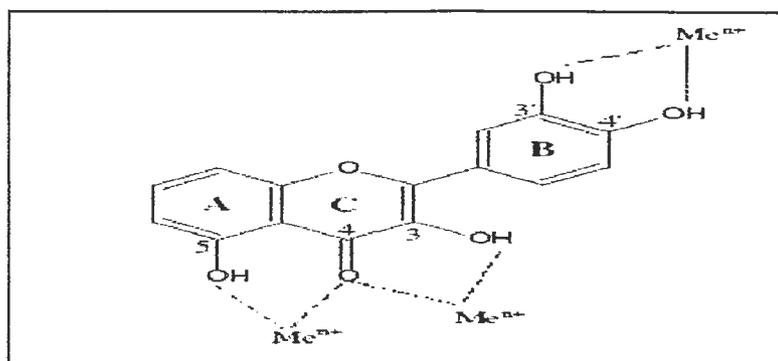


Figure 7 : Les sites proposés pour la chélation des ions métalliques ( $Me^{+2}$ ) par les flavonoïdes (Meladenka P. et al., 2010).

### II.4.5.3. Le piégeage direct des ROS

L'interaction des polyphénols avec de nombreux radicaux libres a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. À cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (FL-OH) sont capables de réduire les radicaux libres comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyl et l'hydroxyl par transfert d'hydrogène.



Où :  $R^{\cdot}$  représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyle et l'hydroxyle.

Le radical flavonoxy FL-O $\cdot$  peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable ou interagir avec l'oxygène pour donner une quinone et un anion superoxyde (figure 8). Cette réaction est responsable d'un effet pro-oxydant indésirable des flavonoïdes (Bimlesh K., 2011 ; Dragan A. et al., 2003).

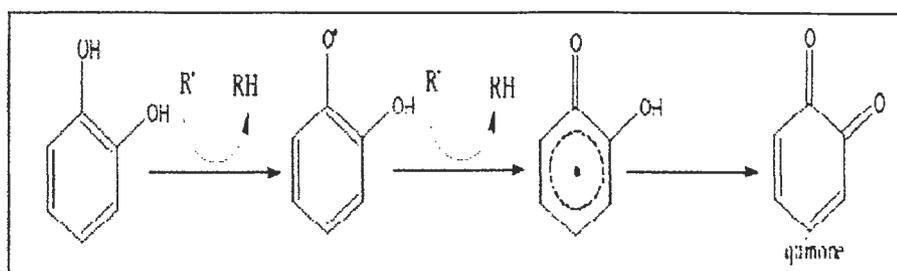


Figure 8 : Piégeage des ROS par les flavonoïdes (Marfak A., 2003).

#### II.4.6. La propolis comme source de polyphénols

La propolis est une substance résineuse, aromatique et balsamique que les abeilles récoltent à l'aide de leurs mandibules sur les bourgeons et l'écorce de certains arbres (peuplier, bouleau, orme, sapin, pin ...). L'abeille l'utilise pour boucher les ouvertures, lisser les parois et surtout désinfecter la ruche (Toullec A., 2008; Blanc N., 2010). Le mot propolis vient du grec « pro » en avant de défense de et « polis », la ville qui signifie « défense de la ville » (Salatino A., 2005; Vassaya S. et al., 1999 ; King Henry S., 2012).

La Propolis est récolté à par les abeilles à l'aide de leurs mandibules sur les bourgeons et l'écorce de certains arbres : pin, sapin, épicéa, plusieurs espèces de peupliers (qui semble la source la plus importante), l'aulne, le saule, le marronnier d'Inde, le bouleau, le prunier, le frêne, le chêne et l'orme (Vassaya S. et al., 1999). d'après les chercheurs allemands la Propolis serait résidu résineux, Provenant de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe, situé entre le jabot et l'intestin moyen (Sanatino A. et al., 2005)

La composition de la propolis est très complexe avec 300 constituants différents. Toutefois elle peut fortement varier d'un type de propolis à un autre (Banskota H.A., 2001 ; sawaya A.C.H.F. et al., 2002). Elle contiendrait 50 à 55 % de résines et de baumes, 20 à 35 % de cires végétales ou de cire d'abeille, 5 à 10 % d'huiles essentielles, 5 % de pollen et 5 % d'autres substances diverses d'origine organique ou minérale (King Henry S., 2012).

La propolis est constituée aussi de plus de 40 flavonoïdes ( flavones, flavanones, flavanols, chalcone... ) de composés phénoliques ( acide coumarique, acide acétylsalique... ), d'aldéhydes aromatiques, de composés terpénique, d'acides gras aliphatiques, de sucres, d'acides aminés, d'oligo-éléments et de vitamines (Mahmoud L., 2006; Marcucci M.C., 1994; Vassaya S. et al., 1999).

La propolis est une substance résineuse hétérogène de consistance solide qui devient friable en dessous de 15°C et gluante et molle à haute température, sa couleur est variable selon la situation géographique, elle a une odeur spécifique, son goût est pimenté, et elle est très peu soluble dans l'eau, soluble dans l'alcool mais en fonction de la température, l'acétone, l'éther, et le chloroforme... La partie insoluble est constituée de tissus végétaux, de grains de pollen, de débris de cuticule et de soies d'abeille... (Blanc N., 2010).

La propolis a des propriétés thérapeutiques diverses grâce à la présence de flavonoïdes et de composés aromatiques. La propolis est un antibiotique naturel ; elle présente des propriétés bactéricides, fongicides, anti-viraux, et anti-mycosiques (Mahmoud L., 2006; Marcucci M.C., 1994). Elle cumule aussi des propriétés anti-allergiques, anti-inflammatoire, anti-cancéreuses, immuno-modulatrice et anesthésiantes (Su-Hsiang F. et al., 2005 ; Simon-finstone M. et Spivak M., 2010 ; Yaghoubi S.M.J., 2006). De plus, elle possède d'activité antioxydante particulièrement élevée, mais celle-ci est dose dépendante, c'est-à-dire qu'elle agit comme antioxydante à faible dose ou pro-oxydante à dose élevée, Il est donc nécessaire d'identifier la dose efficace (Blanc M., 2010).

# **III- Matériel et méthode**

### III.1. Matériel végétal

Les échantillons de la propolis sont récoltés au mois d'Avril (2012), ils sont fournis par des apicultures de trois régions (Kaous, El Milia, Oudjena). La récolte est effectuée par un grattage et raclage des cadres et des parois de la ruche.

L'extrait éthanolique de la propolis (EEP) est obtenu par extraction selon la méthode de Bruneton (1995). Pour cela, les échantillons de la propolis sont coupés en petits morceaux et plongés dans l'éthanol 95°C. En effet, 20 g de la propolis pour 100 ml d'éthanol. La macération est réalisée à l'abri de la lumière et à la température ambiante pendant 7 jours avec agitation, les macéras sont filtrés sur le papier filtre. Les filtrats sont soumis à une évaporation à 45 °C en utilisant l'évaporateur rotatif. La figure suivante montre la procédure de l'extraction.

#### III.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols des extraits est déterminé par le réactif du Folin Ciocalteu (Li et al., 2007). Ce réactif est constitué par un mélange de l'acide phosphotungstique ( $WO_4^{2-}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $MoO_4^{2-}$ ). Ce mélange de deux acides se réduit par les groupements oxydables phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleu. Pour cela, à 500  $\mu$ l de chaque extrait dilué dans l'eau distillé (1/100), 2,25 d'eau et 250  $\mu$ l de Folin Ciocalteu sont ajoutés, le mélange est bien agité par le vortex pendant 1 min. Après 5 min, 2ml d'une solution de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) (7,5%) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 1h d'incubation à 25°C et à l'abri de la lumière l'absorbance est mesurée à 760 nm. La lecture se fait contre un blanc préparé par l'eau distillé dans les mêmes conditions.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de la gamme d'étalonnage, établie avec l'acide gallique (25-200mg/ml) préparé dans les mêmes conditions. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par 1 g de la propolis brute.

#### III.1.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) cité par (Bahorun et al., 1996) est utilisée pour la détermination de la teneur totale en flavonoïdes des extraits éthanolique de la propolis. Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Ils forment des complexes jaunâtres avec chélation des métaux (aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygènes de la molécule

phénolique agissant comme donneur d'électron. Pour cela 75  $\mu\text{l}$  du  $\text{NaNO}_2$  (5%) sont ajoutés à 250  $\mu\text{l}$  de l'extrait diluée dans l'eau distillé (1/100). Après 6 min du repos, 150  $\mu\text{l}$  d' $\text{AlCl}_3$  (2%) et 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaOH}$  (1 M) sont ajoutés, le mélange est complété par l'eau distillée jusqu'à 2,5 ml. L'absorbance est lue après 10 min d'incubation à 510 nm contre un blanc préparé par l'eau distillée dans les mêmes conditions.

Une courbe d'étalonnage linéaire est établie par la quercétine (25-200  $\mu\text{l/ml}$ ) dans les mêmes conditions des échantillons. Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent de quercétine par 1g de propolis (mg EQ/g).

### **III.1.3. Analyse de la propolis par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (CPG/SM).**

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse est l'un des plus puissants outils d'identification de constituant d'un mélange. Si on dispose d'un ensemble CPG-SM (CG-SM), c'est-à-dire chromatographie en phase gazeuse couplé avec la spectrométrie de masse. On injecte dans le chromatographe en phase gazeuse un mélange de produits. Chaque produit, séparé par la colonne, est analysé l'un après l'autre par le spectromètre de masse. Le spectromètre de masse fonctionne alors comme un détecteur de la chromatographe en phase gazeuse. Ce dispositif permet d'obtenir un chromatogramme, de doser chaque constituant du mélange et d'identifier ces constituants du mélange et d'identifier ces constituants à l'aide de leur spectre de masse.

L'analyse de la CG/MS a été effectuée en utilisant un chromatographe GC 2010 avec une colonne FS-SE 30 CB de longueur 25 m et de 0,25 mm. Le gaz vecteur est l'He et le volume de l'injection 0,25  $\mu\text{l}$ .

Le chromatogramme est couplé à un détecteur M=QP-2010 utilisant le Mode EI comme source d'ions (70eV) et ayant une température maximale de 35 C°. Trois échantillon ont été testé (Kaous, El-Milia et Ouedjena) avec une température initiale 150 C°, T finale 280 C°.

### **III.1.4. Mesure de l'effet *scavenger* ou piègeur des ROS du DPPH *in vitro***

Le DPPH° est défini comme un radical libre qui réagit avec des groupements amine, phénols, les acides ...etc. Le DPPH (2,2 diphenyl 1 picryl hydrazyl) a une couleur violette, en présence de piègeur de radicaux libres qui peut donner un atome ou un électron, le DPPH se réduit en 2,2 diphenyl 1picryl hydrazine de couleur jaune.

Brièvement, à 250 µl de chaque extrait de différentes concentrations (25-200 mg/ml ) 750 µl du DPPH est ajouté. Après une agitation, le mélange est incubé pendant 30 min à la température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture de l'absorbance est effectuée contre un blanc (éthanol) à 517 nm. Le contrôle est préparé par 250 µl de l'éthanol avec 750 µl de DPPH.

L'activité antioxydante des extraits est comparée avec l'activité de la quercétine et l'acide gallique. Leur activité a été déterminée par la même façon que l'extrait. L'effet anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres est exprimé en pourcentage selon la relation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_b - A_a/A_b) \times 100]$$

$A_a$ : Absorbance du control

$A_b$ : Absorbance de l'essai.

### III.2. Animaux

L'étude a été réalisée sur des rats albinos wistar provenant de l'institut Pasteur. Leur poids compris entre 130 g et 210 g. Ils sont placés en quatre cages et chacune contenant un groupe de trois animaux avec un accès d'eau et de la nourriture. L'animalerie est maintenue à une température de 22±2°C et une luminosité de 12/24 heures.

#### III.2.1. Traitement

Les rats sont répartis en quatre groupes :

**Groupe (1) :** animaux témoins recevant 1ml de l'eau distillée par voie orale chaque jour pendant 10 jours.

**Groupe (2) :** les animaux ont reçu 1ml d'eau distillée par voie orale pendant 10 jours suivie par une dose unique de l'aflatoxine 1mg/kg (Preetha S.P.et al., 2006) par voie interapéritonéale dans le 11<sup>ème</sup> jour.

**Groupe (3) :** les animaux ont prétraités quotidiennement par les polyphénols de la propolis 100mg/kg pendant 10 jours suivie par une seule dose 1mg/kg de l'aflatoxine par voie intrapéritonéale dans le 11<sup>ème</sup> jour.

**Groupe (4) :** les animaux ont prétraités quotidiennement par la quercétine pendant 10 jours par voie orale suivie par une seule dose de l'aflatoxine 1mg/kg est administré par voie intrapéritonéale dans le 11<sup>ème</sup> jour.

Le sang est prélevé après 24 h, 48h et 72h de l'administration de l'AFB1 à partir de sinus orbital au niveau de l'œil à l'aide de tube capillaire, le sang est récupéré dans des tubes secs. Il est centrifugé à 4000rpm pendant 10 mn. Le surnageant est récupéré puis congelé à -20°C afin d'effectuer les dosages biochimiques (LDH, CPK et TGO) et afin de faire l'identification de l'AFB1 dans le sang par HPLC et dans les urines après 24h par HPLC.

Les rats sont sacrifiés dans le 8<sup>ème</sup> jour de l'administration de l'AFB1 après anesthésie par l'éther. Les cœurs sont prélevés et pesés afin d'évaluer les paramètres du stress oxydatif.

### **III.2 .2. Etude qualitatif de L'AFB1 par l'HPLC dans le sang et les urines**

Le mélange des produits à séparer et mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire contenue dans la colonne chromatographique. Ces interactions provoquent des échanges qui aboutissent à la séparation. La spectrophotométrie UV est utilisée comme un détecteur de l'HPLC, elle permet de compléter les informations apportées par le comportement chromatographique de l'HPLC, et de caractériser les molécules. Dans ce cas chaque composé absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Les conditions chromatographiques sont HPLC model SHIMADZU, pompe (LC-20AT), détecteur (SPD-20 AV), dégazeur : DGU-20 A 3.

Les conditions analytiques de HPLC la phase mobile eau – methanol :ACN, la colone C18-125×4,6 mm, débit : 0,08 ml /min,  $\lambda=365\text{nm}$ , colonne inférieur 10  $\mu\text{l/ml}$ .

### **III.2.3. L'évaluation de l'effet cardioprotecteur de EEP**

#### **III.2.3.1. Dosage des paramètres biochimiques**

On a été fait un dosage des paramètres biochimique pour évaluer l'atteinte cardiaque qui sont LDH, CPK et TGO et un dosage des protéines sériques pour évaluer la toxicité de l'AFB1.

#### **III.2.3.2. Dosage des paramètres du stress**

##### **III.2.3.2.1. Dosage du glutathion**

Le glutathion est une enzyme tripeptide composé de trois aminoacides (l'acide glutamique, la cystéine et la glycine). Sa concentration dans les cellules est variable entre 0,5 à 10 mM et de l'ordre des  $\mu\text{M}$  dans le plasma. Il existe deux formes oxydées GS-SG et GSH. Le dosage du GSH est effectué selon la méthode colorimétrique d'Ellman (1995) par le réactif DTNB acide 5.5-dithiobio-2-nitro-benzoïque. La réaction consiste à l'oxydation du GSH par le DTNB cela

induit la libération de l'acide thionitrobenzoïque (TNB) selon la réaction c'est dessous. Au pH alcalin le TNB présente une absorbance à 412 nm



Pour cela, 0.2 g du cœur est coupée et homogénéisée dans trois volumes de l'acide trichloracétique (TCA) à 5 % à l'aide d'un potier puis centrifugé à 2000 rpm pendant 15 mn, 50 µl du surnageant est ensuite diluée dans 10 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 8). A 3ml du mélange de dilution, 20µl du DTNB (0.01M) est ajouté. La lecture de l'absorbance se fait à 412 nm après 15 mn de l'incubation contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

Le taux de GSH est déduit à partir d'une gamme d'étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions. Les concentrations sont exprimées en millimoles de glutathion par gramme du cœur (ml/g de cœur).

#### III.2.3.2.2. Dosage du MDA

La MDA est un index de la peroxydation lipidique qui résulte de la coupure, médiée des acides gras par les radicaux libres. La réaction de dosage de l'MDA repose sur la formation en milieu acide (pH 2-3) et à chaud (100°C) entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA) un complexe (MDA-TBA) (figure15), le complexe est absorbé à 530nm en présence d'un solvant organique comme le n-butanol. Le dosage est réalisé par la méthode d'Okharoa et al. (1997). Pour cela 0.2 g de cœur est prolongé dans une solution de 0,6 ml de KCl à 1.15 % puis broyé par un potier. 0,5 ml d'acide trichloracétique à 20 % et 1ml d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.67% sont additionnés à 0,5ml de l'homogénat. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 mn, refroidis puis 4 ml de n-butanol est ajouté.

Après centrifugation de 15 mn à 3000 tours/minute, la densité optique est déterminée sur le surnageant à 530nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec l'eau distillé.

Le taux du MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en nmole/l en utilisant le tétraéthoxypropane qui donne après son hydrolyse le MDA.

#### III.2.3.2.3. Préparation de la fraction cytosolique

La méthode décrit par Iqbal, 2g du cœur sont coupés et homogénéisé avec trois volumes du tampon phosphate (0.1 M, pH 7.4) contenant du KCl à 1.17 % à l'aide d'un potier. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15mn à 4°C pour séparer les débris nucléaires et le surnageant est centrifugé à 9600 rpm, pendant 30mn. Le surnageant ainsi obtenue utilisé comme source d'enzyme.

### III.2.3.2.4. Evaluation de l'activité de la Catalase cytosolique.

La catalase est une enzyme qui catalyse la réaction de dégradation de peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Le dosage est réalisé selon la méthode de Clairbone (1985) dont le principe est basé sur la disparition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de la catalase à 25°C selon la réaction suivante :



Pour ce dosage, un cuve de mesure contient 1ml de tampon phosphate (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (0.1 M, pH 7.4), 0.950 ml de peroxyde d'hydrogène (0.019 M) et 0.025 ml de la source enzymatique. La lecture de la DO est effectuée à 560 nm chaque minute pendant deux minutes. L'activité enzymatique est exprimée en µl/g de protéines selon la réaction suivante :

$$\text{UI /g de protéine} = \frac{2.303}{T} \log \frac{A_1}{A_2} / \text{g de protéine.}$$

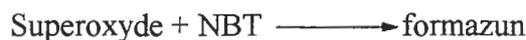
D'où : A<sub>1</sub> : absorbance au temps 0 mn.

A<sub>2</sub> : absorbance au temps 1 mn.

T : intervalle de temps en mn.

### III.2.3.2.5. Evaluation de l'activité de la SOD cytosolique

La détermination de l'activité de la SOD dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction de nitrobleutétrazolium (NBT) c'est-à-dire inhibé la formation du formazun par les superoxydes qui sont générés par une photoréaction à partir de l'oxygène et la riboflavine.



La réduction du NBT par l'anion superoxyde en formazun est suivie à 560nm.

Pour ce dosage, le mélange réactionnel contient 2ml du milieu réactionnel (cyanide de sodium 10<sup>-2</sup>M, solution du NBT 1.76 × 10<sup>-4</sup>M, EDTA 66 × 10<sup>-3</sup>M et la riboflavine 2 × 10<sup>-6</sup> M), 5 µl de la source enzymatique. Le mélange est arraché avec une lampe de 15 watt pendant 10 mn. Le contrôle est préparé dans les mêmes conditions mais sans sources enzymatique.

Une unité d'activité de la SOD est définit en temps que la quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50 %.

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Absorbance du contrôle} - \text{absorbance de l'essai}}{\text{Absorbance du contrôle}} \times 100$$

$$\text{SOD UI /ml} = \% \text{ d'inhibition} \times 6.35$$

### III.2.3.2.6. Evaluation de l'activité de la glutathion-s-transférase

L'activité du GST est estimée par son action sur le composé 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (1CDNB) en présence de glutathion comme un co-substrat (Habig et al.1974).

Pour ce dosage, dans un cuve de mesure, 100 µl de CDNB (20 mM) sont ajoutés à 1,7 ml du tampon phosphate (0,1M, PH=6,5). Après l'incubation du ce mélange pendant 10 min à 37 C°, 100 µl GSH et 100 µl de la fraction cytosolique sont ajoutés. La densité optique est mesurée à 340 nm pendant 5min.

$$\text{L'activité de GST (nmol/min/mg protéine)} = \frac{\Delta A / (\text{min} \times \text{Volume total})}{\text{volume utilisé}} \times \frac{1}{9.6} \times \frac{1}{F}$$

$\Delta A/\text{min}$ : différence de l'absorbance.

Volume total : Volume total de cuvette par ml.

Volume utilisé : volume de la fraction cytosolique ajoutée par ml.

### III.2.3.2.7. Dosage des protéines

Le dosage est effectué par la méthode de Bradford (1976). Cette méthode mesure la concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le bleu de coomassie G250 qui se lie avec les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présent dans les protéines. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant la concentration en protéines dans l'échantillon.

Pour cela, 100 µl de la fraction cytosolique du cœur diluée 1/5<sup>ème</sup> mélangé 4 ml de réactif de Bradford (BBC). Après agitation au vortex le mélange est incubé à la température ambiante pendant 5 min. La lecture des absorbances est effectuée à 595 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration en protéines de l'échantillon nécessite l'élaboration d'une gamme d'étalonnage de protéines standard réalisé dans les mêmes conditions avec des échantillons d'albumine sérique bovine (BSA) de concentration connus.

### III.2.4. L'étude statistique

Pour l'étude expérimentale sur les animaux, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écartype. Pour la comparaison on a été utilisé le test de student qui nous donne le degré de signification (P).

(\*) Désigne la comparaison entre le lot traité uniquement par l'AFB1 et le lot témoin où on dit que la différence :

- N'est pas significative si  $p > 0.05$  (NS).
- Est significative si  $0.05 > p > 0.01$  (\*).
- Est très significative si  $0.05 > p > 0.01$  (\*\*).
- Est hautement significative si  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

(#) Désigne la comparaison des lots prétraités par l'extrait éthanolique de la propolis ou la quercétine avec le lot traité uniquement par l'AFB où on dit que la différence :

- N'est pas significative si  $p > 0.05$  (NS).
- Est significative si  $0.05 > p > 0.01$  (#).
- Est très significative si  $0.05 > p > 0.01$  (##).
- Est hautement significative si  $p < 0.001$  (###).

# **IV- Résultat et discussion**

#### IV.1. Analyse des composés des extraits bruts

Les extraits ethanologiques de la propolis (EEP) récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant. Les rendements des EEP sont donnés dans le tableau N° 4.

**Tableau N°4 : Les pourcentages des extraits par rapport à la quantité initiale de la propolis**

Région	Le pourcentage
Kaous	24,18 %
Ouedjana	22,66 %
El-Milia	21,60 %

Le rendement était largement variable, lisiblement montré dans le tableau où la propolis de la région de Kaous présente le rendement le plus élevé (24,18%) par rapport au poids initial, suivi par le rendement de la propolis d'Oudjana (22,66%) puis d'El-Milia (21,60%).

L'extraction ethanologique de la propolis des trois régions (Kaous, El-Milia et Oudjana) montre que le rendement de la région de Kaous est plus élevé que ceux des autres régions.

#### IV.2. Analyse des différents extraits phénoliques de la propolis

##### IV.2.1. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des échantillons de la propolis, un dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux a été effectué. Les valeurs de la concentration et de l'écart type correspondant sont exprimées en mg d'équivalent d'acide Gallique par gramme d'extrait brut (mg EAG/g d'extrait) pour les polyphénols et en mg d'équivalent de la quercétine par gramme d'extrait brut (mg EQ/g d'extrait). Les résultats sont représentés dans le tableau N°5.

**Tableau N°5: La teneur en polyphénols et flavonoïdes des différents échantillons de la propolis**

Régions	Kaous	Oudjana	El-Milia
Concentration des polyphénols (mgEAG/g d'extrait)	404,8±43,28	222,24±8,06	198,46±11,07
Concentration des flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)	110 ± 3,38	47,9 ± 1,73	44,9 ± 1,6

Le dosage des polyphénols montre que l'extrait brut de Kaous contient  $404,8 \pm 43,28$  mg EAG/g d'extrait. Cependant, l'extrait d'Oudjana contenant  $222,24 \pm 8,06$  mg EAG/g d'extrait alors que l'extrait d'El-Milia ne contient que  $198,46 \pm 11,07$  mg EAG/g.

Le dosage des flavonoïdes montre que l'extrait brut de Kaous contient  $110 \pm 3,38$  mg EAG/g d'extrait et l'extrait d'Oudjana contient  $47,9 \pm 1,73$  mg EAG/g d'extrait alors que l'extrait d'El-Milia ne contient que  $44,9 \pm 1,6$  mg EAG/g d'extrait. D'après le tableau on constate que l'extrait de Kaous contient la teneur la plus élevée en polyphénols et flavonoïdes.

Les dosages spectrophotométriques des polyphénols et des flavonoïdes totaux pour les EEP des trois régions ont donné des valeurs significatives montrant la présence des composés phénoliques dans les extraits.

#### **IV.2.2. Analyse chromatographique par la CPG/SM**

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible permettant de déterminer le poids moléculaire d'un produit pure ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus. Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduite dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques. Cette dissociation se fait selon un mécanisme bien déterminé. L'ensemble de ces ions constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

L'analyse des trois échantillons par GC/MS, nous ont donné les chromatogrammes représentés dans la figure 17. Les chromatogrammes obtenus après cette analyse, montrent l'apparition d'un grand nombre de composés avec différentes abondances, à différents temps de rétention ; ce qui prouve à la fois la diversité qualitative, et quantitative des propolis étudiées.

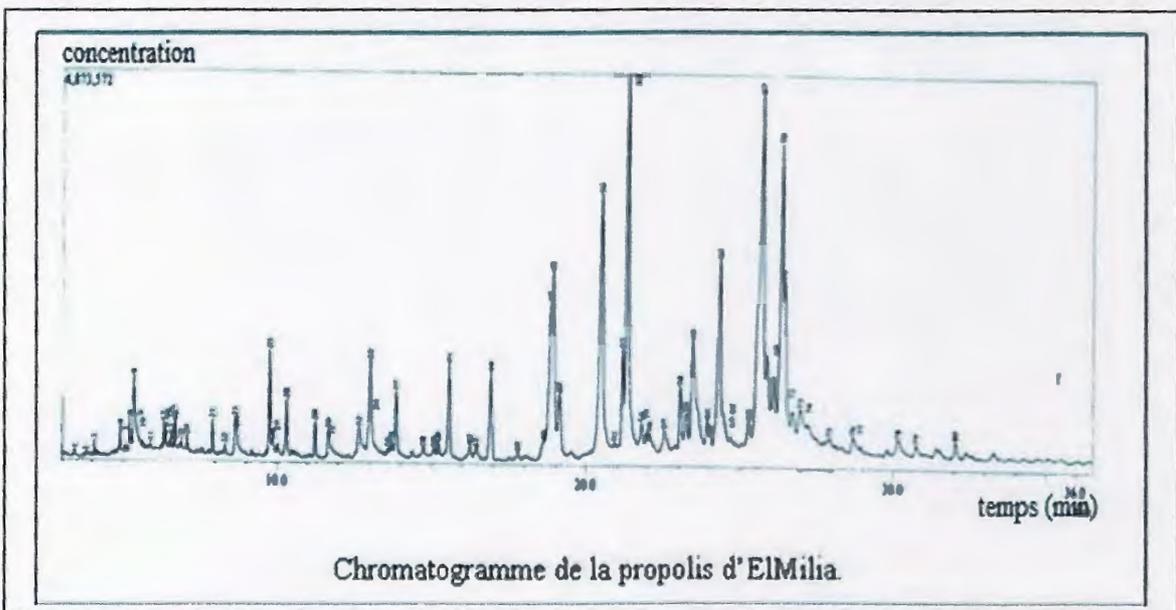
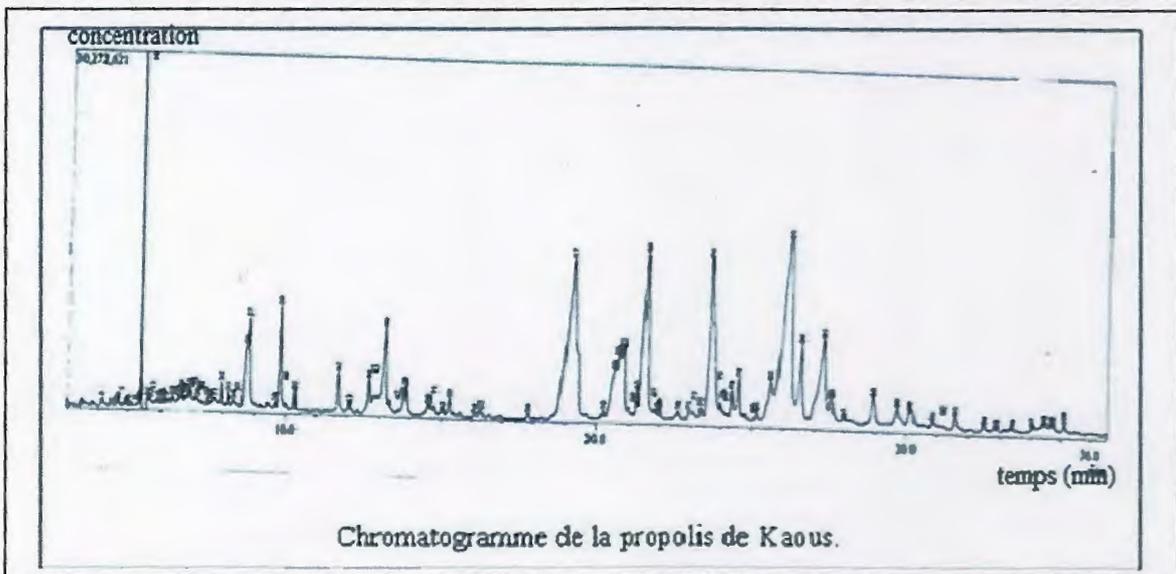
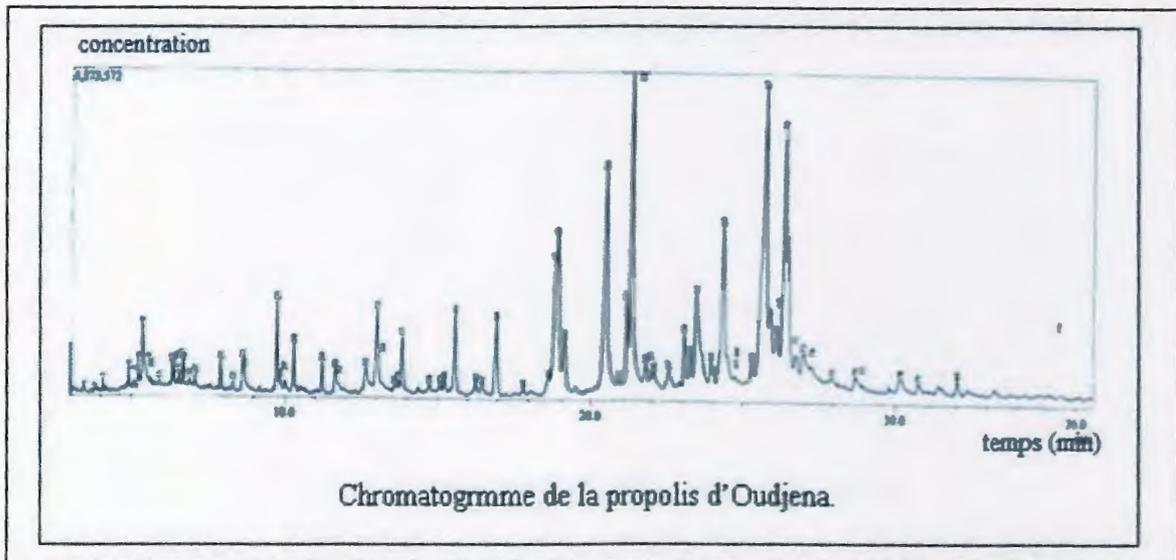


Figure 9: Les chromatogrammes de la propolis des trois régions.

Les tableaux N° 7, 8, 9 et 10 illustrent les résultats détaillés de l'essentiel des composés identifiés dans les trois échantillons en indiquant pour chacun son Rt (min) correspondant.

**Tableau N° 6 : Les acides aliphatiques (pourcentage et temps de rétention)**

Le composé	% (Kaous)	% (El-Milia)	% (Ouedjena)	Rt(min)
Nonanoic acid	0,14	-	-	4,443
Dodecanoic acid	0,11	0,05	-	6,065
Tétradecanoic acid	0,16	0,05	1,29	7,480
n-Hexadecanoic acid	1,93	<b>1,99</b>	1,29	9,848
9,12 Octadecanoic acid	<b>3,22</b>	0,79	-	12,885
Oliec acid	-	0,31	<b>2,17</b>	13,037
9-Octadecanoic acid	0,52	3,35	-	13,196
Docosaic acid	0,27	-	-	25,125

On est remarqué que les trois échantillons ont des faibles taux en acides aliphatiques, d'où 6,56 % pour l'échantillon de Kaous 6,49 % pour l'échantillon d'El-Milia et 5,72 % pour l'échantillon d'Ouedjana. Les acides n-Hexadecanoïque et tétradecanoïques sont présents dans les trois échantillons. On remarque aussi que le nombre des acides aliphatiques est très élevé dans l'échantillon de Kaous.

**Tableau N° 7: Les acides aromatiques (pourcentage et temps de rétention)**

Le composé	% (Kaous)	%(El-Milia)	%(Oudjana)	Rt(min)
Benzenecarboxylic acid	0,12	0,04	-	3,776
Benzenepropanoic acid	0,11	0,12	-	4,785
3,4-Dimethoxycinnamic acid	<b>1,82</b>	-	-	8,858
P-Hydroxycinnamic acid	0,37	<b>0,49</b>	<b>0,97</b>	10,043
3-hydroxymyristic acid	0,91	-	-	24,370

Pour les acides aromatiques, nous remarquons aussi des taux faibles pour tous les échantillons allant de 0,65 % à 3,33 %. Comme on remarque aussi que l'acide p-Hydroxycinnamic est présent dans toutes les propolis, mais avec un taux faible.

Tableau N° 8: Les flavonoïdes (pourcentage et temps de rétention)

Le composé	% (Kaous)	%(El-Milia)	%(Ouedjana)	Rt(min)
Pnistrobine chalcone	-	3,34	-	18,948
Pinocembrin	-	9,42	-	21,452
Tectocrysin	8,53	-	-	23,683
Suberosin	0,20	-	-	24,200
Chrysin	<b>16,32</b>	<b>14,36</b>	-	26,271
2-methoxychrisin	-	0,46	-	26,757
Galangin	5,58	2,10	-	27,025
Naringinin	0,82	0,13	<b>13,85</b>	28,808
Henquanin	0,28	-	-	34,083
Erythroglaucin	0,49	-	-	34,514
Kumatakenin	0,33	-	-	34,733

Le taux global très élevé en flavonoïdes dans la propolis de Kaous (32,48 %), dont ces flavonoïdes marquent des taux importants : (16,32 %) pour la chrysin, (8,53%) Pour la tectochrisine et (5,58 %) pour la galangin.

Le taux global des flavonoïdes dans la propolis d'El-Milia est de (30%), On remarque la présence de 7 flavonoïdes, dont deux marquent des taux élevés. La chrysin, la pinocembrin ont un pourcentage de (14,36 % et 9,42%) respectivement. On note que la propolis d'Oudjena contient de 13,85% de la naringinin.

Tableau 9 : Le pourcentage des autres composés et les composés non identifié

Région	% (Kaous)	%(El-Milia)	%(Ouedjana)
Autres composés	33	38,43	50,95
Non identifiés	24,66	24,43	28,51

D'après les résultats obtenus dans les tableaux précédents, il apparait que la propolis de Kaous contient le pourcentage le plus élevé en flavonoïdes (32,48%), acides alliphatiques (6,49%) et acides aromatiques (0,66%).

### IV.2. 3. Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait (Mesure de l'effet *scavenger* du radical libre DPPH° *in vitro*)

En vue d'évaluer, *in vitro*, le pouvoir antioxydant des EEP nous avons mesuré la capacité de cet extrait à réduire le radical libre stable DPPH° et comparé cette capacité à celle d'un flavonoïde commercial de référence qui est la quercétine et à celle d'un acide phénolique de référence, l'acide Gallique.

Les résultats des variations d'effet *scavenger*, des EEP, de la quercétine et de l'acide gallique, du radical libre DPPH° en fonction de différentes concentrations massiques utilisées sont représentés dans les figures 10, 11 et 12 correspondants aux échantillons de Kaous, Ouedjena et El-Milia.

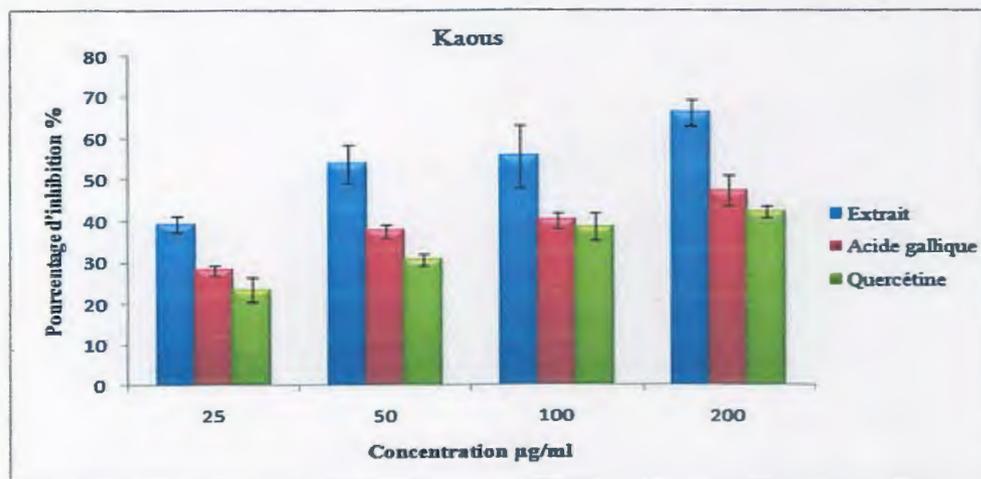


Figure 10 : Pouvoir antiradicalaire d'extrait ethanolique de la propolis de kaous, de l'acide gallique et la quercétine.

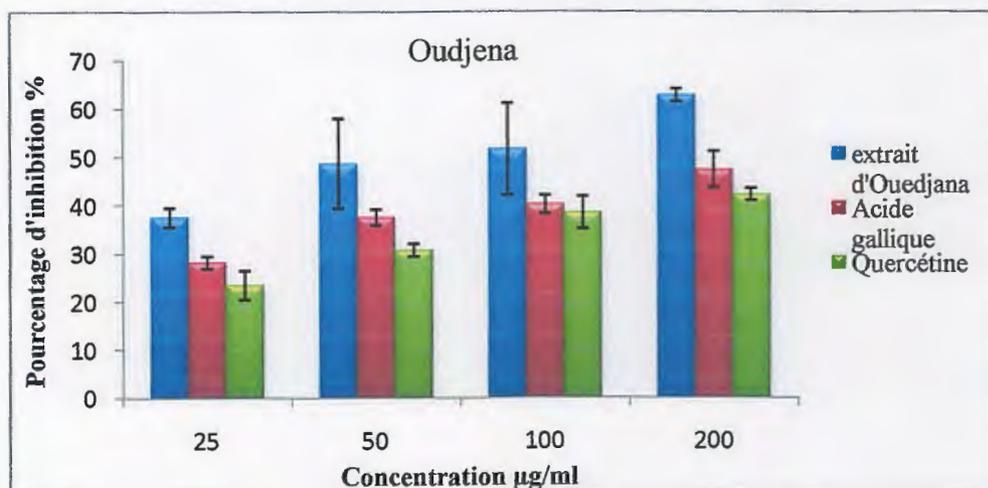
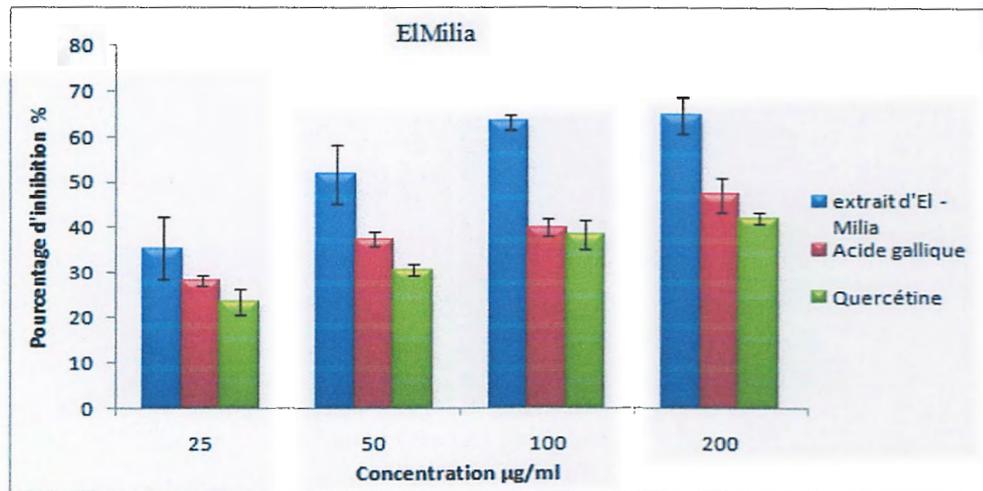


Figure 11 : Pouvoir antiradicalaire d'extrait ethanolique de la propolis d' Ouedjena, de l'acide gallique et la quercétine.



**Figure 12 : Pouvoir antiradicalaire d'extrait ethanologique de la propolis d'El-Milia, de l'acide gallique et la quercétine.**

On a constaté que les extraits ethanologiques de la propolis ont un effet *scavenger* très puissant. Ces extraits sont actifs à des concentrations allant jusqu'à 25 µg/ml. En effet, l'EEP de Kaous, Ouedjena et El-Milia ont un effet piègeur maximal à 200 µg/ml, atteint respectivement ( $66,23 \pm 3,85\%$ ,  $62,81 \pm 1,58\%$ ,  $64,95 \pm 3,92\%$ ) contre  $47,43 \pm 1,28\%$  avec l'acide gallique et  $42,31 \pm 3,22\%$  avec la quercétine. Ces pourcentages peuvent être considérés comme inhibition totale du DPPH° car à la fin de la réaction, la solution finale possède toujours une couleur jaunâtre. Il apparaît également que cet effet *scavenger* de tous les extraits est lié à leur concentration. En comparant ces résultats, les extraits ethanologiques des différents propolis sont très efficaces que l'acide gallique et la quercétine, les antioxydants de référence.

Le piégeage du radical DPPH° par l'extrait s'explique généralement par la nature des polyphénols de l'extrait. Les polyphénols, qui sont connus par leur activité antioxydante, ont la capacité de piéger directement les radicaux libres ( $R^\circ$ ) et les transforment aux espèces non radicalaires (R-H) par donation d'atomes d'hydrogène (Marfak A., 2003).

En comparant les résultats de l'étude spectrophotométrique, de la CPG et de l'effet *scavenger* des trois régions, on a constaté que l'extrait ethanologique de Kaous est le plus riche en composés phénoliques et possède un effet piègeur de ROS très puissant. Cela nous a permis de le choisir dans la réalisation de notre étude.

### **VI.3. L'étude qualitative de l'AFB1 par l'HPLC dans le sang et les urines après 24h**

L'étude qualitative du sang et des urines par l'HPLC nous donne les résultats présentés respectivement dans la figure 13, 14, 15, 16 et 17.

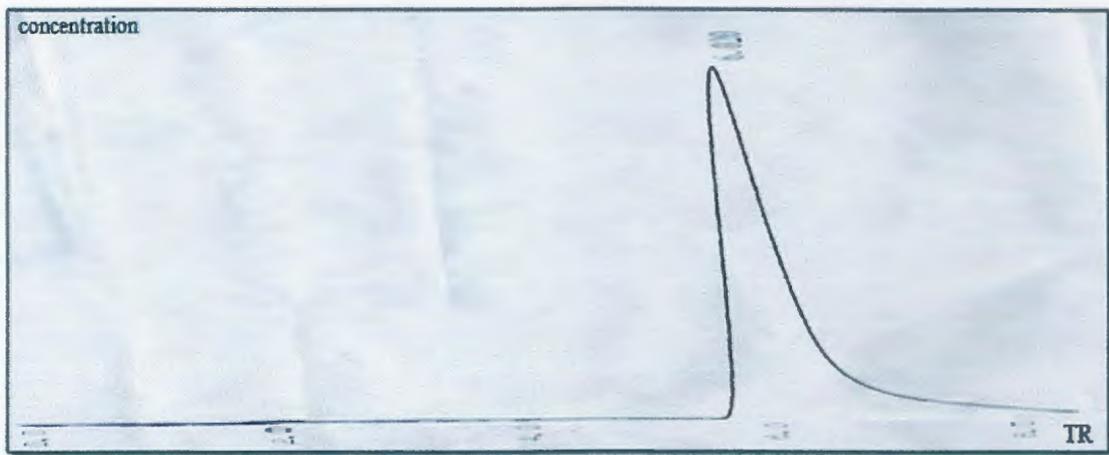


Figure 13 : Le pic de l'AFB1 détecté par HPLC

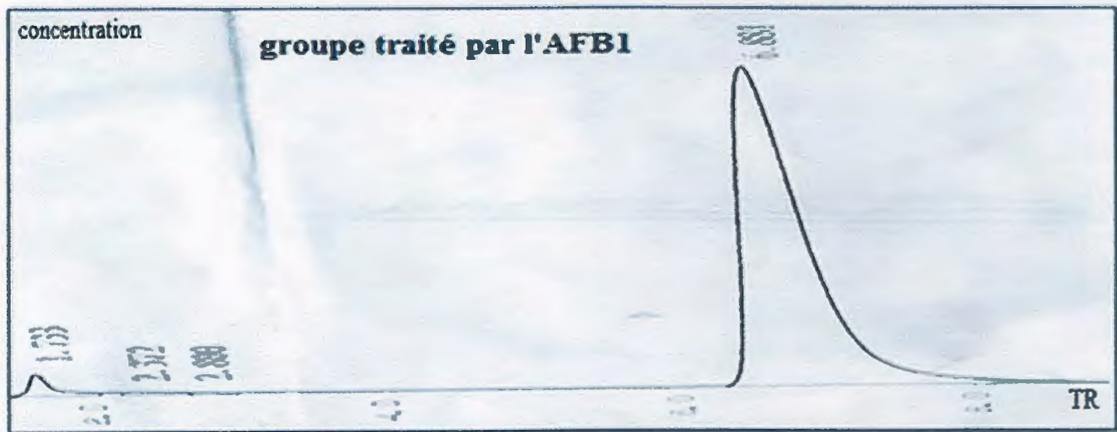
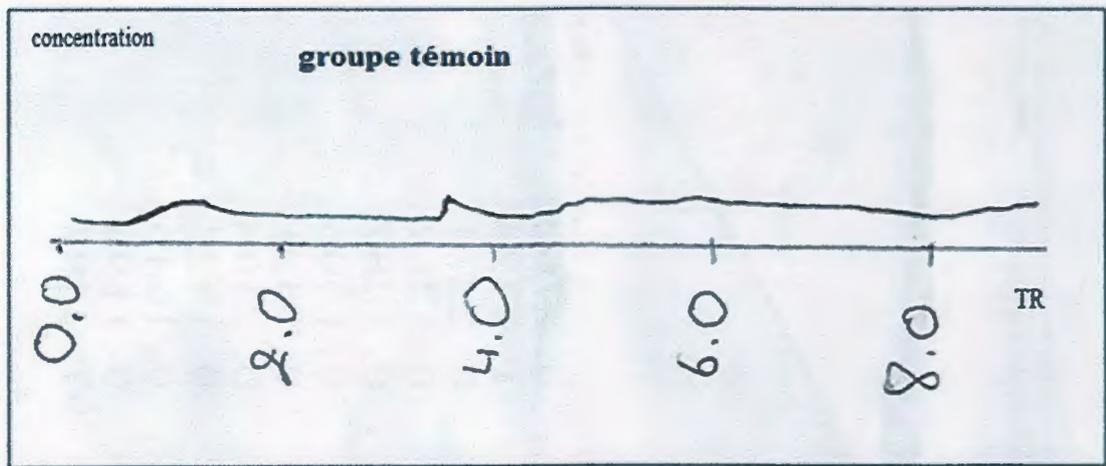


Figure 14 : Les chromatogrammes de l'AFB1 dans le sang détectés par HPLC chez le témoin et le groupe traité par l'AFB1 après 24 h

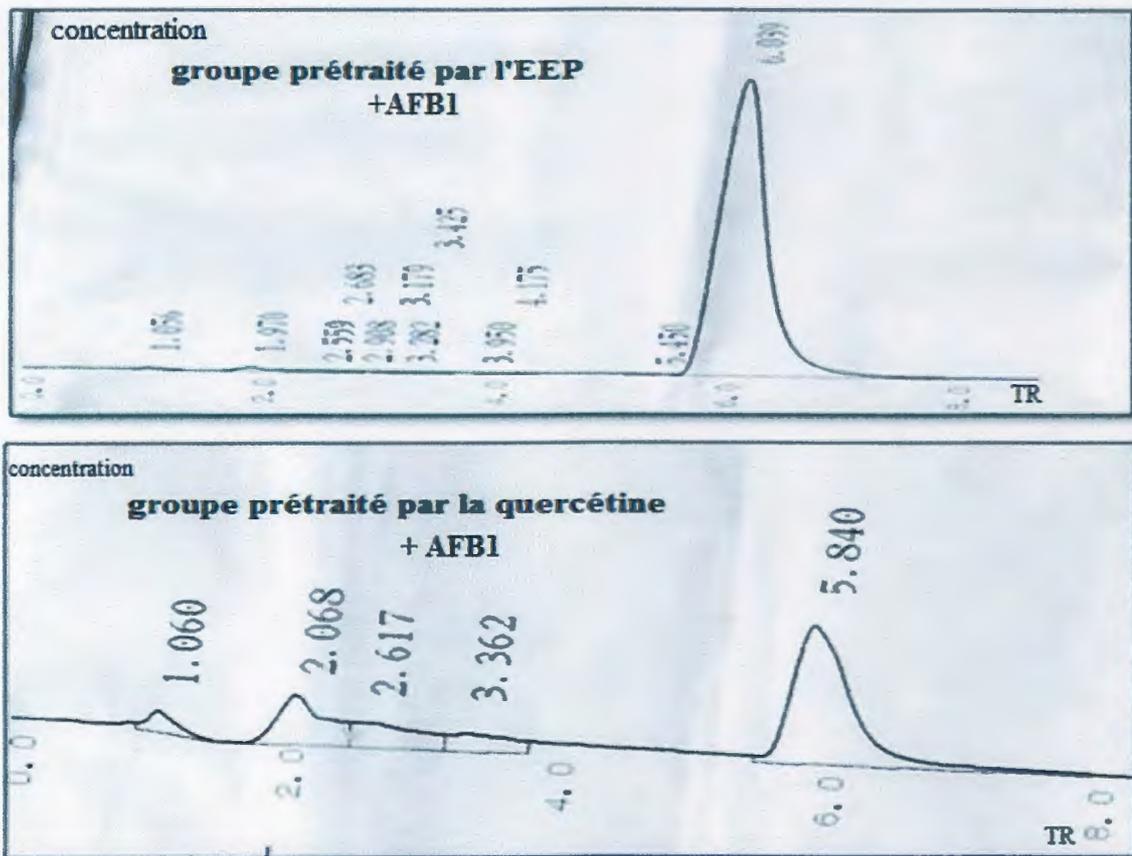


Figure 15 : Les chromatogrammes de l'AFB1 dans le sang détectés par HPLC chez deux groupes prétraités après 24 h

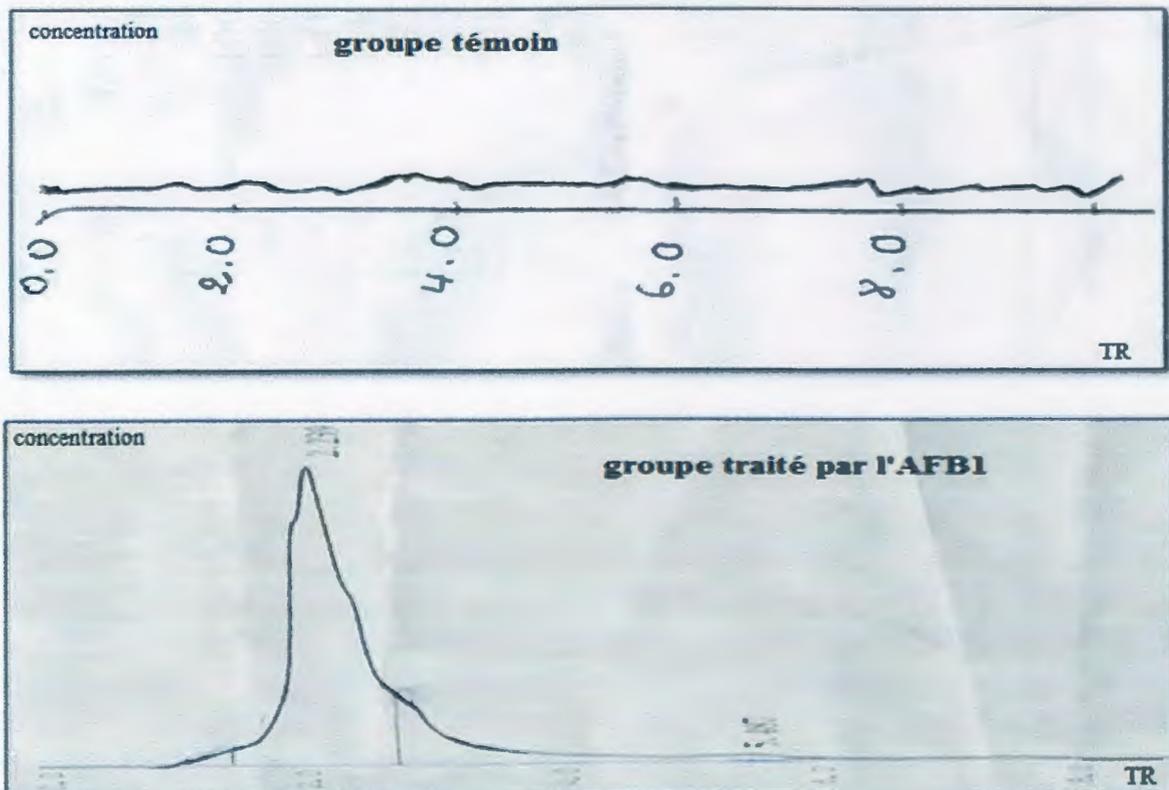
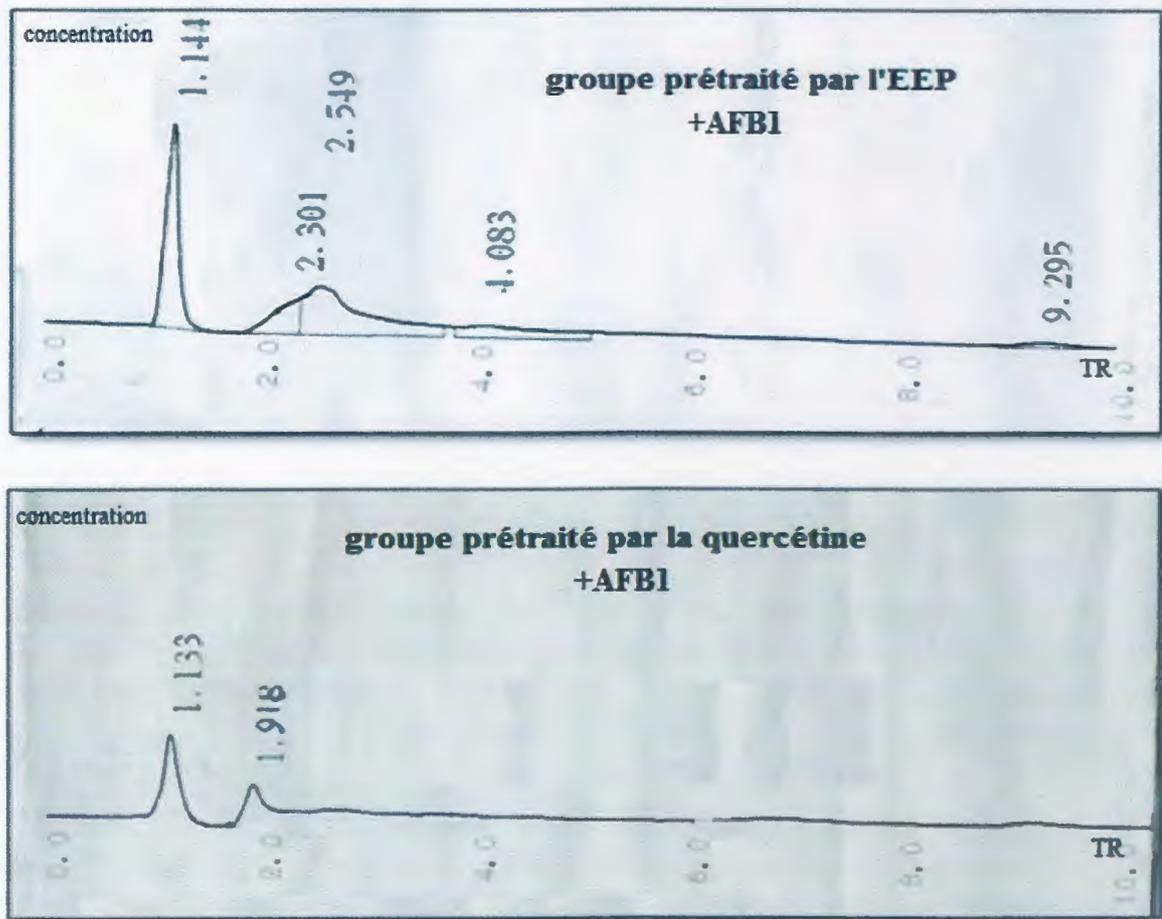


Figure 16 : Les chromatogrammes de l'AFB1 dans les urines détectés par HPLC chez le témoin et le groupe traité par l'AFB1 après 24 h



**Figure 17 : Les chromatogrammes de l'AFB1 dans les urines détectées par HPLC chez les deux groupes prétraités après 24 h**

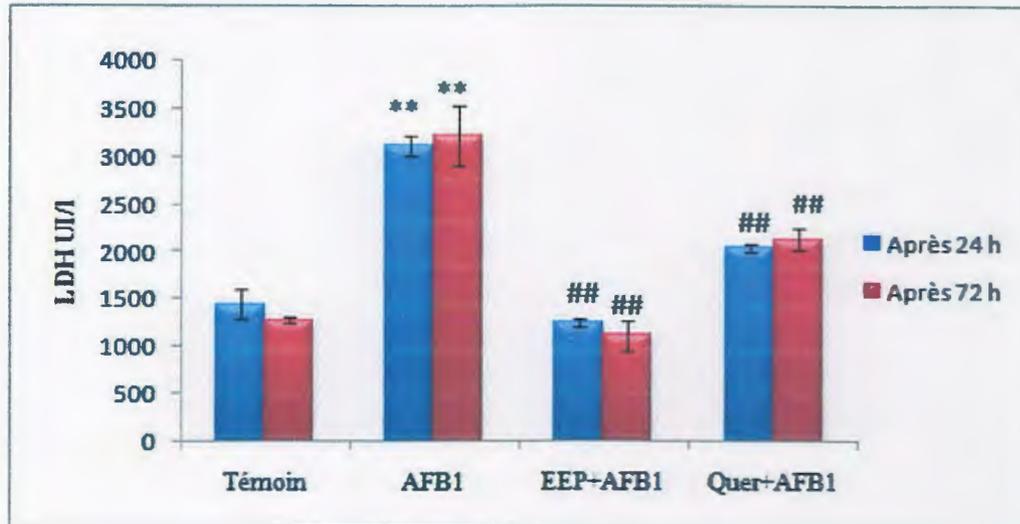
En comparant le pic de l'AFB1 avec celui de l'étalon, les résultats de l'HPLC du sang montrent la présence de l'AFB1 chez les 3 groupes traités et les résultats de l'HPLC des urines montrent l'absence de l'AFB1 chez tous les groupes. On remarque aussi l'apparition des imputés et d'autres composants non identifiés dans le sang et les urines de tous les groupes. L'aflatoxine B1 intacte peut être éliminée par voie biliaire. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Lopez C. et ses collaborateurs (2002), ils ont trouvé l'AFB1 chez les patients souffrent des maladies hépatiques (hépatite, cirrhose...). L'aflatoxine B1 apparaît dans le sang veineux comme des métabolites hydrosolubles, des adduits avec les protéines ou comme des toxines libres (Lopez C. et al., 2002).

#### **IV.4. Dosage des paramètres biochimiques**

Le dosage sérique de la TGO et des protéines est effectué dans les trois prélèvements du sang après 24 h, 48 h, et 72 h de l'administration de l'AFB1 et après 24h et 72h pour la LDH et la CPK.

#### IV.4.1. Dosage de la LDH

L'activité sérique de la LDH est très utilisée au niveau clinique comme biomarqueur dans le diagnostic de la cardiotoxicité. La figure 18 présente les résultats obtenus du dosage de la LDH sérique après 24 h et 72 h de l'administration de l'AFB1 (1mg/kg) pour tous les groupes.



**Figure 18 : L'activité sérique de la LDH pour tous les groupes après 24 h et 72h de l'administration de l'AFB1.**

(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

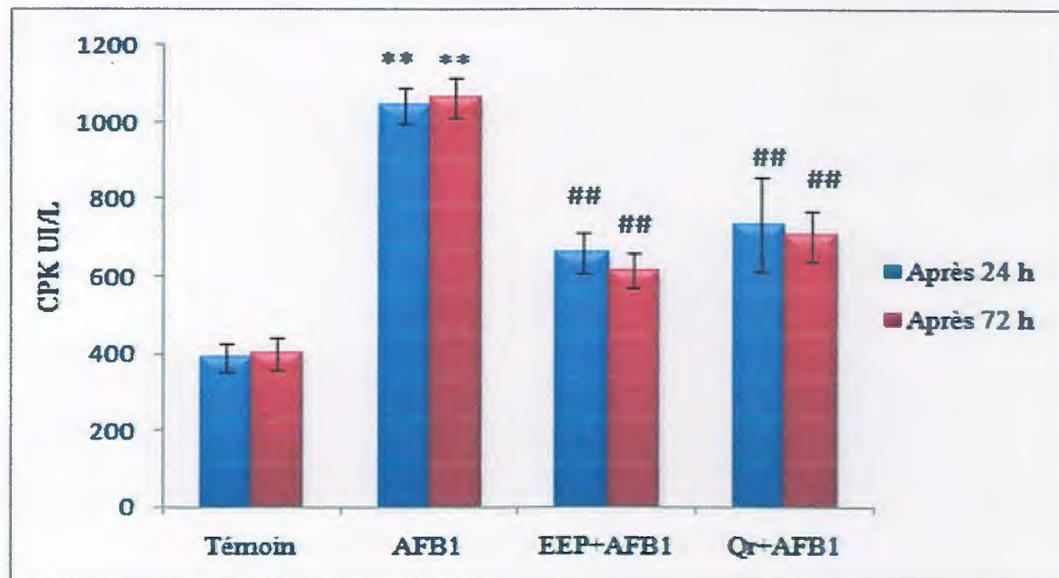
Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (##) désigne un effet très significatif ( $p < 0,01$ ).

Les résultats obtenus après 24 h montrent une élévation très significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la LDH ( $2860 \pm 133.73$  U/L) chez les rats traités uniquement par l'AFB1 (1mg/kg) par rapport à ceux enregistrés chez les rats du groupe témoin ( $1186 \pm 65.04$  UI/L). En comparant l'activité de la LDH des deux groupes prétraités par l'EEP ( $1248 \pm 9.84$  UI/L) ou la quercétine ( $1812 \pm 174.99$  UI/L) avec le groupe des rats traités par l'AFB1 on montre que l'activité de cette enzyme est diminuée très significativement ( $p < 0.01$ ) pour les deux groupes.

Une augmentation après 72h très significative ( $p < 0.01$ ) a montré de l'activité de la LDH ( $3218 \pm 318$  UI/L) chez le groupe traité seulement par l'AFB1 (1mg/kg) par rapport à celle enregistré chez les rats du groupe témoin ( $1283 \pm 30.55$  UI/L). Par contre un prétraitement par l'EEP entraîne une diminution très significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la LDH ( $1120 \pm 156.34$  UI/L) par rapport aux rats traités uniquement par l'AFB1 ( $2143 \pm 109.42$  UI/L) et un prétraitement par la quercétine entraîne aussi une diminution très significative ( $P < 0,01$ ) par rapport aux rats recevant un traitement unique par l'AFB1.

#### IV.4.2. Dosage de la CPK

Les résultats obtenus du dosage de l'activité de la CPK dans le sérum après 24h de l'administration de l'AFB1 (1ml/kg) sont représentés dans la figure 19.



**Figure 19 : L'activité plasmatique de la CPK pour tous les groupes mesurés après 24 h et 72 h de l'administration de l'AFB1.**

(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (##) désigne un effet très significatif ( $p < 0,01$ ).

On a constaté une forte augmentation après 24 h, statistiquement très significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la CPK ( $1044 \pm 76,37$  UI/L) chez les rats traités uniquement par l'AFB1 contre  $390 \pm 37,74$  UI/L avec les rats témoins. Par contre un prétraitement par l'EEP entraîne une diminution très significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la CPK ( $658 \pm 102.79$  UI/L) par rapport aux rats recevant un traitement unique par l'AFB1 ( $1044 \pm 76.37$  UI/L) et un prétraitement par la quercétine entraîne une diminution significative ( $P < 0,05$ ) par rapport aux rats traités uniquement par l'AFB1 ( $733 \pm 122.45$  UI/L).

Les résultats obtenus après 72 h montrent une élévation très significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la CPK ( $1065 \pm 45.65$  UI/L) chez les rats traités uniquement par l'AFB1 (1mg/kg) par rapport à ceux enregistrés chez les rats du groupe témoin ( $400 \pm 56.66$  UI/L). En comparant l'activité de la CPK des deux groupes prétraités par l'EEP ou la quercétine avec le groupe des rats traités par l'AFB1 on montre que l'activité de cette enzyme est diminuée très

significativement ( $p < 0.01$ ) pour le groupe prétraité par l'EEP ( $615 \pm 50.4$  UI/L) et réduit significativement ( $p < 0.05$ ) pour le groupe prétraité par la quercétine ( $705 \pm 40.2$  UI/L).

Dans les deux prélèvements sanguins, après 24h et 72h de l'injection intrapéritonéale de la dose unique (1mg/ kg) de l'AFB1 chez le groupe des animaux traité uniquement par cette dose a provoqué une toxicité cardiaque. Cette toxicité cardiaque est clairement observée par l'augmentation des activités sériques de la LDH et la CPK, ces augmentations sont temps dépendentes. Ces résultats sont en corrélation avec les résultats obtenus par El-Sayed et ses collaborateurs (2011) et aussi avec ceux obtenus par Vaiyapuri et ses collaborateurs (2012). El-Sayed et ses collaborateurs ont trouvé que l'injection intrapéritonéale d'une dose unique de la doxorubicine 15 mg/kg augmente l'activité sérique de ces enzymes après 9 jours chez les groupes des animaux traité uniquement par cette dose. Vaiyapuri et ses collaborateurs ont démontré que les activités sériques de ces enzymes sont augmentés après 15 jours de l'injection intrapéritonéale de deux doses séparées de 85 mg/kg de l'isoproterenol, cela indique que le mécanisme de la cardiotoxicité de l'AFB1 est proche de celui de médicaments cardiotoxiques (doxorubicine et isoproterenol) (El-Sayed . et al., 2011 ; Vaiyapuri . et al., 2012).

La diminution des activités de la LDH et la CPK observées dans les groupes d'animaux recevant l'extrait ethanologique de la propolis ou la quercétine avant le traitement par l'AFB1 prouve que l'effet préventif de l'EEP est proche de celui de la quercétine qui est connu comme étant l'un des flavonoïdes, elle diminue la production des ROS par l'AFB1. En effet, la quercétine est connu comme inhibiteur efficace de la peroxydation lipidique, Liu et ses collaborateurs (2007) ont indiqué que la quercétine induit l'oxydation des lipoprotéines de faible densité. En outre, les flavonoïdes contenant les groupements 4-6 OH agissent comme de puissant antioxydant alors que la plupart de ceux qui contiennent moins de groupement OH révèlent une pouvoir antioxydant faible ou nul (Kato A. et al., 2008 ; Liu R. 2007).

#### **IV.4.3. Dosage de la TGO**

La figure 20 présente les résultats de dosage de la TGO après 24 h, 48 h et 72 h de l'administration d'AFB1 (1mg/kg).

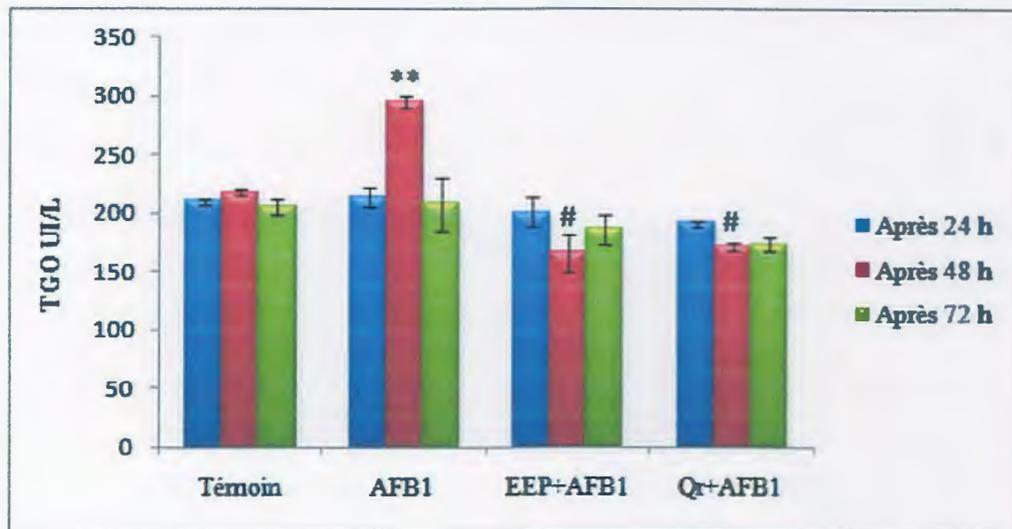


Figure 20 : L'activité sérique de la TGO pour tous les groupes mesurés après 24 h, 48 h et 72 h de l'administration de l'AFB1).

(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ), (#) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ )

On montre après 24 h une faible augmentation, statistiquement non significative ( $p > 0.05$ ), de l'activité de la TGO ( $214 \pm 8.48$  UI/L) chez les rats traités uniquement par l'AFB1 contre  $205 \pm 2.82$  UI/L avec le groupe témoin. Il n'existe aucune différence significative ( $p > 0.05$ ) entre le groupe traités par l'AFB1 et les groupes prétraités par l'EPP ( $201 \pm 12.72$  UI/L) ou la quercétine ( $191 \pm 2.82$  UI/L).

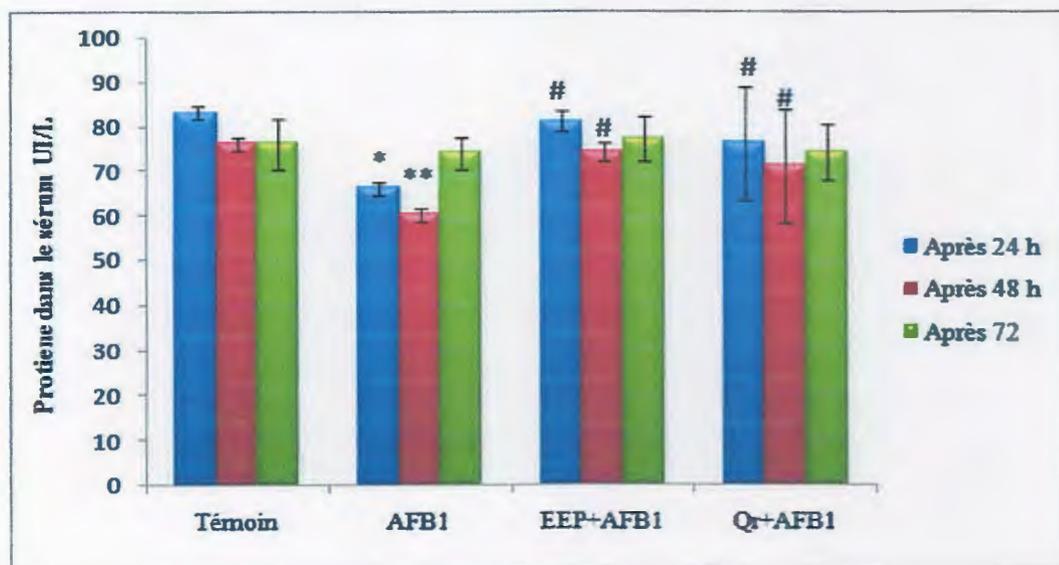
Une augmentation après 48 h statistiquement très significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la TGO ( $294 \pm 4.94$  UI/L) chez les rats traités uniquement par l'AFB1 (1mg/kg) contre  $216 \pm 2.82$  UI/L avec le groupe témoin. Par contre une diminution statistiquement significative ( $p < 0.05$ ) de l'activité de la TGO enregistré chez les rats prétraités par l'EPP ( $167 \pm 16,26$  UI/L) ou la quercétine ( $172 \pm 3,53$  UI/L) par rapport à la valeur enregistrés chez les rats traités uniquement par l'AFB1.

La valeur de la TGO est retourné à son niveau initial après 72 h du traitement par l'AFB1 (1mg/kg) chez le groupe d'animaux traités uniquement par ce dernier ( $208 \pm 29,69$  UI/L). Aucune différence significative n'a été remarquée après 72 h entre les valeurs de l'activité enregistrées chez les rats prétraités par l'EPP ( $186 \pm 12,02$  UI/L) ou la quercétine ( $174 \pm 6,36$  UI/L) et la valeur enregistrée chez les rats traités uniquement par l'AFB1 ( $208 \pm 29,69$  UI/L).

Les activités sériques de TGO mesurées après 24 h chez le même groupe des animaux sont faiblement augmentées, après 48 h les activités ont été augmentées considérablement et après 72 h sont diminuées et retournées à l'état normal. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Yong-Seong et ses collaborateurs (2011), ils ont montré que l'injection intrapéritonéale de 3 doses de 150 µg/kg pendant de l'AFB1, a augmenté l'activité sérique de cette enzyme dans le foie jusqu'à 48 h et puis diminué d'une façon dépendent du temps (Yong-Seong K. et al., 2011). Donc, Les radicaux libres provoquent la peroxydation lipidique de la membrane de myocytes menant à la dérégulation de son intégrité et sa perméabilité par conséquent les 3 enzymes sont déchargées de tissus cardiaque vers le sang (Vandana S., et al., 2009 ; Goyal S., 2009 ; Othman A. et al, 2012).

#### IV.4. 3. Dosage des protéines sériques

Les résultats de dosage des protéines sériques sont rapportés dans la figure 21.



**Figure 21 : Les valeurs plasmatiques des protéines pour tous les groupes mesurés après 24 h, 48 h et 72 h de l'administration de l'AFB1).**

(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ), (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ) (#) désigne un effet significatif ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenus dans notre étude après 24 h ont révélé une diminution significative ( $p < 0,05$ ) du taux sérique des protéines ( $66 \pm 1,41$ UI/L) chez les rats recevant uniquement l'AFB1 (1mg/mg) par rapport aux rats témoins ( $83 \pm 0,5$  UI/L). Cependant, une augmentation très faible, statistiquement significative, du taux sérique des protéines chez les rats prétraités par

l'EEP ( $81 \pm 1,41$  UI/L) ou la quercétine ( $76 \pm 4$  UI/L) par rapport aux rats recevant uniquement l'AFB1.

On a constaté après 48 h une diminution très significative ( $p < 0,01$ ) du taux des protéines sériques chez les rats du groupe traité uniquement par l'AFB1 ( $60 \pm 1,41$  UI/L) contre une activité de  $81 \pm 1,41$  UI/L avec le groupe témoin. Par contre chez les deux groupes des rats prétraités par EEP ( $74 \pm 2,12$  UI/L) ou la quercétine ( $71 \pm 12,72$  UI/L) on remarque une faible augmentation, statistiquement significative ( $p < 0,05$ ), par rapport aux résultats obtenus chez le groupe des rats recevant uniquement l'AFB1.

Les résultats obtenus après 72 h de l'administration de l'AFB1 ont montré que l'activité plasmatiques des protéines ont été très voisines chez les quatre groupes expérimentaux. L'étude statistique n'a révélé aucune différence significative ( $p > 0,05$ ).

Le taux des protéines sériques obtenu chez le groupe des animaux traité uniquement par la dose de 1mg/kg de l'AFB1 a diminué par rapport à celui obtenu chez les animaux témoins et les animaux prétraités par l'extrait ou la quercétine. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Sharma et ces collaborateurs (2011), ils ont trouvé que l'administration de  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  de l'AFB1 par voie orale pendant 45 jours a diminué le taux sérique de protéines. Ils sont aussi en accord avec les résultats obtenus par Hassan et ces collaborateurs (2010) ils ont trouvé qu'après l'injection intraperitonéale de 1.5 mg/kg de l'AFB1, le taux plasmatique des protéines est diminué (Sharma V. et al., 2011 ; Hassan A.A., 2010).

La diminution du niveau des protéines sériques est un indicateur de l'effet toxique de l'AFB1. On peut dire que l'AFB1 altère la biosynthèse des protéines en formant des adduits avec l'ADN, l'ARN et les protéines ou inhibe la synthèse d'ARN, d'ADN et l'activité d'ARN-polymérase, et provoque la dégranulation du réticulum endoplasmique. La réduction de la teneur en protéines peut être également due à une nécrose augmentée dans le foie (Sharma V. et al., 2011).

Nos études ont montré que le prétraitement des animaux par l'EEP ou la quercétine donne des résultats de la teneur en protéines proches à ceux mesurés dans le groupe témoin. C'est résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Verma et Neeta (2008), ils ont trouvé que le prétraitement par l'extrait de la *Curcumin* contenant les polyphénols, par une dose de 2 mg/kg pendant 45 jours prévient la diminution de taux de protéines pendant l'administration de 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de l'AFB1 (Verma R.J. et Neeta M., 2008). Les composants de l'EEP ont un effet préventif en empêchant la formation des adduits nuisibles.

## VI.5. Evaluation de l'effet antioxydant de l'extrait éthanolique de la propolis *in vivo*

### VI.5.1. Dosage du MDA

La peroxydation lipidique est l'un des plus anciens effets connus des radicaux libres. Le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique est le malondialdéhyde (MDA), notamment pour simplifier la méthode de dosage.

Les variations de la quantité du MDA dans le tissu cardiaque après un traitement par l'aflatoxine 1mg/kg sont présentés dans la figure 22.

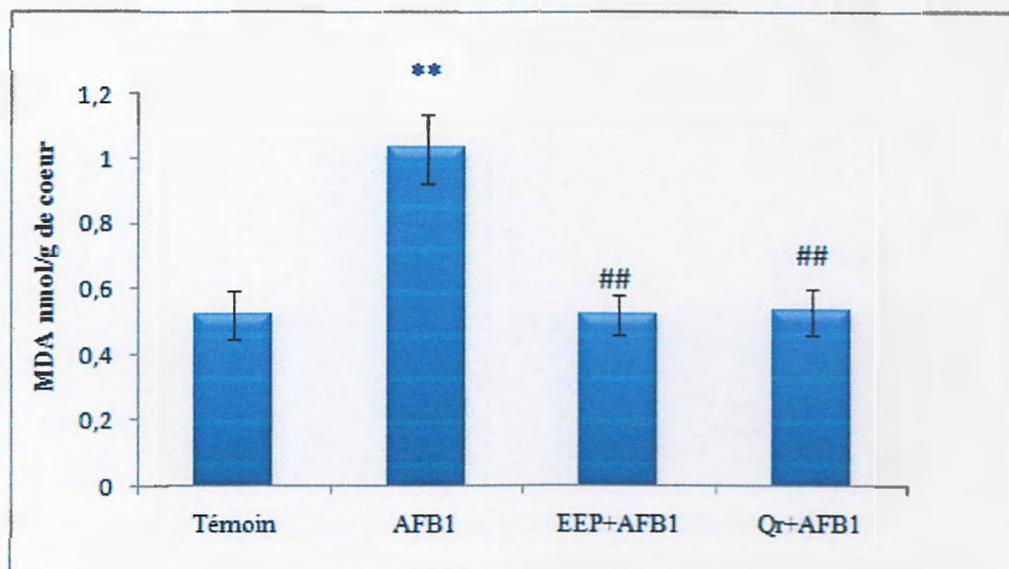


Figure 22 : Variation des taux du MDA cytosolique cardiaque après 7 jours de l'administration de l'AFB1 (1mg/kg).

(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ) (##) désigne un effet très significatif ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenus montrent une augmentation très significative ( $p < 0,01$ ) du taux du MDA cytosolique cardiaque ( $1,03 \pm 0,1$  nmoles/g de cœur) chez les rats traités uniquement par l'AFB1 (1 mg/kg) par rapport aux rats témoins ( $0,52 \pm 0,073$  nmoles/g de cœur). Par contre le taux du MDA est conservé à son niveau normal chez les groupes des animaux prétraités par l'EEP (100 mg/kg) qui atteint  $0,52 \pm 0,06$  nmoles/g de cœur ou la quercétine (10mg/kg) qui atteint  $0,053 \pm 0,073$  nmoles/g de cœur. Donc, une différence très significative a été observé ( $p < 0,01$ ) par rapport à la valeur obtenue chez le groupe des animaux recevant seulement l'AFB1.

Le taux du MDA obtenu chez le groupe des animaux traités uniquement par la dose de 1mg/kg de l'AFB1a augmenté par rapport à celui obtenu chez les animaux témoins et les animaux prétraités par l'extrait ou la quercétine. C'est résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Alkreathy et ces collaborateurs (2010). Eraslen et ces collaborateurs (2011) et Mohammadien et ses collaborateurs (2012). Alkreathy et ces collaborateurs ont indiqué que l'injection intrapéritonéale de 25 mg/kg pendant 27 jours de la doxorubicine seul a augmenté le taux du MDA après 48 h, Eraslen et ces collaborateurs ont montre que l'instillation gastrique de 125 µg/kg de l'AFB1 pendant 14 jours a augmenté le taux du MDA dans les tissus cardiaques et Mohammadien et ses collaborateurs ont indiqué que l'administration de 85 mg/kg de l'isoproterenol augmente le taux du MDA après 11 heures de traitement (Alkreathy H., 2010 ; Eraslen G., 2011).

Le taux élevé du MDA montre que la dose administrée de l'AFB1 a clairement provoquée une peroxydation lipidique des membranes cellulaires cardiaques indiquant l'effet cardiotoxique de ce produit.

Le groupe d'animaux prétraité par l'extrait ou la quercétine puis traité par une dose de 1mg/kg de l'AFB1 a marqué un taux du MDA inférieur à celui mesuré chez les animaux traités uniquement par l'AFB1 et proche à celui mesuré chez les animaux témoins. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Devika et stanely Minzen prince, 2008, Mosaad et ses collaborateurs (2010) et Thippeswamy et ses collaborateurs (2011). Devika et stanely Minzen prince ont indiqué que le prétraitement par l'épigallocatechin 30 mg/kg pendant 21 jours a diminué le taux du MDA après l'administration de deux doses séparées 100 mg/kg de l'isoproterenol, Mosaad et ses collaborateurs ont montré que le prétraitement par l'extrait de ginseng qui est riche en polyphénols 150 mg/kg pendant 21jours prévient l'augmentation du taux du MDA dans le foie après l'administration de 17 µg/kg de l'AFB1 dans le corn d'œil pendant deux jours et 25 mg/kg dans l'alimentation pendant 6 jours, Thippeswamy et ces collaborateurs ont indiqué que l'administration de l'extrait de *Phyllanthus Niruri* (200 mg/kg) qui est riche en polyphénols pendant deux semaines prévient l'augmentation de taux du MDA chez le groupe traité par la doxorubicine (2.5 mg/kg) pendant deux semaines (Devika P.T. et stanely Minzen prince P., 2008 ; Thippeswamy A.H.M. et al., 2011).

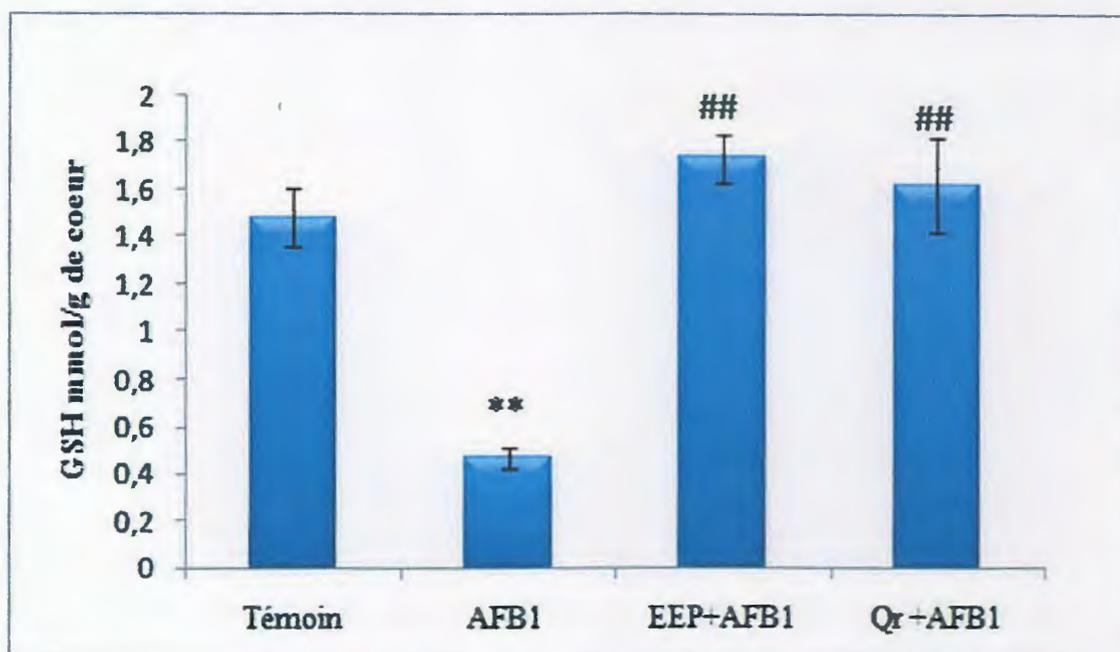
Ces résultats montrent que le prétraitement des animaux par l'extrait ou la quercétine a considérablement réduit la peroxydation lipidique induite par la dose administrée de l'AFB1 et montrent également que l'effet préventif de l'EEP contre la toxicité cardiaque induite par l'AFB1 est proche de celui de la quercétine qui est un flavonoïde de référence.

La toxicité cardiaque de l'AFB1 est peut être liée à sa capacité de générer des radicaux libres (Chopra S. et al., 1995). Les radicaux libres générés par l'AFB1 peuvent affecter les tissus sains, comme le cœur, causant des altérations morphologiques et des dommages fonctionnels (Maluf F.C. et al., 2002).

L'effet préventif observé de notre extrait ethanolic contre la toxicité cardiaque induite par l'AFB1 est très probablement dû à la présence des polyphénols et essentiellement des flavonoïdes dans l'extrait. Les polyphénols sont des piègeurs des radicaux libres formés dans diverses circonstances (Hus C.Y., 2006). leur activité antioxydante est due principalement à leur propriété rédox : ils agissent comme agents réducteurs, donneurs de l'hydrogène (Duarte J. et al., 2001). Au cours de leur mécanisme de piégeage des radicaux libres, il se forme des radicaux libres phénoxyles et qui sont moins réactifs (Marfak A., 2003). Les polyphénols sont connus aussi par leur capacité de chélater et désactiver les ions métalliques des métaux de transition comme le fer et le cuivre. Leurs structures chimiques les permettent de former des complexes légers avec ces ions métalliques, empêchent ces derniers de réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former le radical libre toxique  $\text{OH}^\bullet$  à travers la réaction de fenton (Duarte J. et al., 2001). Grâce à leur capacité de capturer et de neutraliser les radicaux libres générés par l'AFB1, les polyphenols peuvent inhiber la peroxydation lipidique des membranes cellulaires induite par ce produit (Mosaad A. et al., 2010), empêchant ainsi les dégradations liées à l'intense réactive de ces radicaux libres au niveau des phospholipides membranaires, réduisant alors le taux du MDA et des autres produits de la peroxydation lipidique.

#### **VI.5.2. Dosage du GSH**

Nous avons dosé le GSH cytosolique cardiaque pour tous les animaux des quatre rats. Les résultats sont rapportés dans la figure 23 .



**Figure 23 : Variation du taux du GSH cytosolique cardiaque après 7 jours de l'administration de l'AFB1 (1mg/kg).**

(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ) (##) désigne un effet très significatif ( $p < 0.05$ ).

Nous avons constatés une diminution très significatif ( $p < 0,01$ ) chez les rats traités uniquement par AFB1 ( $0,47 \pm 0,04$  mmol/g de cœur) par rapport aux rats témoins ( $1,48 \pm 0,12$  mmol/g de cœur). Par contre une élévation très significative ( $p < 0.01$ ) de la valeur du GSH chez les rats prétraités par l'EEP ( $1,73 \pm 0,1$  mmol/g de cœur) ou la quercétine ( $1,62 \pm 0,19$  mmol/g de cœur) par rapport à la valeur enregistrée chez le groupe d'animaux recevant uniquement l'AFB1.

Lors du traitement par l'AFB1 uniquement, le taux de GSH cytosolique cardiaque mesuré après 07 jours de l'injection de ce produit est nettement diminué. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Yener et ces collaborateurs (2009) qui ont montré que l'administration de l'AFB1 25  $\mu$ g/kg par voie orale pendant 90 jours a diminué le taux de GSH dans le foie, les reins et le cerveau, ils sont également similaires aux résultats obtenus par Shaymal et ces collaborateurs (2010) qui ont montré que l'administration de l'AFB1 (1.5mg /kg) pendant 72 h par voie intraperitonéale a diminué le taux de GSH dans le foie. Cette diminution est très probablement due aux espèces radicalaires toxiques générées par ce produit et qui sont attaquées et neutralisées

par le système de détoxification, provoquant la baisse de la concentration du GSH cytosolique cardiaque qui appartient à ce système de détoxification (Yener Z. et al., 2009 ; Shaymal S. et al., 2010).

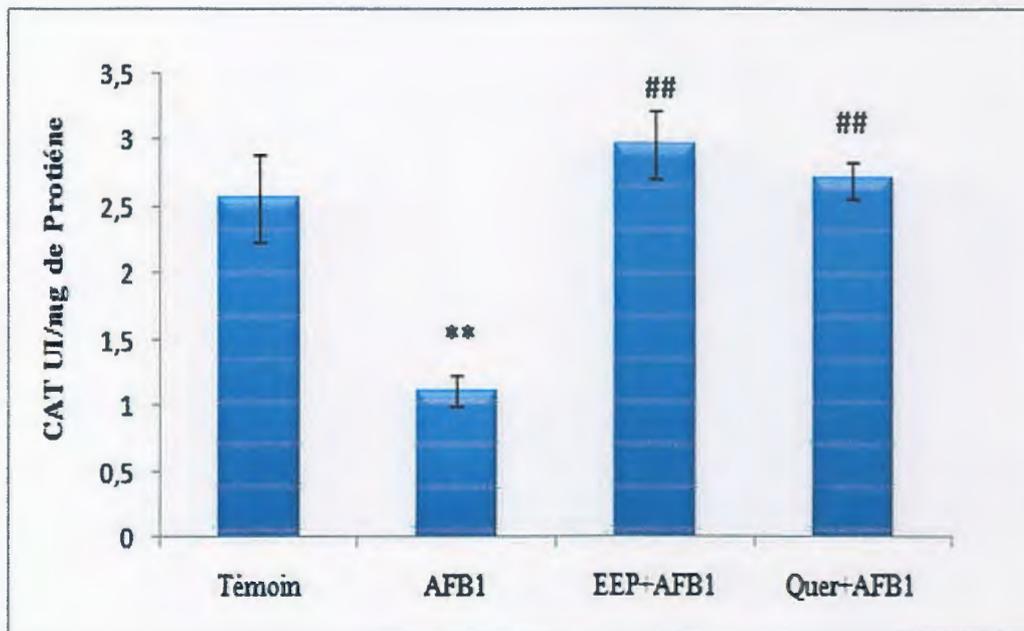
Le prétraitement des animaux par l'extrait éthanolique ou la quercétine avant l'injection de l'AFB1 a empêché la diminution du GSH par rapport aux animaux recevant seulement ce produit, donnant un taux du GSH proche à celui mesuré chez les animaux témoins non traités. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenus par Quine et Kannan (2009) qui ont indiqué que l'administration de 100 mg/kg de l'acide ellagique pendant 10 jours prévient la diminution de taux de GSH après l'administration de 15 mg/kg de l'isoproterenol et également avec ceux obtenus par Stilinović et ses collaborateurs (2011), ils ont trouvé que l'administration de 60 mg/kg de silymarin contenant les flavonoïdes par voie orale pendant 12 jours prévient la diminution de taux de GSH après l'administration de 1,66 mg/kg de la doxorubicine par voie intrapéritonéale pendant 11 jours (Quine D.S. et Kannan M.M., 2009 ; Stilinović ., 2011).

Ce résultat obtenu montre l'effet préventif de l'EEP contre la diminution du taux du GSH cytosolique cardiaque provoqué par l'AFB1 après 07 jours de l'administration de ce dernier. Cet effet préventif est peut être dû à l'effet piègeur puissant des polyphénols et essentiellement des flavonoïdes de l'extrait éthanolique, qui attaquent et neutralisent les radicaux libres générés par l'AFB1 et les empêchent à réagir avec le glutathion, comme il peut être dû à la capacité de cet extrait à induire la synthèse et/ou la régénération du GSH après sa consommation suite aux attaques radicalaires induites par l'AFB1, pour maintenir son taux normal.

#### **VI.5.2. Le dosage de l'activité de la catalase**

La catalase est une enzyme antioxydante présente au niveau du foie, des reins et du cœur des rats. L'activité de cette enzyme a été déterminée sur la fraction cytosolique du cœur.

La figure 24 présente l'effet de l'AFB1 et l'effet préventif de l'extrait éthanolique et la quercétine sur le taux de la catalase.



**Figure 24 : Dosage de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique .**

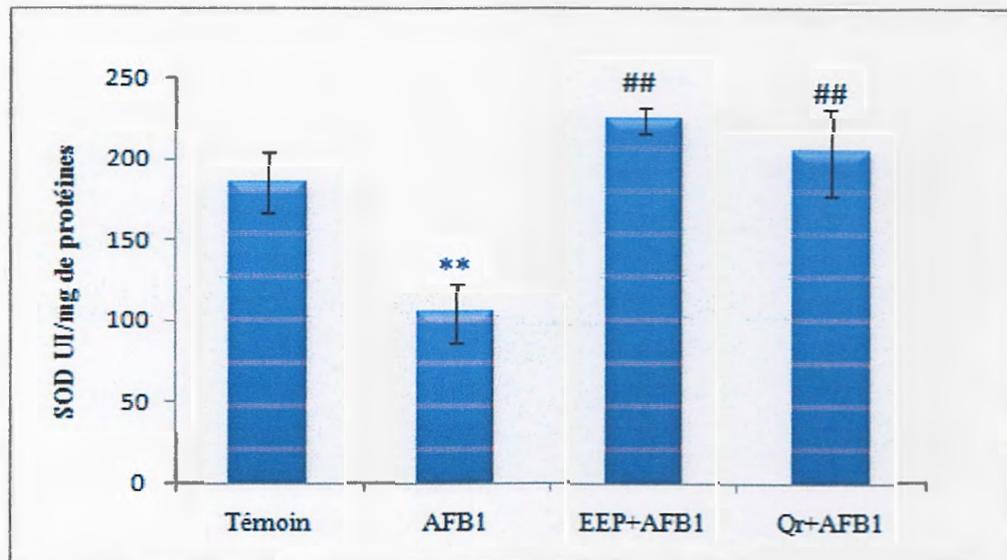
(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ) (##) désigne un effet très significatif ( $p < 0.05$ ).

De notre étude nous avons constaté que le traitement par l'AFB1 (1mg/kg) entraîne une réduction très significative ( $P < 0,01$ ) de l'activité de la catalase ( $1,11 \pm 0,11$  UI/mg de protéines) par rapport à celle enregistrés chez les rats témoins ( $2,56 \pm 0,32$  UI/mg de protéines). Par contre chez les rats prétraités nous avons constaté que l'administration journalière d'EEP ( $2,96 \pm 0,25$  UI/mg de protéines) ou la quercétine ( $2,70 \pm 0,13$  UI/mg de protéines) provoque une augmentation très significative ( $p < 0,01$ ) dans l'activité de la CAT cytosolique par rapport au groupe traité uniquement par l'AFB1.

#### VI.4.4. Le dosage de l'activité de la SOD

L'activité de la SOD mesurée dans la fraction cytosolique cardiaque pour les rats traités par l'AFB1 et les rats prétraités par l'extrait éthanolique ou la quercétine a montrée dans la figure 25.



**Figure 25 : Dosage de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique.**

(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ) (##) désigne un effet très significatif ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que l'activité de la SOD est significativement diminuée ( $p < 0.01$ ) chez les rats recevant uniquement l'AFB1 ( $184,78 \pm 18,91$  UI/mg de protéines) par rapport aux rats témoins ( $104,3 \pm 18,36$  UI/mg de protéines). Par contre chez les rats prétraités nous avons constaté que l'administration journalière d'EEP ( $223,7 \pm 7,58$  UI/mg de protéines) ou la quercétine ( $204,36 \pm 27,28$  UI/mg de protéines) provoque une augmentation très significative ( $p < 0,01$ ) dans l'activité de la SOD cytosolique par rapport au groupe traité uniquement par l'AFB1.

La modification de l'équilibre des enzymes antioxydantes causée par la baisse de l'activité de la SOD et de la CAT peut être responsables de l'insuffisance des défenses antioxydantes dans la lutte contre les ROS ce qui provoquent des dommages tissulaires (Sivajothi V. et al., 2008). La SOD est l'une des plus importantes enzymes antioxydantes du système de défense de l'organisme. La fonction majeure de la SOD est de catalyser la dismutation de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot -}$  en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et donc de réduire les effets toxiques dus à ce radical libre ou des autres radicaux qui dérivent des réactions secondaires (Yue et al., 2005). Cependant, ce processus peut entraîner la peroxydation lipidique si l' $H_2O_2$  n'est pas décomposé immédiatement (Taleb-Senouci et al., 2009). La catalase (CAT) est une hémoprotéine qui catalyse la réduction des peroxydes d'hydrogène en  $H_2O$  et en oxygène et protège les tissus des radicaux hydroxyles qui sont très réactifs (Sathishsekar D. et Subramanian S., 2005).

Lors du traitement par l'AFB1 seul, on a remarqué une réduction de l'activité enzymatique de la SOD et la CAT cytosoliques. Selon Blaji R. et ses collaborateurs, cette réduction est due à la destruction de ces enzymes suite au stress cellulaire induit par les métabolites toxiques de l'AFB1 ou encore suite à son oxydation par les ROS (Blaji R. et al., 2009).

Cette réduction de l'activité enzymatique de la SOD et la CAT cytosoliques cardiaque, dû au traitement par l'AFB1, à été observée également dans le foie par Blaji et ses collaborateurs (2009) après six jours de l'injection peritonéale de 2mg/kg de l'AFB1 et aussi dans les reins par Sharma et ses collaborateurs (2011) après l'administration de 2 µg/kg pendant 25 jours (Blaji R. et al., 2009 ; Sharma V., 2011).

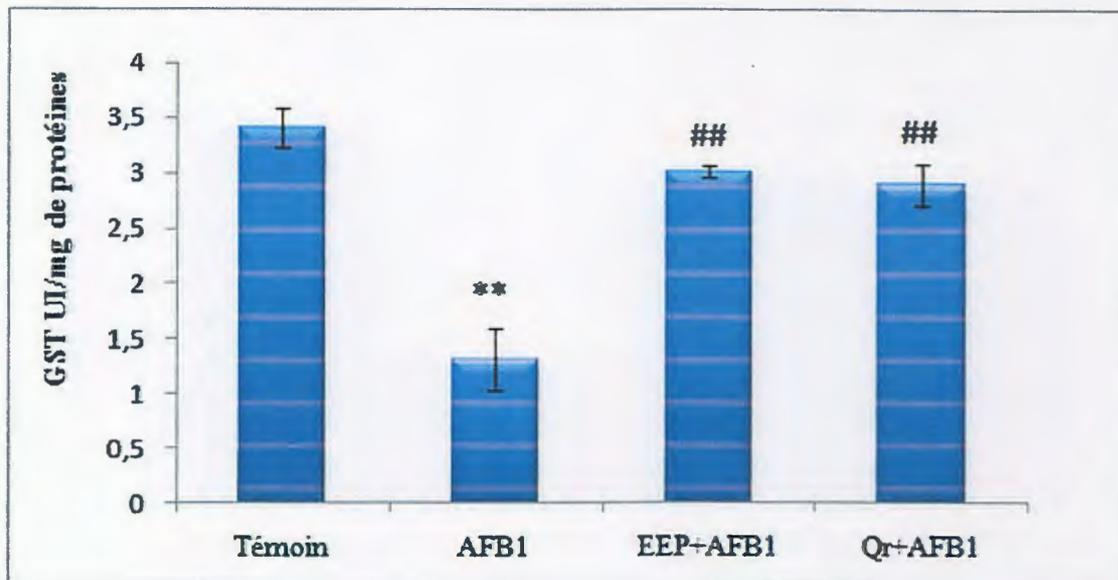
Le traitement des animaux par l'extrait éthanolique ou la quercétine avant l'injection de l'AFB1 a augmenté l'activité enzymatique de la SOD et la CAT cytosoliques par rapport aux animaux recevant seulement ce produit, donnant un taux de SOD et de catalase proche à celui mesuré chez les animaux témoins non traités. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenu par Kumar et ses collaborateurs (2009), Ils ont trouvé que l'administration de l'extrait de silymarin qui contient les flavonoïdes 100 mg/kg par voie orale pendant 7 jours a augmenté l'activité de la SOD et la CAT après 72 de l'injection de 1mg/kg de l'AFB1 (Kumar G. et al., 2009).

Ceci prouve l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis contre la toxicité induit par l'AFB1. Cette amélioration de l'activité enzymatique est due à l'induction de l'expression génétique ou à l'activation de ces enzymes.

Cette amélioration des activités enzymatiques de la SOD et la CAT cytosoliques cardiaque, dû au prétraitement par l'extrait éthanolique de la propolis ou la quercétine, à été observée également par Paul Brookes et el (2002) qui montrent l'effet protecteur de la quercétine lors de l'ischémie réperfusion cardiaque. Ils ont trouvé que le traitement par la quercétine augmente l'activité enzymatique de la SOD et ont proposé que cela revienne à sa capacité d'induire la synthèse proteique de l'enzyme par action au niveau génétique (Paul B. et al., 2002).

#### **VI.4.5. Le dosage de la GST**

Les résultats obtenus dans le dosage de la GST cytosolique cardiaque chez les quatre lots sont présentés dans la figure 26.



**Figure 26 : Dosage de l'activité enzymatique du GST cytosolique.**

(\*) Comparaison entre le témoin et le groupe traité par l'AFB1, (#) Comparaison entre les deux groupes prétraités par EEP et quercétine et lots traités par l'AFB1.

Les valeurs sont données en moyenne  $\pm$  écart type. (\*\*) désigne un effet très significatif ( $p < 0.01$ ) (##) désigne un effet très significatif ( $p < 0.05$ ).

Les résultats obtenus montrent une élévation très significative ( $p < 0.01$ ) de l'activité de la GST ( $1,31 \pm 0,28$  UI/mg de protéines) chez les rats traités uniquement par l'AFB1 (1mg/kg) par rapport à ceux enregistrés chez les rats du groupe témoin ( $3,41 \pm 0,17$  UI/mg de protéine). En comparant l'activité de la GST des deux groupes prétraités par l'EEP ( $3,03 \pm 0,05$  UI/mg de protéines) ou la quercétine ( $2,89 \pm 0,18$  UI/mg de protéines) avec le groupe des rats traités par l'AFB1 on montre que l'activité de cette enzyme est diminuée très significativement ( $p < 0.01$ ) pour les deux groupes.

Lors du traitement par l'AFB1 uniquement, on a remarqué une réduction de l'activité enzymatique de la GST cytosolique cardiaque. Cette réduction a été observée par Ramadoss et ses collaborateurs (2012) ils ont trouvé que l'administration de 8.5 mg/kg de l'isoproterenol a diminué l'activité enzymatique de GST, et également par Varalakshmi et ses collaborateurs, ils ont trouvé que l'administration de 1 mg/kg de l'AFB1 par voie intrapéritonéale a diminué l'activité de la GST après 72 h (Ramadoss et al., 2012).

Cette réduction est due à l'utilisation excessive de cette enzyme pour la conjugaison du GSH avec l'AFB1 (Kumagai S., 2007).

Le traitement des animaux par l'extrait éthanolique ou la quercétine avant l'injection de l'AFB1 a augmenté l'activité enzymatique de la GST cytosoliques observée chez les animaux prétraités, donnant une activité du GST proche à celui mesuré chez les animaux témoins non traités. Ces résultats sont en corrélation avec ceux obtenu par Farombi et ses collaborateurs, (2005) ils ont montré que l'administration de biflavonoïdes naturel 100 mg/kg pendant deux semaines prévient la diminution de l'activité de GST après l'injection de l'AFB1 2 mg/kg de l'AFB1 (Farombi E.O., 2005).

Cette amélioration de l'activité enzymatique est peut être due à l'effet inhibiteur des polyphenols de la propolis (Murias M., 2006).

## VI. Conclusion

Les aflatoxines sont des mycotoxines synthétisés par des souches *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*. l'aflatoxine B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>) est l'une des plus célèbres mycotoxines possédant le profil toxique le plus sérieux, La biotransformation de l'AFB<sub>1</sub> dans le foie par les enzymes microsomaux conduit à la génération des métabolites toxiques comme AFB<sub>1</sub>-8,9-époxyde et les espèces réactives de l'oxygène qui sont capables de réagir avec les lipides insaturés et l'initiation des chaînes de réactions de peroxydation des lipides membranaires de myocytes causant des anomalies structurales. Les flavonoïdes sont des composés naturels largement présents dans les fruits, les légumes et les végétaux supérieurs, ils sont connus par leur activité antioxydante. Ils sont des piègesurs des radicaux libres, des chélateurs des ions métalliques et également des inhibiteurs d'enzymes responsables de la formation des radicaux libres. La Propolis désigne toute une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies par les abeilles, elle a des propriétés thérapeutiques diverses grâce à la présence de polyphénols.

Notre étude est effectuée *in vitro* par le test au radical libre DPPH° et *in vivo* sur des rats *wistar*, visant à étudier l'effet cardiotoxique de l'AFB<sub>1</sub> et évaluer l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis. Il existe une évidence considérable à partir de cette étude :

Après 24, 48 et 72 heures de l'administration de l'AFB<sub>1</sub>, les biomarqueurs enzymatiques cardiaques LDH, CPK et TGO ont augmenté. Après 7 jours, le taux de peroxydation lipidique a augmenté et le système de défense enzymatique et non enzymatique a diminué.

Le prétraitement par l'extrait éthanolique de la propolis pendant 10 jours, prévient l'augmentation des biomarqueurs enzymatique cardiaque et le taux de peroxydation lipidique et la diminution du système de défense enzymatique et non enzymatique.

Les résultats obtenus de notre présente étude sont très considérables car ils ouvrent beaucoup de perspective notamment sur l'AFB<sub>1</sub>. Cette primaire étude montrant la cardiotoxicité aiguë de ce produit, encourage beaucoup à établir une étude complète et plus profonde. Des études supplémentaires, pouvant être basées sur :

- La recherche d'autres effets probables de l'AFB<sub>1</sub> dans la mitochondrie.
- Etude de l'effet cardiotoxique à long terme.

- Etude de la mutagénicité
- Etudes par HPLC des adduits de l'aflatoxine
- Etude cinétique

## Références bibliographiques

- Abraham L., 2006.** histologie et biologie cellulaire. Boek et larcier, 1<sup>ère</sup> Edition, Bruxelles, p 322.
- Agag B. I. 2004.** Mycotoxine in food and feeds 1- Aflatoxines, Ass. Univ. Bull. Environ. Res., 7:145-160.
- Aguié V., Sausse P., Meudec E., Cheynier V. et Douillard R., 2008.** Polyphenol-Casein Complexes at the Air/Water Interface and in Solution: Effects of Polyphenol Structure, J. Agric. Food Chem., 56 : 9600-9611.
- Alpsy L., 2010.** Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. Afr. J. biotech., 17: 2474-2481.
- Ameen Abdulmajeed N., 2011.** Therapeutic ability of some plant extracts on aflatoxin B1 induced renal and cardiac damage, Arabian J. Chem. 4:1-10.
- Andreyev A.Y., Kushnareva E.Y. et Starkov A.A., 2004.** Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species, Bioch., 70: 200-214.
- Auberval N., 2010.** Prévention du stress oxydant dans le diabète et ses complications par des antioxydants d'origine naturelle. Thèse de doctorat de l'université de Strasbourg, pp 50-53.
- Autréaux B. et Toledano M.P., 2007.** ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, mol. Cell. Bio., pp 813-824.
- Ayub M.Y. et Sachan D.S., 1997.** Dietary factors affecting aflatoxin B1 carcinogenicity. Mal J. Nutr. 3: 161-179.
- Bahorun T., Grissier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur G., Gazin G.C., Pinkas M. et Gazin M., 1996.** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arz.Forsch., 46: 1086-1089.
- Banskota H.A., 2001.** Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines, J. of Ethno. pharm., 80 : 67-73.
- Barouki R., 2006.** Stress oxydant et vieillissement. Service de biochimie, 22 : 266-72.
- Bartling D.R., Radzio U. et Steiner E.W., 1993.** A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*. Eur. J.Bioch., 216: 579-586.
- Barus C., 2008.** Etude électronique des molécules antioxydantes et de leur association en milieu homogène et biphasique ; application aux produits dermocosmétiques. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, pp 7-20.

- Bayir H. et Kagan E.V., 2008.** Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis – there is nothing more practical than a good theory. *Bio. Med. Ltd*, 12: 197-206.
- Beauchamp C. et Fridovich I., 1971.** Assay of superoxide dismutase. *Anal. Bioch.* 44:276-287.
- Belkheiri N., 2010.** Dérivés phénoliques à activité antiathérogènes. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, pp 7-13.
- Bertrand P., 2008.** Implication du stress oxydant dans la toxicité du plomb sur une plante modèle *vicia faba*. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, p 51.
- Blanc M., 2010.** Propriétés et usage médical des produits de la ruche, Thèse de doctorat de l'université de Limoges, pp 20-25.
- Blokhina O., Virolainen E., Kurt V.F., 2003.** Antioxydants, oxydatif damage and oxygen deprivation stress, *An. bot.*, 91: 179-194.
- Boonstra J., Post J.A., 2004.** Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycleproression in mammalian cells, *Int. J. genomes*, 337: 1-13.
- Bouayed J., 2007.** Etude de la corrélation anaxeité, statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants, neuroactifs des polyphénols extraits de *prumus domestica L.*. Thèse de doctorat de l'université de Paul Verlain-Metz, pp 8-37.
- Bouhadjera K., 2005.** Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahsriennes *Oudneya africana* et *Aristida pungens* . Thèse de doctorat de l'université de Abo Bekr Belkaid, pp 44-69.
- Bouheroum M., 2007.** Etude phytochimique des plantes medicinales algériennes :*Rhantherim adpressum* et *Ononis anfustissima*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine, pp 67-99.
- Bravo L., 1998.** Polyphenols: Chemistry; Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nut. Rev.*, 56: 213-227.
- Cabasson A., 2008.** Estimation et analyse des intervalles cardiaques. Thèse de doctorat de l'université de Nice-Sophia Antipolis, p 25.
- Clairborne A., 1985.** Catalase activity, In: Greenwald R.A. (Ed), *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 283-284.
- Cook N.C. et Samman S., 1996.** Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nut. Bioch.*, 7: 66-76.
- Cos p., Ying L., Calomne M., Hu J.P., Climanga K., Van-Poek B., Pieters L., Vlietinck A.J., Vanden Berghe D., 1998.** Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J.Nat.Prod.*, 61: 71-76.

**D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C. et Masella R., 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability, *Ann Ist Super Sanità* 43: 348-361.

**D'Archivio M., Filesi C., Vari R., Scazzocchio B. et Masella R., 2010.** Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int. J. Mol. Sci.*, 11: 1321-1342.

**Defeng Wu, Ph.D., and Arthur I. C., 2003.** Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alc. R. Hel.*, 27: 277-284.

**Del Rio D., Costa L., Lean M. et Crozier A., 2009.** Polyphenols and health: What compounds are involved? , *Nut. Met. Cardio. D.* 20: 1-6.

**Delattre J. Durand G. et Jardillier J. C., 2003.** Biochimie pathologie (aspect moléculaire et cellulaire). 1<sup>ère</sup> Edition, pp 59-81.

**Dennis R. K., 2006.** Alcohol Metabolism's Damaging. *Alc. R. Hel.*, 29: 270-280.

**Dewick P.M., 2002.** The shikimate pathway: aromatic aminoacids and phenylpropanoids, John Wiley and Sons, Ltd, 876: 23-31.

**Diam M., 1978.** Etude des problèmes posées par les aflatoxines dans les aliments du bétail et de l'homme. Thèse de doctorat de l'école inter-etats des sciences et médecine vétérinaire, pp14-16.

**Domngupiapo F. Tchana A. et Mondipa P.F., 1989.** Les aflatoxines dans les céréales et les aliments prêts à la consommation au Cameroun. AUPELF-UREF, Eds. John Libbey Eurotext, pp 157-163.

**Dragan A., 2003.** Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids, *croatica chem. act.*, 76: 55-61.

**Dulhunty A., Gage P., Curtis S., Chelvanayagam G. et Board P., 2001.** The glutathione structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J. Biol. Chem.*, 276: 3319-3323.

**Eaton D.L. et Gallagher E.P., 1994.** Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Pharm. Toxicol.*, 34: 135-172.

**Elaine N., 2005.** Anatomie et physiologie humaine. Marieb, Paris, 6<sup>ème</sup> Edition, pp 696-723.

**Elkoury A., 2007.** Champignons mycotoxinogène et ochratoxine A et aflatoxine B1(AFB1) dans les vignobles libanais : occurrence et origine. Thèse de doctorat de l'université de Saint Joseph de Beyrouth, pp 10-11.

**Ellman G. L., 1959.** Plasma antioxidants. *Arch. Bioch. Biophys.*, 82: 70-77.

**Ercal N., 2001.** Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanism involved in metal induced oxidative damage. *Current topics in med. chem.*, 1: 529-539.

- Evan P., Kent L., Patricia L. et David L., 1996.** The kinetics of aflatoxines B1 oxidation by humain CDNA-Epressed and humain liver microsomal cytochromes P 450 1A<sub>2</sub> and 3A<sub>4</sub>, *toxico. pharm.*, 141: 595-606.
- Evans J.L. et Goldfin I.D., 2000.** A-Lipoic acid: A multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes, *Diabetes tech. ther.*, 2: 401-413.
- Fageat L., 2008.** Les mycotoxines chez les bovins. Thèse de doctorat de l'université de Claud-Bernard-Lyoni, p 62.
- Fernandez-Canon J.M. et Penalva M.A., 1998.** Characterization of a fungal maleylacetoacetate isomerase gene and identification of its human homologue. *J. Biol. Chem.* 273: 329-337.
- Ferreira A.L.A., Matsubara L.S. et Matsubara B.B., 2008.** Anthracycline-Induced Cardiotoxicity, *Cardio. Hemato. Med. Chem.*, 6: 278-281.
- Finaud J., Lac G. et Filaire E., 2006.** Oxidative Stress.relationship with exercise and traiting. France, 36 : 327-358.
- Fremy J.M., 2009.** Evaluation des risques lies à la presence de mycotoxines dans les chaines alimentaires humaine et animale. Agence Francaise de sécurité sanitaire des aliments, 882 :1-9.
- Frutos P., Hervás G., Giráldez F. J. et Mantecón A. R., 2004.** Tannins and ruminant nutrition, *Spch. J. Agr. R.*, 2: 191-202.
- Galtier P., Meissonnier G.M. et Oswald I.P., 2005.** Aflatoxicoses chez le poc. Etude bibliographique de données cliniques et expérimentales, *Méd. Vét.*, 156 : 591-605.
- Ganzalo J., 2010.** Biotransformation of Aflatoxin B1 and Its Relationship with the Differential Toxicological Response to Aflatoxin in Commercial Poultry Species. *Afla. Biochem. Mol. Bio.*, pp 1-18.
- Garait B., 2006.** Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la GLISODIN<sup>®</sup>. Thèse de doctorat de l'université de Joseph Fourier, pp 8-27.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot B., Abedinzadeh Z., et Jore D., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène, *L'actualité chim.*, 11 : 91-96.
- Gaté L., Paul J., Nguyenba G., Teu K.D. et Tapiero H., 1999.** Oxydative stress induced in pathologies: the role of antioxydants, *biomed. pharm.*, 53: 169-180.
- Gattas G.J., Kato M., Soares Vieira J.A., Siraque M.S., Kohler P., Gomes L., Rego M.A. et Bydlowski S.P., 2004.** Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol.* 337:451-458.

- Gerard J. et Bryan A., 2007.** Principes d'anatomie et physiologie. Boeck, 4<sup>ème</sup> Edition, p 786.
- Gerhard R., 1993.** Métabolismes des végétaux, presses polytechniques et universitaire romandes, 5<sup>ème</sup> Edition, p 322.
- Gianmaria F., Ferrazzano I, Amato I, Ingenito A., Zarrelli A., Pinto G. et Pollio A., 2011.** Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties, *Molecules* 16: 1486-1507.
- Gueye P., 2007.** Phénotypes majeurs de l'hémoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur les globules rouges. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur, pp 17-48.
- Guirdan K.A., 2008.** Investigation of the role of oxidative DNA damage in aflatoxin B1- induced pulmonary carcinogenesis-pH. D. thesis, queen's university at Kingston, pp 37-45.
- Hadj Salem J., 2009.** Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes nitraria retusa et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat de l'université de lorraine, pp 19-52.
- Haton C., 2005.** Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université paris VI pierre et Marie curie, pp 43-57.
- Havsteen H., 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharm. Ther.* 96: 67– 202.
- Hollander J.E., 2005.** The future of cardiac biomarkers. New concepts and emerging technologies for emergency physicians. Hospital of university of Pennsylvania. p 1-8.
- Hong J.Y., Yang he X., Tang L., Wang S.L., et Wang J.S., 2006.** Efficient activation of aflatoxin B1 by cytochrome P 450 2A<sub>13</sub>, an enzyme predominantly expressed in humain respiratory tract. *Int-J- Cancer* 118: 2665-2665.
- Hor Kov L., 2011.** Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function, *Interdiscip Toxicol*, 4: 114-124.
- Hussin S. et Jeffrey M., 2001.** Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals toxicology, 167 : 101-134.
- Iqbal K., Khan A. et Muzaffar M., 2004.** Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health, *Pak. J. Nut.*, 3: 5-13.
- Januel C., 2003.** Stress oxydant au niveau des plaquettes sanguines humaines dans le contexte du diabète (étude de glutathion et de la glutathion peroxydase). Thèse de doctorat de l'université de Lyon I, pp 41- 56.

**Jard G., 2009.** Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéarlénone, mycotoxines présente dans les céréales : adsorption biotransformation. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, p 6.

**Jiang A., Ruobing H., Zhida C., Xianghui Y. et GuangxianX., 2000.** Catalytic reaction mechanism of L- lactate dehydrogenase :an *ab initio* study. Sc. China, 43: 588-599.

**Jonas N. et Elias S. J. A., 2001.** Reactive oxygen species, antioxydants, AND the mammalian thioredoxin system. Fr. Bio. Med., 31: 1287-1312.

**Khanbabaee K. et van Ree T., 2001.** Tannins: Classification and Definition, Nat. Prod. Rep., 18 : 641-649.

**King Henry S., 2012.** Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review Stefan Bogdanov, Bee Product Science, 7: 81-87.

**Koh J., 2010.** Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes, Lee. Koh. Mol. Brain, 3: 1-9.

**Kone D., 2009.** Enquete ethnobotanique de six plantes médicales maliennes-extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante, Thèse de doctorat de université de bamaco,pp 22-40.

**Lagadic L., 1997.** Biomarqueurs en ecotoxicologie ( aspect fondamentale). Massan Paris, 1<sup>ère</sup> Edition, pp 125-142.

**Lamirault G., 2007.** Portrait moléculaires des pathologies cardiaques. Thèse de doctorat de l'université de Nantes, pp 17-65.

**Laverdière F., Hosten A., Theibaut L., Malle R., Gravejat G., Desclozaux B., 1999.** Les principales méthodes d'analyse. Dossier couplage . Centre des sciences des processus industrielle et naturelle.

**Le Bras M., Clément M.-V., Pervaiz1 S. et Brenner C., 2005.** Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. Histol Histopathol Cel. Mol. Bio., 20: 205.

**Lewandrowski K., Chen A. et Januzzi J., 2002.** Cardiac marker for myocardial infarction. A. S. clin. path.. 118: 93-99.

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

**López-Lázaro M., 2009.** Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin, Med. Chem., 9: 31-59.

**Luthar Z., 1992.** Polyphenol classification and tannin content of buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench), Fag. 12: 36 – 42.

- Mahmoud L., 2006.** Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease, Asia J. Cancer Pr., 7: 22-31.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. et Jimenez L., 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2, Am. J. Clin. Nutr. 79: 727- 747.
- Manuelle C., 2008.** Les 5 fonctions vitales du corps humain. Lamarre, ISBN 10 : 2757300806, ISBN 13 : 9782757300800.
- Maquart F.K., Borel J.P. et Giller Y., 2006.** précis de biochimie moléculaire (de la biologie à la clinique). Rison- Roch, paris , 1<sup>ère</sup> Edition, p 29.
- Marcucci M.C., 1994.** Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, Apidology, 26: 83-99.
- Marfak A.G., 2003.** Radiolyse gamma des flavonoïdes. étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse de doctorat de 'université de Limoges, pp 6-42.
- Maritim A. C., Sanders R. A. et Watkins J. B., 2003.** Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants. J. bioch. mol. toxico., 17: 26-36.
- Milan H., 2004.** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur, pp 13-21.
- Min B. Ahn U.D., 2005.** Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products, Fd. Sci. Biotech., 14: 152 -163.
- Mladěnka P., Zatloukalová L., Filipský T. et Hrdina R., 2010.** Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity, Free Radical Bio. Med. 49: 963-975.
- Monique G.A., Dominique B.R., Zohreh A. et Daniel J., 2003.** Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. act. chim., pp 92-96.
- Muanda F.N., 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de doctorat de l'université de Paul Verlaine-Mets, pp 56-76.
- Mykkanen H. , Huilian Z., Eeva S., Risto O., Wenhua L., Jing M., Nektaria P. et Heidi K., 2005.** Fecal and urinary excretion of aflatoxin B1 metabolites (AFQ1, AFM1 and AFB-N7-guanine) in young Chinese males, Int. J. Cancer: 115: 879-884.
- Nbuenninh M., 2007.** Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam, étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, p 26.
- Niki E., Yoshida Y., Saito Y. et Noguchi N., 2005.** Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Bioch. Bioph. R., 338 : 668-676.

**Nkhili E.Z., 2009.** Polyphénols de l'Alimentation : Extraction, Interactions avec les ions du Fer et du Cuivre, Oxydation et Pouvoir antioxydant. Thèse de doctorat de l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse, pp 87-98.

**Nordborg J., 2001.** Reactive oxygen species, antioxydants, and the mammalian thioredoxin system. *FR. Bio.Med.*, 31: 1287-1312.

**Nzengue Y., 2008.** Comparaison des mécanismes de toxicité redox de cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Thèse de doctorat de l'université de Joseph fourier, pp 13-32.

**O'Kennedy L., Medonnel B., Hearty S. et Leanard L., 2009.** Cardiac biomarkers and the case for point of care testing ,*clin. bioch.*, 42: 549-561.

**Ohkawa H., Ohishi, N. et Yagi K., 1979.** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction, *Anal. Bioch.*95: 351-358.

**Omngang M.F., Tchana A. et Moundipa P.F., 1989.** Les aflatoxines dans les céréales et les aliments prêts à la consommation au comeroun. *Aupelf-uref* . Eds, John Libbey Eurotext, paris, pp 157-163.

**Padmaja V. et Deepu P., 2009.** Cardiac biomarkers. *Hygeia*, 1: 5-6.

**Pandey K.B. et Rizvi S.I., 2009.** Current Understanding of Dietary Polyphenols and their Role in Health and Disease, *Current Nut. Fd. Sc.*, 5 : 249-263.

**Parris M., 1997.** Glutathione: Systematic protectant against oxidative and free radical damage, *Alternative Med.*, 2: 155-176.

**Paster C., 2005.** Intérêt de la supplimentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, pp 13-28.

**Pelmont J., 1993.** *Enzymes*. office de publication universitaire Alger, 1<sup>ère</sup> Edition, p 517.

**Petchkongkaew A., 2007.** Reduction of mycotoxin contamination level by *Bacillus* spp. Isolated from thai fermented soybean product (THUA-NAO). These de doctorat de l'université de Toulouse, pp 13-24.

**Pouget J.P., 2000.** Effet du rayonnement ionisant sur l'ADN cellulaire : mesure des bases puriques et pyrimidiques modifiées. Thèse de doctorat de l'Université de Paris, pp 160-185.

**Priymenko N., 2005.** Intérêt de la supplémentassions en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat de l'université de Toulouse, pp 45-50.

**Prokofjeva B.G., 2005.** Mycotoxines en milieu du travail. Thèse de doctorat de l'université de Rene Descartes, pp 16-19.

**Provencher S., Reynand C. et Benoeta C., 2006.** Les nouveaux marqueurs cardiaques : intérêt en cardiologie en anesthésie-reamination., *J. bio. Med.*, 47 : 345-457.

**Qiu-Gang M., Cheng J., Zhang J., Zhao L-H., Zhang Y. et Jie J-Y., 2011.** Dietary lipoic acid influences antioxidant capability and oxidative status of broilers, *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 8476-8488.

**Quazalo J. et Hansen W., 2010.** Biotransformation of aflatoxin B1 and its relationship with the differential toxicological response to aflatoxin in commercial poultry species. *Bioch. mol. bio.*, 576: 4-20.

**Raj Narayana K., Spiral Reddy M., Chaluvadi M.R., 2001.** Bioflavonoïds classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential, *Ind. J. Pharm.* 33: 2-16.

**Ramé A. et Théron S., 2007.** Anatomie et physiologie. Elsevier Massan, Issy-les moulineaux cedex, 1<sup>ère</sup> édition, pp 158-167.

**Rawal S. et Wimeun J., 2010.** Aflatoxin B1 in poultry : toxicology, metabolism and prevention, *research Vet. Sc.*, 89: 325-331.

**Renuka B. Rajurkar, Z.H. Govind, T.G. 2003.** Studies on levels of glutathione S-transferase, its isolation and purification from *Helicoverpa armigera*. *Current Sc.*, 85: 1355-1360.

**Reynier C., 2011.** Faibles perturbations des transaminases en médecine générale : Analyse des pratiques et étude prospective descriptive des principales étiologies dans la région annécienne de mars à octobre 2010. Thèse de doctorat de l'université de Joseph Fourier, pp 10-14.

**Rodrigo R., Miranda A. et Vergara L., 2010.** Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease, *Clin. Chim. Acta.*, 412: 410-424.

**Ronald ST-Luis M., 2011.** Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle centrale de l'osmorégulation. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI Pierre et Marie Curie, pp 35-49.

**Rong T., 2010.** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, *nut.*, 2: 1231-1246.

**Rossboy D. et Chairman V., 1995.** Anatomie humaine. Pradel, pp 152-153.

**Ruiying W., Tianzhu Z., Ganglin Y., Junqiu L., Jiacong S. et Guimin L., 2004.** Expression of selenocysteine-containing glutathione S-transferase in *Escherichia coli*. *Bioch. Bioph. Reserch*, 321: 94-101.

**Salatino A., Teixeira E.W., Negri G. et Message D., 2005.** Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis, *eCAM*, 2 : 33-38.

**Sandhar H., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M. et Sharma P., 2011.** Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids, *int. pharm. Sc.*, 698 : 45-53.

**Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier, p 2-10.

- Sato Y., Kita T., Takatsu T. et Kimura T., 2004.** Biochemical markers of myocyte injury in heart failure. *Heart*, 90: 1110-1113.
- Scalbert A., Morand C., Manach C. et Rémésy C., 2002.** Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Bio.med. Pharm.* 56: 276-282.
- Schimmel K., Richel D., Brink R.V. et Guchelaar H-G., 2004.** Cardiotoxicity of cytotoxic drugs, *Cancer Treat.*, 30: 181-191.
- Servis S., 2004.** Altération mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effet de l'âge et d'une supplémentation en OMEGA-3. Thèse de doctorat de l'université de Claude Bernard-Lyon 1, pp 19-35.
- Shoei-Lung Li S., 1998.** Structure, regulation and evolution of vertebrate lactate deshydrogenase genes, *Zoo. Stud.*, 37: 1-6.
- Simon-finstone M. et Spivak M., 2010.** Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees, *Apid.*, 41: 295-311.
- Singh PP., Mahadi F., Roy A. et Sharma P., 2009.** Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidant in ethiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Ind. J. of Clin. Bioch.*, 24: 324-342.
- Soares A., 2005.** Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes : adiponectine et prostaglandines. Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Lyon, pp 35-47.
- Spooner R., Yilmaz O., 2011.** The role of reactive oxygen species in microbial persistence and inflammation. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 334-352.
- Stephen J.H. et Mark S., 2008.** The value of cardiac biomarkers in the intensive care patient, *Arab. J. Chem.* 12: 12-215.
- Stilinović N., Aleksandar R., Jovanka K., Velibor V., Saša V. et Momir M., 2011.** The Protective Effects of Silymarin against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity in Rats, *Mol.*, 16: 8601-8613.
- Storz G. et Imlay J.A., 1999.** Oxydatif stress. *Current microbio.*, 2 :188-194.
- Su-Hsiang F., Yang M. et Chrni C., 2005.** Analysis of Flavonoids in Propolis by Capillary Electrophoresis, *J. Fd. D. Anal.*, 13: 43-50.
- Tapas A.R., Sakarkar D.M. et Kakde R.B., 2008.** Flavonoids as Nutraceuticals, *Trop. J. Pharm. Research*, 7: 1089-1099.
- Touati S., 2010.** Obésité, risque et effet thérapeutique direct de l'exercice physique : Etude sur la contribution des voies signalétiques AK+/eNOS et NADPH oxydase pour expliquer les mécanismes vasculo-protecteurs de l'exercice physique chez le rat rendu obèse par une alimentation enrichie en graisse. Thèse de doctorat de l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse, pp 31-36.

- Townsend D.M., Kenneth D.T. et Haim T., 2003.** The importance of glutathione in human disease, *Bio. med.Pharm.*, 57: 145-155.
- Toziovanu M., 2008.** Evaluation du risqué de contamination alimentaire en mycotoxines nephrotoxiques et cancérrogènes : validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, p 43.
- Unglaub D., William C., Clair W., Andreev C. et Bruce R., 2007.** Physiologie humaine. Pearson Education France, p 441.
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Mark T.D., Mazura M., Telserd J., 2007.** Free radicals and antioxydants in normal physiological fonctions and humaine and humain desease, *Int. J. Bio.Cell Biol.*, 39: 44-84.
- Vassaya S., Palma A.M. et Marcocci M.C., 2002.** Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositionsagainst species of *Candida*, *Let. Appl. Micro.*, 35: 203-207.
- Vassaya S. et al., 1999.** Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apid.*, 31: 3-15.
- Veach J., 2004.** Functional dichotomy: glutathione and vitamin E in homeostasis relevant to primary open-angle glaucoma, *British J. Nut.*, 91: 809-829.
- Verma R. J., 2004.** Aflatoxin cause DNA damage, *Int.J.Hum.Genet.*, 4: 231-236.
- Viljanen K., 2005.** Protein oxidation and protein-lipid interactions in different food models in the presence of berry phenolics. *Food Chemistry*, pp 11-38.
- Wallimann T., Wyss M., Brdiczkad., Nicolay K. et Eppenberger M., 1992.** Intracelluler compartumatation, structure and function of creatine kinase with high and fluctuating energy demands : the phosphocreatine circuit for cellular energy homeostasis. *Bioch.*, 81: 21-40.
- Waltanapitayakal S.K. et Bouer A.J., 2001.** Oxidative pathways in cardiovascular diseasz roles, mechanism and therapeutique implications. *Pharm. therapo.*, 89:187-206.
- Wendy K. et Richard G., 2001.** Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Bioch. J.*, 357: 593-615.
- William J. et Stephen K., 2005.** *Biochimie medical*. Elsevier ,1<sup>ere</sup> Edition, p 259.
- Williamson G. et Manach C.,2005.** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans, *int. Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 243-55.
- Wisemen H. et Halliwell B., 1996.** Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role ininflammatory disease and progression to cancer, *Biochem. J.*, 313: 17-29.

**Shen T. et Lou H., 2007.** Dietary Polyphenols and Their Biological Significance, *Int. J. Mol. Sci.*, 8: 950-988.

**Yunus A.W., Razzazi E. et Bohui J., 2011.** Aflatoxin B1 in affecting brailer's performance, immunity, and gastrointinal tract, *hist. cont. J. Toxins.*, 3: 566-590.

**Zarrouki B., 2007.** Tissu adipeux et inflammation : effet du stress oxydant sur le métabolisme des prostaglandines dans les adipocytes 3T3-L1. Thèse de doctorat de l'institut national des sciences appliquées de Lyon, pp 36-42.

**Zine Dine A., 2004.** Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de doctorat de l'université de Sidi Mohammed Ben Abdelah, 21-27.

## Annexe 1

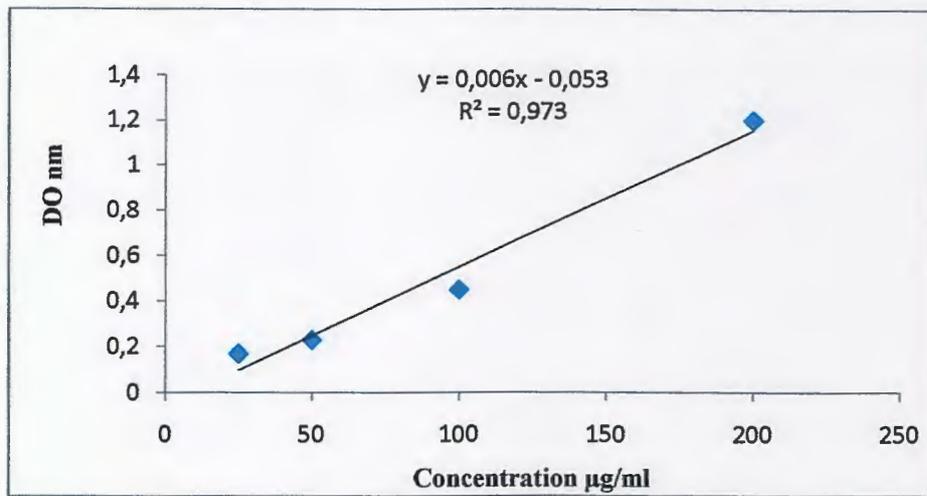


Figure 1 : La courbe d'étalonnage de la quercétine

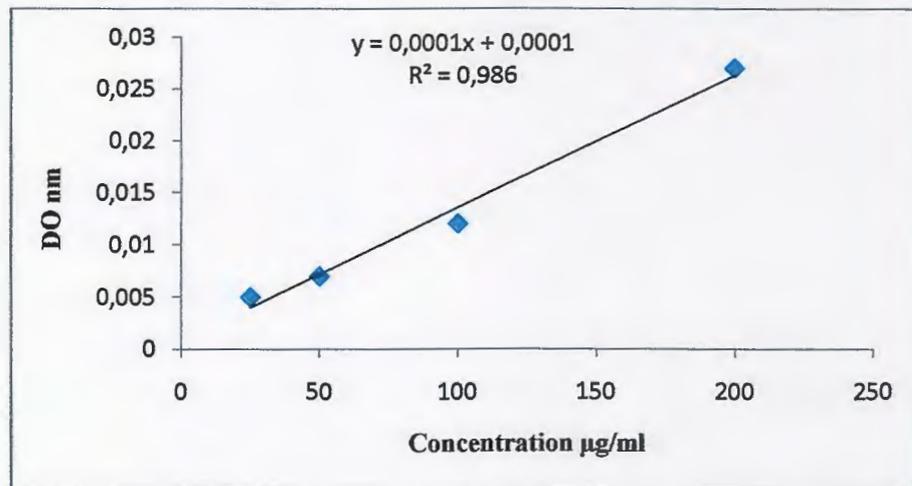


Figure2: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique

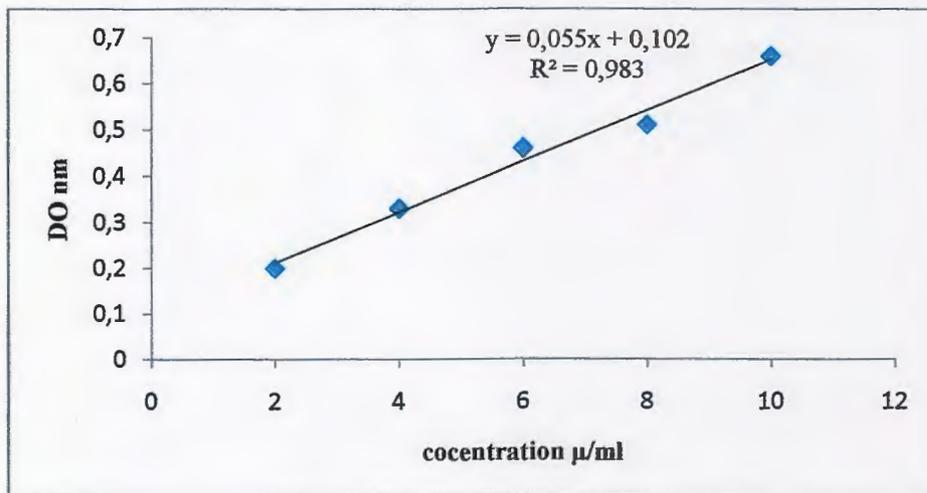


Figure 3: Courbe d'étalonnage de la GSH.

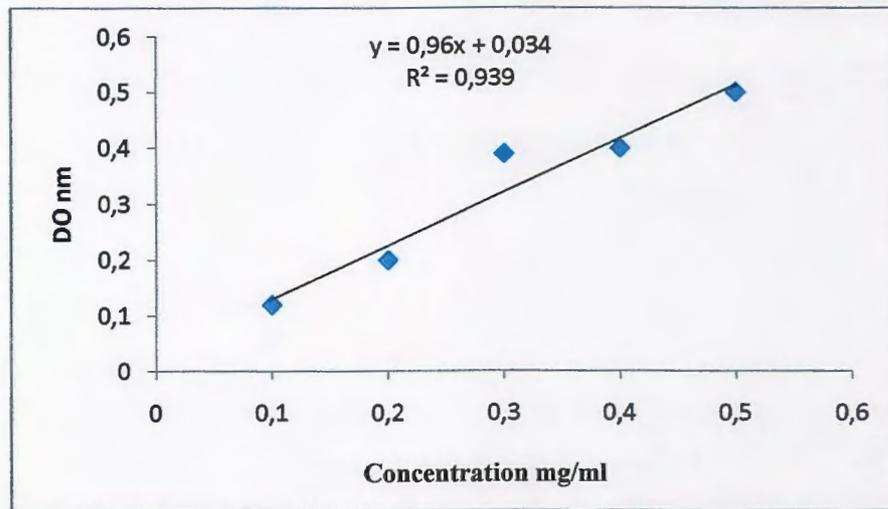


Figure 5 : Courbe d'étalonnage de BSA

## Résumé

L'aflatoxine B1 (AFB1) est un potentiel agent hépatotoxique et hépatocarcinogène. Les espèces réactives de l'oxygène et les dommages peroxydatives causés par l'aflatoxine sont considérés comme les principaux mécanismes conduisant à l'hépatotoxicité. Le but de cette étude est d'étudier son effet cardiotoxique et la capacité d'antioxydants naturelles, polyphénols, de la propolis pour protéger cette toxicité. En effet, les activités de l'aspartate aminotransférase (AST), la lactate déshydrogénase (LDH) et de la créatine phospho-kinase (CPK) ont été significativement augmentées dans le sérum des rats traité par l'AFB1 (1mg/kg du poids corporel pendant 7 jours), le niveaux de la peroxydation lipidique (MDA) a été significativement augmenté. En outre, les activités des antioxydants cardiaque enzymatique et non enzymatique telles que la superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), la glutathion-S-transférase (GST), et le glutathion (GSH) ont été significativement réduits et des protéines totales dans le sérum a été diminué. D'autre part, le prétraitement par 100 mg / kg de polyphénols de propolis pendant 10 jours a amélioré les changements induits par l'aflatoxine, ce qui explique l'effet préventif de la propolis. Nos résultats suggèrent que l'AFB1 a un effet cardiotoxique et les polyphénols de la propolis est un potentiel protecteur contre la cardiotoxicité induite par l'AFB1.

**Les mots clés :** Aflatoxine B1, radicaux libres , cardiotoxicité, propolis, polyphénols, antioxydants.

## Abstract

L'aflatoxine B1( AFB1) is a potent hepatotoxic and hepatocarcinogenic agent. Reactive oxygen species and consequent peroxidative damage caused by aflatoxin are considered to be the main mechanisms leading to hepatotoxicity. The purpose of this study was to investigate his cardiotoxic effect and the ability of natural antioxidant, polyphenols of propolis to protect this toxicity. Indeed , the activities of aspartate aminotransferases (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phospho-kinase (CPK) were found to be significantly increased in the serum of AFB1 treated (1mg/kg body weight for 7 days) rats and the level of lipid peroxide (MDA) was significantly increased. In addition, the activities of cardiac enzymatic and no enzymatic antioxidants such a superoxide dismutase (SOD) , catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GST), and glutathione (GSH) were significantly decreased and total protein in serum was decreased. On the other hand, the pretreatment by 100 mg/kg of propolis polyphenols has been found to Treatment with propolis polyphenols 10 days before ameliorated aflatoxin-induced changes what explains the preventive effect of propolis. Our results suggest that AFB1 have a cardiotoxic effect and propolis polyphenols is a potentially protective against AFB1-induced cardiotoxicity.

**Key words :** Aflatoxine B1, free radicals, cardiotoxicity. Propolis, polyphenols, antioxydants.

## ملخص

الأفلاتوكسين B1 هو عامل قوي مسبب لسموم الكبد و سرطان الكبد. الجذور الحرة و الأضرار الناجمة عن البيروكسيدات الناتجة عن الأفلاتوكسين تعتبر من أهم الآليات التي تؤدي إلى تسمم الكبد. الغرض من هذه الدراسة هو دراسة سميته على القلب و قدرة مضادات الأكسدة الطبيعية. بوليفينول الدنج على حماية هذه السمية, في الواقع هناك زيادة كبيرة في أنشطة الألائين الامبرتاتي (AST), اللاكتات ديهيدروجيناز (LDH) , و الكرياتين فوسفوكيناز (CPK) في مصل دم الفاران المعالجة ب AFB1 1ملغ/كغ من وزن الجسم لمدة 10 أيام, و حدثت زيادة كبيرة في مستويات بيروكسيد الدهون (MDA). بالإضافة إلى ذلك, أنشطة مضادات الأكسدة القلبية الانزيمية و الغير انزيمية مثل الديسموتاز (SOD) الكاتالاز (CAT) الجلوتاثيون-s- ترانسفيراز (GST) و الجلوتاثيون (GSH) و البروتينات الكلية في مصل الدم انخفضت بشكل ملحوظ. من جهة أخرى المعالجة ب 100 ملغ/كغ من بوليفينول الدنج لمدة 10 أيام قامت بتحسين التغيرات الناجمة عن الأفلاتوكسين و هو ما يفسر التأثير الوقائي للدنج. نتائجنا تشير إلى ان AFB1 له تأثير سام على القلب و بوليفينول الدنج هو وافي قوي ضد السمية الناتجة عن AFB1 .

**كلمات مفتاحية :** الأفلاتوكسين ب1, الجذور الحرة, سمية القلب, دنج, بوليفينول, مضادات الأكسدة