

جامعة محمد السادس بن باديش
كلية العلوم الطبيعية والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 1894

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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

Université de Jijel

Faculté de Sciences Exactes et Sciences
de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire De Fin d'étude Pour l'obtention Du Diplôme
Master en Biologie

Option : Pharmacologie Expérimentale

Intitulé

Evaluation de l'Effet Hépatoprotecteur de l'extract brut de la propolis Contre la Toxicité de l'Aflatoxine B1 chez les Rats

Membres de jury :

Président : Dr. RECHRECHE Hocine

Examineur : Dr. ALYANE Mohamed

Encadreur : M^{me} KEBSA wided



Présenté par :

KECIRA Meriem

ZITOUNI Madiha

BEKKOUCHE Asma

Année Universitaire 2011/2012

Remerciements

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères à Dieu qui nous a apporté Son aide et qui a contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de l'année universitaire.

Nous tenons à remercier sincèrement Madame KEBBA Widad, en tant qu'encadreur du mémoire, s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire N'aurait jamais vu le jour.

Nous remercions Dr. RECHRECHE Hocine, ainsi que Dr. ALYANE Mohamed qui ont accepté de participer au jury de mémoire, et qui ont sacrifié leur temps pour évaluer le contenu de ce mémoire.

Nous remercions également Dr. HAMEL directeur du 'laboratoire d'anatomo-phatologie' pour la réalisation et la lecture des coupes histologiques, ainsi que les membres du 'laboratoire des analyses Bakıwa' pour leur aide.

Nous adressons également nos remerciements au Dr. MAIZA directeur de laboratoire central de l'hôpital Mohamed Sadik Ben Yahia, pour leur collaboration dans la réalisation des dosages sériques.

Nos remerciements s'adressent également à M. AKDIM Abd Elghani, doctorant chercheur à l'université de Bejaia 'laboratoire de biochimie, biophysique, biomathématique et de scientométrie' pour sa générosité malgré ses charges académiques et professionnelles.

Nous adressons également nos remerciements, à tous nos enseignants, qui nous ont donné le savoir tout au long du cursus universitaire.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance envers nos parents pour leur contribution, leur soutien et leur patience.

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous nos proches et amis, pour leur soutien et leur encouragement au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes pour la confiance que vous nous avez accordées.

Merci

Sommaire

Sommaire

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux	iii
Liste des abréviations	v
Introduction.....	1
Synthèse bibliographique	
Chapitre I : Aflatoxine B1.....	4
1. Généralités sur les mycotoxines	4
2. Aflatoxine B1	4
2.1. Origine et répartition	4
2.2. Structure et propriétés physico-chimiques	5
2.3. Réglementation	5
2.4. Biosynthèse de l'AFB1	6
2.5. Toxicocinétique de l'AFB1 dans l'organisme.....	6
2.5.1. Exposition par voie orale.....	6
2.5.2. Exposition par voie respiratoire	7
2.6. Effets de l'AFB1 sur la santé	8
2.6.1. Immunotoxicité.....	8
2.6.2. Hématotoxicité.....	8
2.6.3. Effets sur la reproduction.....	8
2.6.4. Effets tératogènes.....	8
2.6.5. Effets sur le système rénal	9
2.6.6. Effets sur le système respiratoire	9
2.6.7. Effets sur le système nerveux	9
2.6.8. Cardiotoxicité	9
2.6.9. Effet sur la peau	10
2.6.10. Effets sur le foie.....	10
Chapitre II: L'hépatotoxicité de l'AFB1	11
1. Le foie.....	11
1.1. Anatomie.....	11
1.2. Fonctions du foie	11
1.3. Pathologies	12
2. Mécanisme de l'hépatotoxicité de l'AFB1	12
2.1. Mécanisme de géno- et cancérogénicité	12
2.1.1. Par action sur l'ADN	12
2.1.2. Par action sur les protéines	13
2.1.3. Par action sur l'ARN	14
2.1.4. Par action sur le métabolisme	14
2.2. Mécanisme moléculaire de l'interaction AFB1- virus de l'hépatite B (VHB) et C (VHC).....	14
3. Marqueurs d'évaluation de l'hépatotoxicité de l'AFB1	15
3.1. Les métabolites de l'AFB1	15
3.2. Les transaminases (TGP/TGO).....	15
3.3. La phosphatase alcaline (PAL).....	15
3.4. La gamma glutamyl transférase.....	15
3.5. La lactate déshydrogénase (LDH)	15
3.6. Bilirubine	16

Chapitre III : Les acteurs du stress oxydant cellulaire 17

1. Définition du stress oxydant	17
2. Principales espèces réactives oxygénées	17
3. Potentialités toxiques des espèces radicalaires	18
3.1. Les lipides.....	19
3.2. Les protéines.....	19
3.3. L'ADN.....	19
3.4. Les glucides	19
4. Mécanismes cellulaires de défense contre les ROS.....	19
4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	19
4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	20

Chapitre IV. La propolis comme source de polyphénols 21

1. La propolis.....	21
1.1. Historique et définition	21
1.2. Origine	21
1.3. Composition chimique	21
1.4. Propriétés physicochimiques	21
1.5. Propriétés pharmacologiques et biologiques.....	22
1.5.1. Propriétés antioxydantes.....	22
1.5.2. Propriétés anticancéreuses.....	23
1.5.3. Propriétés anti-inflammatoire	23
1.5.4. Autres propriétés.....	23
2. Les polyphénols.....	24
2.1. Définition	24
2.2. Biosynthèse des composés phénoliques	24
2.2.1. La voie de l'acide shikimique.....	24
2.2.2. La voie d'acétate malonate.....	24
2.3. Classification	25
2.3.1. Les acides phénoliques	26
2.3.2. Les flavonoïdes	27
2.3.3. Les tanins	27
2.4. Biodisponibilité des polyphénols.....	27

Matériels et méthodes..... 29

1. Etude phytochimique de la propolis..... 29

1.1. Récolte de la propolis	29
1.2. Préparation des extraits éthanoliques de la propolis.....	29
1.3. Dosage des polyphénols totaux (TP)	29
1.4. Dosage des flavonoïdes totaux (TF)	29
1.5. Analyse par GC\ MS (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) des extraits éthanoliques	30
1.6. Etude des propriétés anti-radicalaires par le test au DPPH° (2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl).....	30

2. Etude in vivo..... 31

2.1. Entretien des animaux	31
2.2. Traitement des animaux	31
2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du foie	32
2.4. Le prélèvement du sang	32
2.5. paramètres sériques	32
2.5.1. La phosphatase alcaline (PAL).....	32

2.5.2. Les protéines totales	32
2.5.3. Les transaminases (TGO/TGP)	32
2.5.4. La bilirubine.....	33
2.5.5. La lactate déshydrogénase (LDH)	33
2.5.6. Détection de l'AFB1 et de ses métabolites par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) liée à un détecteur UV	33
2.6. Dosage tissulaire	33
2.6.1. Dosage du glutathion hépatique GSH.....	33
2.6.2. Dosage du MDA cytosolique.....	34
2.6.3. Evalutaion de l'activité enzymatique de la SOD	34
2.6.3.1. Préparation de la fraction cytosolique	34
2.6.3.2. Détermination l'activité enzymatique de la superoxydedismutase(SOD).....	34
2.6.3.3. Mesure de l'activité enzymatioque de la catalase (CAT)	35
2.6.3.4. Evaluation de l'activité de la glutathion-S transférase (GST) cytosolique.....	35
2.7. Etude histologique	36
2.8. Traitement des résultats	36

III- Résultats et discussion 38

1. Etude phytochimique.....	38
2. Etude in vivo.....	43
2.1. Paramètres sériques	43
2.2. Détection de l'AFB1 dans le sérum et les urines.....	50
2.3. Dosage tissulaire	52
2.4. Etude histologique	57
Conclusion	62
Références.....	65

Annexe

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structure chimique d'AFB1.....	05
Figure 2.	La métabolisation d'AFB1 avec formation des métabolites réactifs et des biomarqueurs	07
Figure 3.	piégeage des ROS (\dot{R}) par les flavonoïdes	22
Figure 4.	Les voies de biosynthèse des composés phénoliques	25
Figure 5.	Les différentes classes des composés phénoliques	26
Figure 6.	Les structures chimiques des acides phénoliques	26
Figure 7.	Réduction du DPPH° par un antioxydant.....	30
Figure 8.	Principe de dosage de glutathion.....	33
Figure 9.	Teneur en polyphénols dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent acide gallique/g de propolis (mg EAG /g).....	38
Figure 10.	Teneur en polyphénols dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent acide gallique/g de propolis (mg EAG /g)	40
Figure 11.	GC-MS de l'extrait éthanolique de la propolis d'Oudjana	40
Figure 12.	GC-MS de l'extrait éthanolique de la propolis de Kaous.....	41
Figure 13.	GC-MS de l'extrait éthanolique de la propolis de Milia.....	41
Figure 14.	Evaluation de l'activité anti-radicalaire des différents extraits éthanoliques de la propolis à différentes concentrations vis-à-vis le radical libre DPPH°.	43
Figure 15.	Variations des taux de TGO dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	44
Figure 16.	Variations des taux de TGP dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	45
Figure 17.	Variations des taux du PAL dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg)	46
Figure 18.	Variations des taux du LDH dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	47
Figure 19.	Variations de la concentration des protéines sériques des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	48
Figure 20.	Variations des taux de la bilirubine dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	49

Figure 21.	Détection de l'AFB1 dans le sérum des rats.....	51
Figure 22.	Détection de l'AFB1 dans les urines des rats	51
Figure 23.	Variations des taux de GSH cytosolique hépatique après administration IP d'AFB1 (1mg/kg) seule, en association avec l'EEP (100mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr).....	52
Figure 24.	Variations des taux du MDA cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	53
Figure 25.	L'évaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	54
Figure 26.	Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	55
Figure 27.	Variations de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	56
Figure 28.	Coupes histologiques de foie des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou la quercétine (10x10).....	58
Figure 29.	Coupes histologiques montrant les différents changements au niveau du foie des rats traités par l'AFB1.....	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Quantité maximale autorisée dans les denrées alimentaires destinées à l'homme en Europe (1881/2006/CE) (AFSSA, 2009)	05
Tableau 2.	Rendement d'extraction des extraits éthanoliques de la propolis des quatre régions.....	38
Tableau 3.	Teneur en polyphénols dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent acide gallique/g de propolis (mg EAG /g).....	38
Tableau 4.	Teneur en flavonoïdes dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent Quercétine/g de propolis (mg EQ /g).....	39
Tableau 5.	Evaluation de l'activité anti-radicalaire des différents extraits éthanoliques de la propolis à différentes concentrations vis-à-vis le radical libre DPPH°.....	42
Tableau 6.	Variations des taux de TGO en UI/l dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	44
Tableau 7.	Variations des taux de TGP dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	45
Tableau 8.	Variations des taux du PAL dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	46
Tableau 9.	Variations des taux du LDH dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	46
Tableau 10.	Variations de la concentration des protéines sériques des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	47
Tableau 11.	Variations des taux de la bilirubine dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	48
Tableau 12.	Variations des taux de GSH cytosolique hépatique après administration IP d'AFB1 (1mg/kg), administration orale de l'EEP (100mg/kg/jr), et la quercétine (10 mg/kg/jr).....	52
Tableau 13.	Variations des taux du MDA cytosolique généré suite à la peroxydation lipidique induite par l'AFB1 seule, en association avec l'EEP, et la quercétine.....	53
Tableau 14.	L'évaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	54
Tableau 15.	Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	55

Tableau 16.	Variations de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).....	56
--------------------	---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide desoxyribonucléique
AFB1	Aflatoxine B1
AFB1-FAPY	AFB1-formamidopyrimidine
AFB1-N7-Gua	AFB1-N7-Guanine
AFB2	Aflatoxine B2
AFG1	Aflatoxine G1
AFG2	Aflatoxine G2
AFM1	Aflatoxine M1
AFM2	Aflatoxine M2
AFOL	Aflatoxicol
AFP1	Aflatoxine P1
AFQ1	Aflatoxine Q1
AF _s	Aflatoxines
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AG	Acide gras
ALAT/TGP	Alanine Amino Transférase.
ALP	Akaline phosphatase
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AP	Apurinique/Apyrimidique
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN transferase
ASAT/TGO	Aspartate Amino Transférase
ATP	Adénosine triphosphate
CAT	Catalase
CHC	Hépatocellular carcinoma
CHC	Le carcinome hépatocellulaire
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
CYP1A2 et CYP3A4	Cytochrome1A2 et 3A4
CYP450	Cytochrome P450
DL50	Dose létale 50
DO	Densité optique
DPPH	1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EFSA	European food safety authority
GC\MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GSH	Gluthation

GST	Gluthation <i>S</i> -transferase
H ₂ O ₂	Peroxyde D'hydrogène.
HCl	Acide chlorhydrique
IARC	Centre international de recherche contre le cancer (= CIRC)
IP	Intrapéritonéale.
LDH	Lactate dehydrogénase
MDA	Malondialdehyde
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate forme réduite
NO	Monoxyde d'azote
O ₂ [·]	Anion superoxyde
OH [·]	Radical hydroxyle
ONOO ⁻	Peroxynitrite.
OTA	Ochratoxine A
PAL	La phosphatase Alcaline.
ROS	Reactive oxygen species.
SNC	Système nerveux central
SOD	Superoxyde dismutase
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale- Alpha
UI	Unité International
δ GT	Glutamyl transpeptidase

Introduction

Avec l'évolution de la société, le consommateur est devenu plus soucieux de sa sécurité alimentaire, et il demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques des contaminations. Tandis que les professionnels de l'agro-industrie prennent des mesures de plus en plus strictes pour garantir l'innocuité des aliments, les pouvoirs publics mettent également en place des normes de plus en plus sévères pour prévenir au mieux les risques sanitaires.

L'aflatoxine B1 (AFB1), mycotoxine extrêmement hépatotoxique produite principalement par la moisissure d'*aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* est un contaminant majeur de certains produits alimentaires, incluant les céréales, les oléagineux et produits dérivés, les épices et les fruits secs et séchés (Dragacci *et al.*, 2011). On peut trouver l'AFB1 dans les poussières atmosphériques, dans les produits et aliments d'origine animale, dont le lait, le sang, et les abats peuvent contenir des traces d'elle ou de ses métabolites contenues dans les aliments ingérés par les animaux d'élevage. Dans d'autres substrats, matériaux comme bois, papier peint, tissus, peintures, colles, adhésifs et plâtre (Brochard, 2005).

L'aflatoxine B1 telle qu'elle est retrouvée dans la nourriture n'est pas un composé susceptible d'induire des effets toxiques ou cancérogènes. Le mécanisme de cancérogénicité d'AFB1 a été largement étudié, c'est l'activation de cette molécule au niveau du foie par les cytochromes P450 qui la transforme en un composé très réactif, l'exo-8,9-époxyde, qui interagit avec les sites nucléophiles des acides nucléiques en formant l'adduit AFB1-N⁷-Guanine, cette action constitue une étape cruciale dans l'initiation de l'hépatocarcinogénèse (Yunus *et al.*, 2011). Bien que le mécanisme exacte de l'hépatotoxicité des aflatoxines n'est pas entièrement compris, plusieurs rapports suggèrent que la toxicité peut s'expliquer par la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde (O²⁻), le radical hydroxyle (OH[•]), et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) au cours du métabolisme hépatique de l'AFB1. Ces espèces peuvent attaquer les composés cellulaires tels les membranes, conduisant finalement à l'altération du fonctionnement cellulaire et à la cytolysse. Ces dommages oxydatifs sont rencontrés par des mécanismes de défense cellulaires incluent les antioxydants enzymatique et non enzymatique (Sohn *et al.*, 2003. ; Towner *et al.*, 2003).

À cet égard, les recherches réalisées dans ce domaine ont permis d'élucider les effets toxiques d'AFB1 sur le foie, le cœur, le système respiratoire, le système immunitaire, le système rénal, le système nerveux,....etc. Dans le but de prévenir tous ces effets délétères et d'améliorer la santé, la communauté scientifique et le grand public repose sur l'utilisation des produits naturels riches en molécules actives tel la propolis; substance résineuse gommeuse et balsamique, de consistance visqueuse, fabriquée par les abeilles à partir de leurs sécrétions et d'une série de substances résineuses provenant des plantes (Kusumoto *et al.*, 2001).

La composition chimique et donc les activités de la propolis dépendent essentiellement de l'origine géographique, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, et la durée de conservation. La propolis a été utilisée depuis longtemps dans la médecine traditionnelle et revient sur le devant de la scène comme une excellente alternative aux médicaments grâce à ces propriétés biologiques résultant de sa richesse en composés phénoliques, notamment les flavonoïdes (flavones, flavonols et flavanones), et les acides phénoliques. Ces composés phénoliques possèdent certaines activités

biologiques y compris les effets antioxydants, des activités anticancéreuses, anticarcinogéniques et antimutagéniques (Bruneton, 1999).

Dans ce contexte, nous avons fixé les objectifs suivants:

- Etude phytochimique de 4 échantillons de propolis et évaluation de l'effet de l'origine géographique sur sa composition chimique et son activité anti-radicalaire.
- Evaluation de la toxicité hépatique d'une dose unique intrapéritonéale (1mg/kg) de l'AFB1.
- Evaluation d'éventuels effets hépatoprotecteurs de la propolis administrée par voie orale à la dose de 100 mg/kg contre la toxicité de l'AFB1 en comparaison avec la quercétine à la dose de 10mg/kg

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1. Aflatoxine B1

1. Généralités sur les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, produites par des champignons microscopiques de genre *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, et *Alternaria*, d'autres genres sont aussi impliqués comme *Claviceps*, *Diplodia*, et *Arthrinium* (Hussein et Brasel, 2001). Elles se retrouvent dans une large variété de produits agricoles notamment les céréales, les fruits à coque, les fruits séchés, les épices (Jard, 2009). Pendant la culture, la croissance des moisissures, la sécrétion, le type de mycotoxines et la quantité sécrétée sont influencés par des facteurs qui incluent la composition du substrat, l'oxygène, l'humidité, la température, le pH, et la compétition avec les autres microorganismes (Brochard, 2005). Après la récolte, des conditions défectueuses à savoir les conditions de stockage, de transformation et/ou de transport des produits alimentaires pourraient augmenter de façon dramatique les teneurs en aflatoxines dans les aliments (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

Actuellement, plus de 300 de ces toxines sont identifiées à l'échelle internationale, et une vingtaine d'entre elles sont considérées comme présentant un risque pour le consommateur. Selon leur origine biologique, les mycotoxines sont classées en polyacétoacides, terpènes cyclopeptides et métabolites azotés. Elles sont aussi classées selon leurs principaux effets toxiques en mycotoxines mutagènes (AFs, patuline...), mycotoxines cancérogènes (ochratoxines...), et mycotoxines tératogènes (trichothécènes, l'ochratoxine A) (Jard, 2009).

Le groupe des aflatoxines est le plus connu, le mieux étudié et le plus réglementé, elles sont produites par des souches d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius* (Gourama et Bullerman, 1995). Dont les plus importantes sont l'AFB1, l'AFB2, l'AFG1, l'AFG2, l'AFM1, et l'AFM2. Selon le centre international de la recherche contre le cancer (CIRC), les aflatoxines sont classées dans le premier groupe ; comme agents cancérogènes. Elles sont hépatocarcinogènes, mutagènes, et tératogènes (Wild et Turner, 2002).

2. Aflatoxine B1

2.1. Origine et répartition

L'AFB1 est une substance extrêmement toxique produite principalement par la moisissure d'*aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* (Talayakul *et al.*, 2005). C'est un contaminant majeur de certains produits alimentaires humaines et animales, incluant les céréales (blé, orge, maïs, riz, seigle...), les oléagineux (les arachides notamment) et produits dérivés (pâtes, farines, pains, biscuits), les épices (paprika, chili, poivre), les fruits secs et séchés (figues, dates, raisins) (Coppock et Christian, 2007 ; Dragacci *et al.*, 2011). On peut également rencontrer l'AFM1 dans le lait, elle provient de la biotransformation de l'AFB1 par les ruminants (Dragacci *et al.*, 2011).

On peut trouver l'AFB1 dans les poussières atmosphériques fixées au niveau des spores fongiques, dans les produits et aliments d'origine animale, dont le lait, le sang, et les abats peuvent contenir des traces d'elle ou de ses métabolites contenues dans les aliments ingérés par les animaux d'élevage. Dans d'autres substrats, matériaux comme bois, papier peint, tissus, peintures, colles, adhésifs, plâtre (Brochard, 2005).

2.2. Structure et propriétés physico-chimiques

L'AFB1 est une molécule organique complexe de nature non protéique, sa structure de base est constituée de cycle bifurane coumarine/ cyclopentanone (Figure 1), caractérisée par la présence d'une double liaison entre le carbone C8 et C9 du premier anneau furane (Schmidt et Esser, 1985). Elle est de formule brute $C_{17}H_{12}O_6$ et de faible poids moléculaire (312.3 g/mol) (Dragacci *et al.*, 2011).

C'est une substance thermorésistante, stable même à des températures de 250° C pendant 30 min, légèrement soluble dans l'eau, et les hydrocarbures, insoluble dans les solvants non polaires, très soluble dans les solvants organiques moyennement polaires (chloroforme, méthanol, acétone...). Sous la lumière Ultra-Violette, elle est fluorescente et prene une couleur bleue (IARC, 1993).

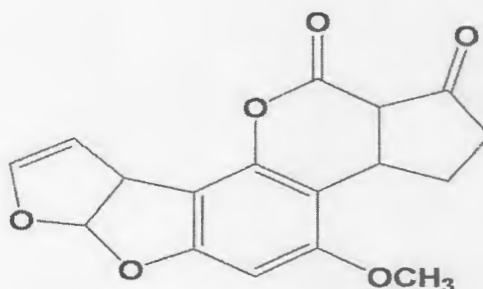


Figure 1. Structure chimique de l'AFB1 (Calleri *et al.*, 2007)

2.3. Réglementations

Les premiers règlements visant à limiter la présence de mycotoxines dans les denrées alimentaires ont été élaborés en 1960, après la découverte d'AFB1. Actuellement, environ 100 pays ont des réglementations concernant ces toxines (Van Egmond *et al.*, 2007). Le tableau 1 montre les quantités maximales autorisées dans les denrées alimentaires destinées à l'homme en Europe.

Tableau 1. Quantité maximale autorisée dans les denrées alimentaires destinées à l'homme en Europe (1881/2006/CE) (AFSSA, 2009).

Aflatoxines	Matrice	Teneur maximale en $\mu\text{g/kg}$
AFB1	Arachides, autres grènes, fruits secs	De 2, 5 ou 8 selon le produit et son stade de transformation
	Céréales	2 ou 5 selon le produit et son stade de transformation
	Certaines épices	5
	Préparations à base de céréales pour enfants en bas âge	0.1
AFM1	Lait	0.05
	Préparations pour enfants en bas âge	0.025

Actuellement en Algérie, il n'y a pas de normes ou de limites réglementaires fixant les teneurs maximales des aflatoxines dans l'alimentation humaine et animale.

2.4. Biosynthèse de l'AFB1

Depuis la découverte de la structure d'AFB1, les chercheurs ont tenté de déchiffrer les voies de biosynthèse de cette toxine. La production d'AFB1 se fait au cours de l'idiophase, dont il n'y a pas moins de 23 étapes enzymatiques dans la voie de biosynthèse, où elle commence avec des unités d'acétate et de malonate qui sont métabolisées en AFB1 via des polycétones, avec pour intermédiaires principaux: l'acide norsolorine, l'avérufine, la versicolorine A et la stérigmatocystine. Les voies de synthèse d'AFB2, G1 et G2 divergent de la voie d'AFB1 (Schmidt, 1985).

2.5. Toxicocinétique de l'AFB1 dans l'organisme

2.5.1. Exposition par voie orale

Après l'administration orale, l'AFB1 est tout d'abord absorbée par diffusion passive au niveau du duodénum, cela permet son passage depuis le bol alimentaire vers le sang 30 min après leur ingestion (Dragacci *et al.*, 2011). La forme circulante d'AFB1 est majoritairement liée aux protéines plasmatiques (Dahlmann *et al.*, 1998), ce qui retarde sa filtration glomérulaire et donc son élimination rénale. Elle se distribue essentiellement dans les organes impliqués dans le métabolisme et l'épuration des xénobiotiques (foie et reins) mais peut être présente à l'état de trace dans d'autres tissus comme le cœur, les poumons, le cerveau et les muscles (Stubblefield *et al.*, 1983).

Le métabolisme hépatique d'AFB1 est réalisé principalement par l'intervention des cytochromes P450 (CYP450) (Brochard et Le bâcle, 2009). Il se déroule en deux phases une phase de biotransformation et une phase de conjugaison. Dans la première phase, il y aura l'intervention des CYP1A2 et CYP3A4, dont la voie la plus dominante de bioactivation se ferait par le CYP1A2 qui au travers des réactions d'oxydation formant par hydroxylation l'AFM1 (4-hydroxy AFB1), et par époxydation l'AFB1 8,9-époxyde (AFBO) (AFB1-8,9-exo-époxyde, et AFB1-8,9-endo-époxyde) (Eaton et Gallagher, 1994 ; Do et Choi, 2007). Le CYP3A4 dont l'action serait moins prépondérante, est impliqué dans la formation par hydroxylation de la 3 α -hydroxy-AFB1 (AFQ1), et dans une moindre mesure dans la synthèse de l'AFBO (Guengerich *et al.*, 1996).

En plus des enzymes mono-oxygénases, deux autres métabolisations enzymatiques d'AFB1 interviennent, une O-déméthylation conduit à l'AFP1 qui est ensuite détournée par une UDP-glucuronyl- transférase, et une réduction de la fonction cétone en C1 via une NADPH réductase pour former l'aflatoxicol (AFOL) (Galtier, 2003).

La phase de détoxification d'AFBO, comprend sa conjugaison au glutathion par des glutathion S-transférases (GST). L'AFBO est aussi détournée par des époxydes hydrolases conduisant à l'AFB1-dihydrodiol puis à l'AFB1- dialdéhyde ensuite transformée en AFB1-dialcool par l'AFB1-aldéhyde réductase, une conjugaison à l'acide glucuronique des métabolites hydroxylés aboutit à la formation de glucurono-conjugués (Klein *et al.*, 2000 ; Kelly *et al.*, 2002).

L'AFB1 est éliminée dans la bile sous forme conjuguée au glutathion et/ou au acide glucuronique. Elle est ainsi éliminée par voie urinaire sous forme inchangée ou sous forme métabolisée. Les adduits aflatoxine-guanine sont aussi retrouvés dans les urines et peuvent servir

de biomarqueur. L'AFM1 se trouve excrétée dans les urines et aussi dans le lait (IARC, 1993). Les voies de métabolisation d'AFB1 sont représentées dans la (figure 2).

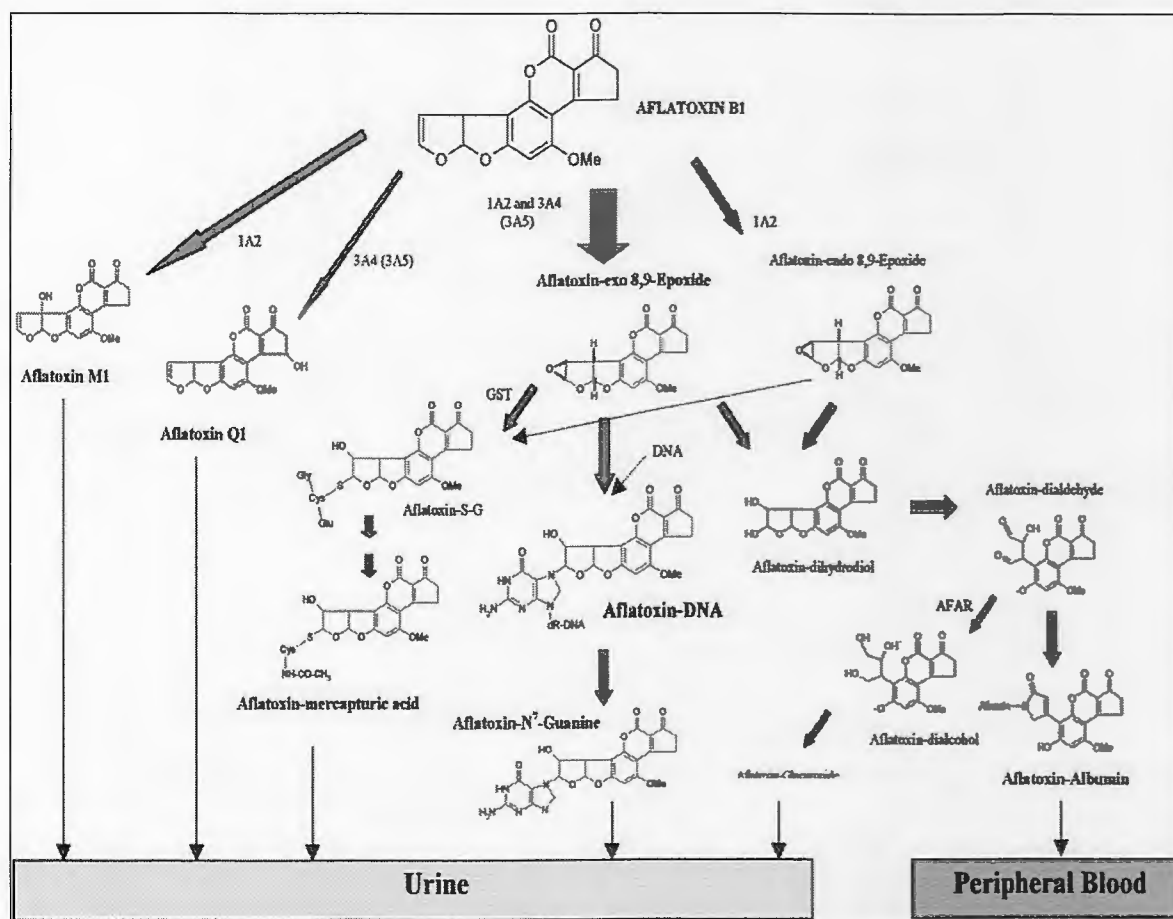


Figure 2. La métabolisation d'AFB1 avec formation des métabolites réactifs et des biomarqueurs (Wild et Turner, 2002).

2.5.2. Exposition par voie respiratoire

Après l'inhalation d'AFB1, une proportion de celle-ci sera stockée dans les poumons où elle subit une métabolisation majoritairement par la prostaglandine H-synthétase et/ou la lipoxygénase, conduisant à la formation de différents métabolites dont la forme active est l'AFBO, cette activité étant concentrée dans les macrophages alvéolaires. Le CYP2A13, prédominant au niveau du système respiratoire, est capable de métaboliser l'AFB1 en AFBO (He *et al.*, 2006). Une telle activation en combinaison avec la faible activité de conjugaison de la GST cytosolique contribue probablement à la sensibilité particulière des poumons humains à l'AFB1. Les études *in vitro* suggèrent que les CYP450 responsables de l'activation d'AFB1 dans le foie, jouent un rôle mineur dans leur activation dans le poumon chez l'homme (Massy *et al.*, 2000). La grande proportion d'AFB1 inhalée sera transportée par le sang vers le foie dont elle subit une biotransformation par les CYP450 (Biswas *et al.*, 1993).

Du fait de leurs effets toxiques, l'AFB1 et ces métabolites seront éliminées hors organisme, à partir du sang soit directement dans les urines, soit indirectement dans les selles ou les urines après leur métabolisation dans le foie. La demi-vie plasmatique de l'AFB1 est de 87.7 heures après une administration intratrachéale (Coulombre et Sharma, 1985).

2.6. Effets de l'AFB1 sur la santé

Les effets des AFs sur la santé varient suivant l'espèce, l'âge, le sexe, l'état physiologique de l'animal, le mode d'administration et la composition de l'alimentation.

2.6.1. Immunotoxicité

L'AFB1 a un effet inhibiteur sur le système immunitaire. Cet effet est dû au fait de l'interaction d'AFBO avec l'ADN et L'ARN bloquant ainsi la synthèse protéique dont la synthèse des lymphokines et du complément C4 qui a une activité hémolytique et bactériolytique. L'AFB1 inhibe la phagocytose des macrophages ce qui provoque l'arrêt des processus ultérieurs et la présentation des antigènes aux lymphocytes B, ces arrêts ont pour conséquence la diminution de la production des anticorps et donc une chute de la résistance aux maladies (Pier, 1991).

2.6.2. Hématotoxicité

L'AFB1 exerce des effets hématotoxiques, elle affecte l'hématopoïèse en induisant des aberrations chromosomiques des cellules de la moelle osseuse (Ito *et al.*, 2002). L'inhibition de l'hématopoïèse, l'hématopoïèse défectueuse transitoire, la destruction des globules rouges ou la combinaison des trois sont des mécanismes qui ont été proposés pour expliquer l'association entre l'AFB1 et l'expression d'anémie selon des études réalisées sur des animaux (Verma et Raval, 1991).

2.6.3. Effets sur la reproduction

Il existe de nombreux rapports qui décrivent les effets délétères d'AFB1 sur les systèmes de reproduction et de développement tels que la maturation sexuelle, le développement et la maturation des follicules, la gestation et le développement de fœtus (Faisal *et al.*, 2008).

De nombreuses études ont démontré la toxicité d'AFB1 sur la reproduction masculine, les organes de reproduction et sur les différents aspects de la spermatogénèse (Faridha *et al.*, 2006; Faisal *et al.*, 2008). Une dégénération des testicules, des cellules germinales et une diminution de la fertilité, et de l'efficacité des spermatozoïdes ont été mises en évidence par Egbunike *et al.* (1980) après le traitement des rats par une dose sublétales d'AFB1.

Le traitement des souris albinos par une dose de 500 µg/kg/jour d'AFB1 pendant 7, 15, 30, 45 jours, a causé une diminution de la mobilité et de la concentration des spermatozoïdes. Une augmentation des spermatozoïdes anormaux a été mise en évidence (Agnes et Akbarsha, 2003). Le traitement des souris albinos par l'AFB1 a causé des fragmentations de la chromatine des spermatozoïdes.

L'administration d'AFB1 aux rats femelles a provoqué des réductions dans le nombre d'oocytes, du nombre de follicules et du poids des cellules sexuelles (diminution de la taille de l'utérus et les ovaires) (Hafez *et al.*, 1982).

2.6.4. Effets tératogènes

L'AFB1 peut traverser la barrière placentaire, il y a donc la possibilité d'exposition du fœtus qui n'a pas de systèmes de détoxification matures. Les effets délétères observés sur le fœtus sont des anomalies du squelettique et cardiaques, et des microphtalmies notées chez la progéniture des lapins exposés oralement à l'AFB1 (Brochard et Le Bâcle, 2009).

2.6.5. Effets sur le système rénal

L'administration d'AFB1 aux souris induit des lésions hémorragiques intenses dans les reins. Une dose unique d'AFB1 stoppe l'incorporation de 50% d'acide orotique dans l'ARN et donc l'inhibition de sa synthèse (Akao *et al.*, 1971).

L'administration orale d'AFB1 chez des rats a des effets cancérogènes sur les reins (Epstein *et al.*, 1969). Une dose unique d'AFB1 (100 µg/kg) diminue significativement la filtration glomérulaire, la résorption du glucose, le transport tubulaire des électrolytes et des anions organiques (Grosman *et al.*, 1983).

L'AFB1 provoque une diminution dans le taux des enzymes nécessaires pour la protection des tissus rénaux contre les dommages oxydatifs (kanbak *et al.*, 2001). L'examen histologique des tissus rénaux des rats traités par l'AFB1 a démontré des dégénération, gonflements, et des déformations des cellules qui tapissent les tubules contournés proximal et distal (yalmaz *et al.*, 2006).

2.6.6. Effets sur le système respiratoire

L'administration intratrachéale d'AFB1 supprime la libération du facteur de nécrose tumorale- Alpha (TNF-α) des macrophages alvéolaires et affaiblit le système immunitaire naturel et acquis, respectivement par la suppression de la phagocytose des macrophages péritonéale et la réponse primaire des anticorps de la rate. Des adénomes pulmonaires ont été détectés, chez 100% des rats traités par l'AFB1 trois fois par semaine durant un mois (Wieder *et al.*, 1968).

2.6.7. Effets sur le système nerveux

Un traitement aigue des rats par l'AFB1 provoque une diminution d'acétylcholinestérase du cerveau, alors qu'un traitement chronique cause une augmentation d'acétylcholinestérase de l'adénohypophyse (Egbunike et Ikegwuonu, 1984).

L'AFB1 altère l'homéostasie des amines biogéniques du système nerveux central. Chez les rats, l'AFB1 cause une diminution de la sérotonine et de son métabolite l'acide 5-hydroxyindoleacétique (Weekly *et al.*, 1985), elle inhibe la métabolisation du tryptophane par la diminution de l'activité du tryptophane 2, 3- dioxygénase (Weekly et Llewellyn, 1984). L'AFB1 provoque la diminution de la tyrosine ce qui conduit à l'altération de la concentration des catécholamines (Weekly *et al.*, 1989).

L'administration gastrique répétée d'AFB1 conduit à une diminution de la concentration de la dopamine et de ces métabolites (Coulombe et Sharma, 1985). L'administration intrapéritonéale d'AFB1 cause des tumeurs dans le système nerveux central et périphérique (Goerttler *et al.*, 1980).

2.6.8. Cardiotoxicité

L'AFB1 a un effet sur l'approvisionnement des cellules cardiaques en énergie par son action inhibitrice sur la synthèse de glycogène, l'assimilation du glucose, et sur la glycolyse. Cet effet a pour conséquence la réduction du taux de glycogène et du glucose accompagnée par une diminution des enzymes glycolytiques, le Glyceraldéhyde 3- phosphate déhydrogénase (GAPDH), le Glucose isomérase (GI), et le lactate dehydrogénase (LDH) (Abdulmajeed, 2011).

La diminution du glycogène cardiaque résulte d'une inhibition de l'activité des enzymes biosynthétiques et de la stimulation de la glycogénolyse et ce ci par l'inhibition de l'hydrolyse de l'adénosine monophosphate polycyclique (AMPc) (Kiessling, 1986). La réduction de

l'absorption du glucose peut être attribuée à la diminution du nombre des transporteurs GLUT 1 et GLUT 4 du sarcolemme (Kiessling, 1986).

2.6.9. Effet sur la peau

Lorsque la peau est exposée aux AFB1, des brûlures, des rougeurs et des nécroses cutanées se produisent. Des études récentes ont démontré que l'AFB1 possède des activités initiatrices pour les tumeurs de la peau (Rastogi *et al.*, 2006).

2.6.10. Effets sur le foie

L'organe principal visé par les aflatoxines est le foie. Après l'invasion des AFB1 dans le foie, les lipides infiltrant les hépatocytes et cela conduit à la nécrose ou à la mort des cellules hépatiques. En corrélation avec la diminution du fonctionnement du foie, il apparaît un dérangement du mécanisme de la coagulation sanguine, un ictère et une augmentation des transaminases et des phosphatases libérées dans le sérum. L'AFB1 altère l'équilibre de la balance antioxydante-prooxydante hépatocytaire (Meki *et al.*, 2004).

Chapitre 2. Hépatotoxicité de l'AFB1

1. Le foie

1.1. Anatomie

Le foie est le plus volumineux organe de l'organisme, pèse environ 1,5 kilo. Il est logé dans la partie supérieure de l'abdomen, du côté droit et recouvert par une capsule de tissu conjonctif, elle-même entourée par le péritoine. Il est divisé en deux sections, le lobe droit et le lobe gauche. Ces deux lobes se composent d'une multitude de segments, les lobules, qui constituent l'unité fonctionnelle du foie. Ces lobules sont formés par des hépatocytes et de cellules sinusoïdales (cellule endothéliale, cellule de Kupffer et cellule étoilée du foie) (Lanz, 2009).

Les hépatocytes ont une double polarité, leurs faces sinusoïdales sont en contact intime avec le sang portal via les cellules endothéliales. Ce sont des zones d'échanges intenses où les cellules puisent les éléments nécessaires à leurs activités de synthèse (lipides, protides et glucides) et de catabolisme (xénobiotiques, hormones...) et déversent les produits de leurs activités. Leurs faces biliaires délimitent le canalicule biliaire. La bile sécrétée par les hépatocytes chemine dans ce système canaliculaire puis est recueilli dans des ductiles juxta-portaux qui se jettent dans le canal biliaire de l'espace porte.

Les cellules endothéliales limitent la sinusoïde et empêchent le sang de s'immiscer dans l'espace de Disse tout en autorisant, par leurs systèmes de pores, les échanges entre le plasma et les hépatocytes.

Les cellules de Kupffer sont des macrophages situées à l'intérieur de la sinusoïde, leur rôle est de purifier le sang sinusoïdal des impuretés non arrêtées par la barrière intestinale (endotoxines bactériennes, particules minérales ou virales...). Les Cellules étoilées du foie sont situées dans l'espace de Disse, ont pour fonctions le stockage de la vitamine A, et la synthèse de la matrice extracellulaire hépatique (Yves, 2005).

Le foie est approvisionné en sang à raison de un à deux litres par minute à partir de deux sources: l'artère hépatique, d'une part, qui transporte vers le foie du sang riche en oxygène, et la veine porte d'autre part, qui amène le sang riche en nutriments venant de l'intestin, de l'estomac et d'autres organes du système digestif. Toutes les deux pénètrent dans le foie par la porte du foie.

La bile gagne le duodénum par le canal cholédoque, qui quitte le foie au niveau de la porte du foie (Lanz, 2009).

1.2. Fonctions du foie

Le foie reçoit par l'artère hépatique et la veine porte des substances chimiques, qu'il transforme et rejette soit dans la bile, par laquelle elles passent dans la vésicule biliaire puis dans l'intestin, soit dans les veines sus-hépatique, d'où elles passent dans la veine cave puis dans l'ensemble de la circulation sanguine. De plus, il peut synthétiser des substances nécessaires à l'organisme et en stocker; c'est le cas de la production d'hormones, de lipides et de protéines (albumine, fibrinogène et facteurs de coagulation). D'autre part cette glande volumineuse joue un rôle dans la métabolisation des sucres (synthèse du glycogène) et des lipides (corps gras comme le cholestérol), et le stockage de la vitamine B12 ainsi que celui du fer. Enfin le foie possède des capacités de neutralisation des toxines et d'autres produits contenant de l'ammoniaque (Yves, 2002).

1.3. Pathologies

Le foie peut être atteint par une inflammation (hépatite, d'origine virale, alcoolique, toxique), une infection bactérienne globale ou localisée (abcès), un parasite (amibiase, kyste hydatique), par une cirrhose, par une tumeur bénigne ou maligne (hépatocarcinome, métastases) (Yves, 2002).

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une tumeur maligne qui se forme à la suite de la dégénérescence des hépatocytes ou des cellules précurseurs de celles-ci (cellules souches hépatiques) qui se mettent à proliférer de manière anarchique. Dans les pays tropicaux le CHC est souvent lié au virus des hépatites B et C, parfois à la pollution des aliments, notamment par l'aflatoxine B1 (Yves, 2002; Lanz, 2009).

2. Mécanisme de l'hépatotoxicité de l'AFB1

2.1. Mécanisme de géno- et cancérrogénicité

L'AFB1 a la capacité d'interagir avec l'ADN et l'ARN et d'inhiber la synthèse des macromolécules par intervention au cours de la transcription et de la synthèse des protéines.

2.1.1. Par action sur l'ADN

L'AFB1 telle qu'elle n'est pas un composé toxique ou cancérigène mais c'est l'activation de celle-ci au niveau du foie qui la transforme en un composé très réactif: l'AFBO (Miller, 1978).

C'est la fonction *exo*-époxyde, le site hautement réactionnel d'AFBO, qui s'intercale dans l'ADN double brin en formant des liaisons covalentes en 5' et plus précisément en position N7 de certaines guanines et donne l'adduit AFB1-N⁷-Gua plutôt instable qui va soit libérer l'AFB1-8,9-dihydrodiol et restaurer ainsi les sites guaniliques, soit subir une dépurination et créer un site apurinique dans l'ADN (AP), soit se convertir en un adduit stable, non réparable, le AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FAPY) (Yunus et al., 2011). Ce dernier peut persister durant plusieurs cycles de replication de l'ADN (Keller-Seitz *et al.*, 2004).

Benassutti *et al.* (1988) ont démontré que la réactivité de l'AFB1 pour la guanine dépend des bases de part et d'autre de celle-ci. Le maximum de réactivité est observé avec une répétition de 3 guanines, et c'est le 2ème G qui est la cible d'AFB1. La liaison covalente d'AFB1 aux protéines membranaires peut réduire l'apport en thymidine et d'autres précurseurs des nucléotides nécessaires pour la synthèse d'ADN (Kunimoto *et al.*, 1974).

L'adduit AFB1-ADN inhibe la méthylation d'ADN et provoque l'altération de l'expression des gènes et la différenciation cellulaire (Wilson et Jones, 1983). L'affinité d'AFB1 à l'ADN mitochondriale est 3 à 4 fois plus qu'à l'ADN nucléaire (Niranjan *et al.*, 1982). Les lésions d'ADN mitochondriale sont persistantes et peuvent être dues à un manque des mécanismes de réparation dans cette organelle. Par conséquent, la transcription et la traduction mitochondriale sont inhibées ce qui conduit à une transformation néoplasique des cellules (Hsieh, 1987).

Les différentes lésions de l'ADN liées à l'action toxique des époxydes sont : les aberrations chromosomiques, la formation de micro-noyaux, les échanges de chromatides sœurs, les cassures de chromosomes, et les modifications de la synthèse d'ADN (Wang et Groopman, 1999).

Comme il a été démontré ci-dessus, la liaison covalente d'AFB1 à l'ADN induit des mutations dont les plus étudiées intéressent le gène de suppression tumorale (P53) et l'oncogène ras (AFSSA, 2009).

A. Effet sur le gène ras

Par son pouvoir mutagène, l'AFB1 peut induire l'activation de nombreux proto-oncogènes incluant HRAS, KRAS ou NRAS (Beaune, 2001).

Dans le foie des rats, deux types de mutations ont été démontrées dans la région du codon 12 du gène Ki-ras : GGT \rightarrow GAT (McMahon *et al.*, 1987) et GGT \rightarrow TGT (Sinha *et al.*, 1988).

Chez l'homme, ces mutations se déroulent dans la première et la deuxième position du codon 12 du protooncogène Ha-ras (Sinha *et al.*, 1988).

B. Effet sur le gène P53

La mutation associée à l'HCC correspond à une transversion AGG vers AGT (le changement d'une arginine en une sérine) du codon 249 de la protéine P53, une mutation somatique qui n'affecte que les cellules hépatiques dans certaines conditions (Smela *et al.*, 2001).

Benassutti a démontré que l'AFB1 réagit avec 20% des bases entre les exons 5 et 8 de P53 dont 85% sont des guanines. D'autres mutations ont été décrites sur des codons des exons 7 et 8 de P53, par exemple, les mutations AGG-ATG du codon 249 (arginine vers méthionine) et CCC-ACC (proline vers thréonine) du codon 250. Les adduits de l'AFB1 peuvent donc agir à plusieurs endroits sur les séquences d'ADN, même si la troisième base du codon 249 représente le « point chaud » préférentiel (Aguilar *et al.*, 1993).

2.1.2. Par action sur les protéines

L'AFB1 inhibe fortement la synthèse des protéines dans les cellules du foie des rats. La structure et les activités des protéines peuvent être altérées par la formation des liaisons irréversibles covalentes non spécifiques (dénaturation ou blocage des sites de liaisons) et/ou des liaisons réversibles non covalentes spécifiques (liaisons de compétition) avec l'AFB1. Les protéines liant l'AFB1 de façon réversible peuvent servir comme des réservoirs à cette toxine, prolongeant de ce fait l'exposition et le transport des métabolites réactifs (Hsieh, 1987). Une proportion d'AFB1 activée est transloquée vers divers sites subcellulaires où il y aura la formation des liaisons covalentes en premier lieu avec les macromolécules cellulaires (exp : réticulum endoplasmique granulé), les noyaux, et finalement avec la mitochondrie (Ch'ih et Devlin, 1984).

Plusieurs protéines cellulaires: la pyruvate kinase, l'albumine, l'anhydrase carbonique, et les histones sont capables de se lier à l'AFB1 en raison de la présence de séquences nucléaires qui augmentent de façon remarquable la translocation et l'activation d'AFB1 dans le noyau (Ch'ih *et al.*, 1993).

L'inhibition de la synthèse protéique par l'AFB1 peut survenir directement par l'inactivation des enzymes biosynthétiques ou indirectement par l'altération des activités d'ADN, l'inhibition de la synthèse, la maturation et la traduction d'ARN, et/ou par l'interférence avec le transport des acides aminés (Hsieh, 1987).

Le traitement des cellules par l'AFB1 provoque une dégranulation du réticulum endoplasmique (RE) suite à des changements disruptifs, des dommages membranaires du RE, l'interférence avec

les sites de liaison et le cycle ribosomale, l'inhibition de la libération des protéines nouveau synthétisé, et la suppression de la synthèse de l'ARNm (Terao et Ueno, 1978).

2.1.3. Par action sur l'ARN

La synthèse d'ARN du foie des rats est inhibée par l'AFB1 (Yu, 1977 ; 1981) spécialement l'ARN nucléaire qui forme l'ARN ribosomal (18s et 28s) et son précurseur (32s et 45s) (Roy, 1968; Yu, 1977). Cette inhibition résulte de la réduction des activités d'ADN, l'inhibition de l'ARN polymérase II (Saunders *et al.*, 1972; Yu, 1977) et l'altération du transport des nucléotides (Kunimoto *et al.*, 1974; Akinrimisi *et al.*, 1974).

La diminution de la synthèse d'ARN est expliquée par la liaison d'AFB1 avec les régions actives de la chromatine nucléaire (Yu, 1983). Yu (1981) a démontré que l'AFB1 peut interférer au cours d'élongation d'ARN. L'AFB1 perturbe le processus post-transcriptionnel de la formation d'ARN_r (Harley *et al.*, 1969) par l'intervention aux cours de clivage d'ARN 45s aux ARN 18s et 28s (Hsieh, 1987).

2.1.4. Par action sur le métabolisme

A. Les glucides

L'administration d'AFB1 à différentes espèces animales provoque une réduction du taux de glycogène hépatique avec une augmentation du taux de glucose sérique (Kiessling, 1986). Ces affections peuvent survenir à cause d'une inhibition des enzymes glycogéniques (glycogène synthase), d'inhibition de la glyconéogenèse, d'une diminution du transport du glucose vers les hépatocytes ou d'une augmentation des activités des enzymes de métabolisation des précurseurs de glycogène (glucose 6- phosphate déhydrogénase) (Kiessling, 1986 ; Hsieh, 1987).

B. Les lipides

L'AFB1 affecte le transport et/ou la biosynthèse des lipides, l'oxydation des graisses, ce qui conduit à une accumulation lipidique dans le foie (Hamilton, 1975 ; Chou et Marth, 1975). Terao et Ueno (1978) ont démontré que le traitement des cellules par l'AFB1 entraîne une diminution de l'oxydation mitochondriale avec une accumulation concomitante des lipides hépatiques ce qui conduit à des dommages des mitochondries du foie. En plus des effets suscités, l'AFB1 affecte l'absorption et la dégradation lipidique (Tung *et al.*, 1972).

2.2. Mécanisme moléculaire de l'interaction AFB1- virus de l'hépatite B (VHB) et C (VHC)

L'augmentation de l'incidence des cancers, chez les individus porteurs de virus, peut s'expliquer par le fait que les virus altèrent l'expression des enzymes métabolisant l'AFB1 (Pfohl-Leszkowicz, 2009). Kirby *et al.* (1996) ont observé une augmentation de l'activité des CYP2A6 et 3A4 du foie, lorsque les individus avaient une hépatite. Par ailleurs, il y a simultanément une baisse de l'activité du GST (Zhang *et al.*, 2006). Les enfants porteurs du VHB en Gambie ont plus d'adduits aux protéines dans le sang et excrètent plus d'adduits à l'ADN que ceux qui ne sont pas porteurs. Des résultats identiques ont été obtenus chez des adolescents en chine. La corrélation est moins évidente chez les adultes, montrant la complexité des interactions (Pfohl-Leszkowicz, 2009).

Le risque de développer un HCC est multiplié par 60 en cas de présence d'adduits d'AFB1 et du VHB (Shen *et al.*, 1994).

La protéine HBx permet de sélectionner les cellules mutées préalablement par l'AFB1 et ainsi de favoriser l'apparition d'un CHC. Elle peut inhiber l'excision de nucléotides pour la réparation de

l'ADN en se liant aux protéines de réparation ou directement à l'ADN endommagé; ce qui peut favoriser la persistance des adduits d'AFB1 (Shen *et al.*, 1994).

3. Marqueurs d'évaluation de l'hépatotoxicité de l'AFB1

La principale conséquence d'une intoxication grave par aflatoxines est la nécrose hépatique qui se traduit par une forte augmentation des transaminases plasmatiques. Cette nécrose est associée à une infiltration de cellules inflammatoires. La réduction du nombre d'hépatocytes et leur dysfonctionnement provoquent une stéatose et une cholestase avec l'augmentation des taux plasmatiques en bilirubine, phosphatases alcalines (PAL) et gamma-glutamyl transférase (GGT), une prolifération des canalicules biliaires et le développement d'une fibrose hépatique.

3.1. Les métabolites de l'AFB1

Les métabolites d'AFB1 (l'AFM1, l'AFQ1, AFP1, ...), ses adduits à l'ADN dans les urines, ses adduits à l'albumine sérique et l'AFM1 dans le lait maternel sont utilisés comme indicateurs d'exposition des populations.

3.2. Les transaminases (TGP/TGO)

Les transaminases appelées également aminotransférases sont deux enzymes: Alanine Amino-Transférase (ALAT/TGP) et Aspartase Amino-Transférase (ASAT/TGO), produites par les cellules du foie. Leur taux normal dans le foie est situé entre 5 à 40 unités internationales par litre. L'augmentation du taux sérique de ces enzymes est liée à un endommagement partiel des hépatocytes. Le niveau sérique en ALAT et ASAT peut correspondre approximativement à la quantité de cellules mortes ou à l'étendue de l'inflammation (la réaction du système immunitaire en cas d'irritation ou de blessure) du foie (Teeter et Franciscus, 2004).

3.3. La phosphatase alcaline (PAL)

Les PAL sont des enzymes hépatiques produites dans les voies biliaires et les os. Leur présence dans le sang est liée à des lésions de divers organes tels que le foie. L'augmentation des PAL au-dessus de la valeur normale située autour de 120 unités internationales par litre (UI) s'observe au cours des maladies du foie et des voies biliaires (Teeter et Franciscus, 2004).

3.4. La gamma glutamyl transférase (GGT)

C'est une enzyme essentiellement présente dans le tissu hépatique et dans le tissu rénal. Le niveau normal de la GGT est de 12 à 55 UI/L. Le taux de gamma GT dans le sérum sanguin augmente au cours de certaines maladies du foie qui se caractérisent par l'existence d'un obstacle à l'écoulement normal de la bile du foie vers l'intestin grêle (cholestase) (Teeter et Franciscus, 2004).

3.5. La lactate déshydrogénase (LDH)

La lactate déshydrogénase est une enzyme importante dans le métabolisme des sucres. On la retrouve dans les cellules de différents organes et tissus; rein, foie, cœur, muscles, pancréas, cerveau,... Une augmentation importante du taux de LDH est le signe d'une souffrance cellulaire sans indication sur l'organe atteint. Son dosage est donc couramment associé à d'autres évaluations. Les valeurs normales sont comprises entre 190-430 UI/l (Teeter et Franciscus, 2004).

3.6. Bilirubine

La bilirubine est le produit résultant de la dégradation d'une partie d'hémoglobine, sa concentration à l'intérieur du plasma est normalement inférieure à 10 mg par litre, soit 6 μ moles par litre. Lorsque la fonction hépatique est endommagée, comme dans le cas d'une hépatite aiguë ou de la phase finale d'une maladie du foie, la bilirubine s'accumule dans le sang et dépasse 30 mg par litre, ce qui entraîne le jaunissement de la peau et des yeux (Teeter et Franciscus, 2004).

Chapitre 3. Les acteurs du stress oxydant cellulaire

1. Définition du stress oxydant

L'oxygène moléculaire est un élément crucial pour la vie des organismes aérobiques, toutefois il peut former des espèces partiellement réduites appelées les radicaux libres. Cependant, une production excessive de ROS par différents mécanismes physiopathologiques ou facteurs environnementaux entraîne un déséquilibre de la balance prooxydant/antioxydant ce qui donne lieu au stress oxydant. La cellule ne contrôle alors plus cet excès de ROS qui va engendrer de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire. Pour cela l'organisme va devoir se protéger par différents systèmes antioxydants afin de préserver les performances physiologiques (Favier, 2003).

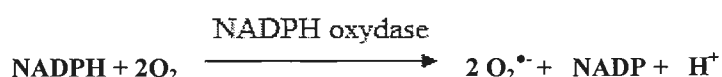
2. Principales espèces réactives oxygénées (ROS)

Le terme espèce réactive de l'oxygène (ROS) regroupe les radicaux libres oxygénés [radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), radical hydroxyle (OH^{\bullet}), monoxyde d'azote (NO^{\bullet})...] et certaines dérivées réactives non radicalaires [l'anion peroxyde (O_2^{2-}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le peroxydinitrite (ONOO^-)] (Bartosz, 2003).

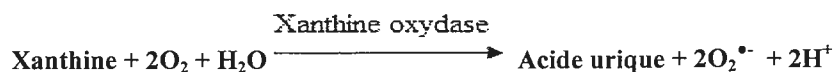
Les ROS sont produits continuellement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote. Les sources exogènes de ROS comprennent les autres cellules, les produits chimiques, polluants et les radiations ionisantes. Tandis que les sources endogènes comprennent les processus métaboliques employant de l'oxygène (Barzilai et Yamamoto, 2004). Comme principales ROS on peut citer :

➤ L'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$)

Il peut se former par réaction de l'oxygène avec un électron provenant d'une fuite au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Bartosz, 2003), par la NADPH oxydase (Babior *et al.*, 2002), selon la réaction suivante :



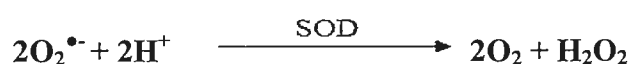
Au cours de l'oxydation de la xanthine en acide urique, (Bartosz, 2003)



Au cours de l'auto-oxydation de composés tels que les neuromédiateurs, les thiols, mais aussi de la détoxification des xénobiotiques par le système des cytochromes P450 (Halliwell et Gutteridge, 1999).

➤ Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

La production d' H_2O_2 peut résulter aux cours de la réaction suivante (Milane, 2004) :



Au cours de la désamination oxydative de certaines amines catalysé par une monoamine oxydase (Gardès *et al.*, 2003).

➤ Le radical hydroxyle (OH•)

Le radical hydroxyle (OH•), peut se former selon les réactions suivantes (Sorg, 2004) :



➤ Le radical peroxy (ROO•) et le radical alkoxy (RO•)

Le radical peroxy (ROO•) est formé par une réaction directe entre l'oxygène et le radical alkyle (R•). La décomposition de l'hydroperoxyde (ROOH) en présence de l'UV et des métaux de transition donne des radicaux peroxy ou des radicaux alkoxy, selon les réactions suivantes :



➤ Le monoxyde d'azote (NO•)

Beaucoup de cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote (NO•) selon la réaction suivante :



Le NO• donne, en présence de l'O₂, des oxydes d'azote (ONOO•, N₂O₃), et en présence de l'O₂•-, de l'anion peroxydinitrite (ONOO-) (Gardès *et al.*, 2003).

➤ L'acide hypochloreux (ClO)

En présence d' H₂O₂ et d'ions Cl⁻, la myéloperoxydase catalyse la formation de dérivés halogénés toxiques.



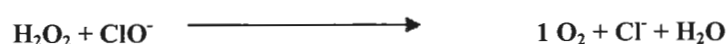
➤ L'oxygène singulet (¹O₂)

Il peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation (Sorg, 2004) incluant :

L'attaque de l'eau oxygénée par la myéloperoxydase :



La réaction entre divers ROS



3. Potentialités toxiques des espèces radicalaires

L'accumulation des ROS provoque l'apparition des dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les lipides, les protéines et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell et Whiteman, 2004).

3.1. Les lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle OH^\bullet capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons. Cette réaction appelée peroxydation lipidique, forme une réaction en chaîne car le radical peroxyyle formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical. Le radical peroxyyle, après évolution en un peroxyde cyclique et coupure de la molécule, peut libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonalaldéhyde (MDA) ou l'hydroxynonenal (4-HNE). Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires (Khohen et Nyska., 2002).

3.2. Les protéines

Les ROS peuvent attaquer les protéines notamment les acides aminés soufrés et aromatiques pour produire des groupements carbonyles et des acides aminés modifiés incluant la méthionine sulfoxide, la 2-oxohistidine, et les peroxydes protéiques. La modification protéique est initiée par l'attaque du OH^\bullet soit au niveau de la chaîne latérale, avec formation des produits d'oxydation soit au niveau de la liaison peptidique entraînant la fragmentation de la chaîne (Berlett et Stadtman 1997). Les produits de la peroxydation lipidique peuvent réagir avec les protéines entraînant par conséquent son oxydation (Virag *et al.*, 2003).

3.3. L'ADN

Les ROS ont une grande affinité de réaction avec certaines bases constitutives de l'ADN engendrant un grand nombre de bases modifiées: 8 oxo guanine, 8 nitro guanine, formamidopyrimidine et 8 oxo adénine. Mais ils peuvent aussi attaquer la liaison entre la base et le désoxyribose, créant un site abasique, ou attaquer le sucre lui-même, créant une coupure de chaîne simple brin. Des dommages indirects peuvent résulter de l'attaque d'ADN par des produits de la peroxydation lipidique (MDA), formant des adduits de type MDA-guanine ou éthénodérivés. L'attaque radicalaire des protéines qui sont en contact avec l'ADN entraîne des adduits sur des bases de type lysinoguanine (Cadet *et al.*, 2002 ; Favier, 2003).

3.4. Les glucides

Le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques en présence de trace métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H_2O_2 et OH^\bullet , qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glyco-oxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier *et al.*, 2003).

Face à la production permanente de ROS, l'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces qui sont susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ROS. Il existe deux catégories majeures: les systèmes enzymatiques et les systèmes non enzymatiques (Comhair, 2002).

4. Mécanismes cellulaires de défense contre les ROS

4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de $\text{l'O}_2^{\bullet-}$ et de $\text{l'H}_2\text{O}_2$, conduisant finalement à la formation d' H_2O et de l'O_2 (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloenzymes qui catalysent la dismutation de deux molécules d' $O_2^{\bullet-}$ en O_2 et H_2O_2 (Tremellen, 2008).

La catalase est une enzyme hémunique présente essentiellement dans les peroxysomes, son rôle est d'accélérer la dismutation d' H_2O_2 en H_2O et en O_2 (Tremellen, 2008).

La glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR) sont localisées dans le cytosol et les mitochondries. La GPx est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui fait la détoxification d' H_2O_2 et des ROOH en utilisant comme donneur d'électron le glutathion. Ce dernier passe alors de la forme réduite (GSH) à la forme oxydée (GSSG). La glutathion réductase (GR) a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Sorg, 2004).

4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

En plus du système enzymatique, la cellule peut disposer de l'appui de molécules antioxydantes non-enzymatiques qui renferment de nombreuses substances endogènes dont le plus important est le glutathion réduit et d'autres substances exogènes apportées par l'alimentation (Ozsoy *et al.*, 2009).

Le glutathion est un tripeptide composé de glutamate, la glycine et la cystéine. Cette dernière est disposée d'un groupement thiol (SH) libre, piègeur directe des radicaux libres (Agarwal *et al.*, 2007).

La bilirubine est un piègeur des radicaux peroxydes et d'oxygène singulier, permettant ainsi la protection de l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

La vitamine C, un antioxydant hydrosoluble, peut réagir avec diverses ROS comme $l'OH^{\bullet}$ et $l'O_2^{\bullet-}$. Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle passe par une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E (Chen *et al.*, 2000). En plus de la famille des tocophérols (α , β , δ , γ), dont la forme la plus active étant l' α tocophérol (Vertuani *et al.*, 2004), un antioxydant liposoluble qui a la capacité de prévenir la propagation de la peroxydation lipidique en séquestrant les ROS (Onibi *et al.*, 2000).

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils ont aussi des propriétés chélatrices (Delattre *et al.*, 2005).

Chapitre 4. La propolis comme source de polyphénols

1. La propolis

1.1. Historique et définition

La propolis existe depuis que l'abeille est apparue sur terre, il y a 50 à 60 millions d'années, et c'est en quelques sortes l'abeille qui l'a utilisé avant tout le monde. Au cours de l'histoire, ce sont les grecs et les Egyptiens qui s'en sont servis les premiers en tant qu'antiseptique et cicatrisant (Jean, 1999). Depuis la propolis était peu à peu tombée dans l'oubli, mais elle revient sur le devant de la scène comme une excellente alternative aux médicaments et autres antibiotiques chimiques. Le terme propolis vient du grec «pro, qui signifie: en avant de, et polis: la cité, l'entrée de la ruche (Ghisalberti, 1978).

La propolis est un complexe fabriqué par les abeilles à partir de leurs sécrétions et d'une série de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies sur certaines parties (bourgeons et écorces essentiellement) de végétaux (certains arbres principalement) (Kusumoto *et al.*, 2001).

1.2. Origine

L'origine botanique de la propolis peut influencer la saveur, la couleur, et la composition chimique de la propolis (Kokaleci *et al.*, 2003). La propolis a deux origines:

Origine interne: d'après les chercheurs Allemands, la propolis serait un résidu résineux provenant de la première phase de la digestion du pollen dans un petit organe situé entre le jabot et l'intestin moyen (Caillas, 1978).

Origine externe: les principales essences d'arbres connues pour être productrices de propolis sont représentés par différents conifères : pin, spin, épicéa; plusieurs espèces de peuplier (qui semble l'espèce la plus importante); l'aulne; le saule; le marronnier d'inde; le bouleau; le prenier; le frêne; le chêne; et l'orme (Moudir, 2004).

1.3. Composition chimique

Au cours des dernières décennies, les techniques modernes d'analyse scientifique ont permis d'avoir une idée assez précise de la composition qualitative et quantitative de la propolis. Cette composition chimique varie selon la zone géographique, le temps de la récolte, la source végétale, l'espèce de l'abeille, et les matériaux introduits durant l'élaboration de la propolis (Marcucci *et al.*, 1994).

Cependant on retrouve toujours de façon constante et relativement stable les résines (45 à 55%), les cires (7.55-35 %), les huiles essentielles (5%), les acides gras (5%), le pollen (5%), les acides aminées, les vitamines, et les oligoéléments (Krell, 1996 ; Durk, 1997).

1.4. Propriétés physicochimiques

La consistance de la propolis varie en fonction de la température, elle est dure et friable à 15° C, molle et malléable à 30° C, collante ou gluante au dessus de 30° C, dissoute vers 60 à 70° C jusqu'à 100°C et au-delà. Sa couleur varie selon sa provenance, elle peut être jaune claire, brune très foncé presque noire, brune rougeâtre, brune verdâtre...etc. De saveur acre et parfois amère, d'odeur agréable et douceâtre, et si elle est brûlée elle dégage une odeur très délicate liée aux résines aromatiques qu'elle contient. Elle est insoluble dans l'eau froide, partiellement soluble dans l'acétone, l'alcool, l'ammoniaque, le benzène, le chloroforme. Un mélange adéquat

de différents solvants permet de dissoudre la quasi-totalité de ses composants (Krell, 1996 ; Bancova *et al.*, 2000).

1.5. Propriétés pharmacologiques et biologiques

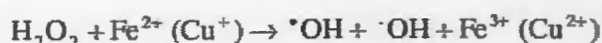
Les propriétés pharmacologiques de la propolis sont connues dans la médecine populaire depuis l'antiquité, mais récemment, l'intérêt de la propolis est en développement considérable en raison de son large spectre de propriétés biologiques (anti-inflammatoire, antioxydant, antimicrobienne, anti tumorale...) L'ensemble des recherches effectuées à ce jour permet de montrer que la présence des polyphénols est responsable de toutes les propriétés pharmacologiques de la propolis (Sulaiman *et al.*, 2012). Parmi ces activités on peut citer :

1.5.1. Propriétés antioxydantes

L'activité antioxydante des polyphénols et essentiellement les flavonoïdes exercent leur activité antioxydante à travers:

A. La chélation des ions métalliques

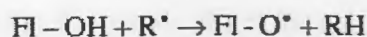
Les ions de fer (Fe^{+2}) et du cuivre (Cu^{+2}) sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques. Mais sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes sont considérés comme de bons chélateurs de ces ions métalliques (Bruneton, 1999).

B. Piégeage des radicaux libres

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux libres a été employée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydant. A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (FI-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde, et l'hydroxyle par transport d'hydrogène selon la réaction suivante:



Où R^\bullet représente l'anion superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyle.

Le radical flavonoxyl (FI-O^\bullet) peut réagir avec un autre radical pour former une structure qui n'est pas stable comme le montre la figure 3.

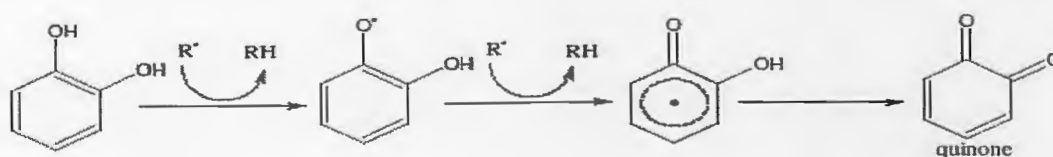


Figure 3: Piégeage des ROS ($\dot{\text{R}}$) par les flavonoïdes (Bruneton, 1999).

C. Inhibiteurs enzymatiques

En règle générale, les flavonoïdes sont *in vitro* des inhibiteurs enzymatiques: inhibition de l'histidine décarboxylases et de hyaluronidase, ce qui permettent de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire, inhibition de l'aldose réductase... (Bruneton, 1993).

1.5.2. Propriétés anticancéreuses

La propolis a une activité cytotoxique sélective sur les cellules cancéreuses *in vivo* et *in vitro* (Matsuno, 1992). Ross (1990) a démontré l'effet cytotoxique du naphthalène dérivé de la propolis sur les cellules cancéreuses de l'ovaire des hamsters chinoises.

1.5.3. Propriétés anti-inflammatoire

L'action anti-inflammatoire de la propolis se fait par la stimulation des macrophages, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la synthèse des eicosanoïdes. La propolis inhibe une enzyme nommée *Hyaluronidase* qui est responsable de plusieurs processus inflammatoire. Elle inhibe ainsi la génération de la prostaglandine et de la leucotriène (agents inflammatoires) par l'inhibition soit de la voie 5-lipoxygénase soit de la voie de la cyclooxygénase (inhibition des COX-1 et COX-2) de la métabolisation de l'acide arachidonique (Borrelli *et al.*, 2002).

1.5.4. Autres propriétés

La propolis agit sur l'immunité aussi bien innée qu'acquise. Au niveau de l'immunité naturelle, la propolis augmente l'activité des macrophages et l'activité lytique des cellules « natural killer ». Au niveau de l'immunité acquise, la propolis stimule la production d'anticorps par les lymphocytes B et la différenciation des lymphocytes T (Orsatti *et al.*, 2009).

La Propolis entraîne la stimulation des processus de régénération tissulaire et de cicatrisation. Cette propriété est due à la présence d'acides aminés tels l'arginine et la proline qui permettent d'augmenter la synthèse du collagène et d'accélérer la réparation de l'épiderme abîmé (Gregory *et al.*, 2002).

L'activité antibactériennes de la propolis est trop documentée elle présente un effet aussi bien bactéricide que bacteriostatique (Marivane *et al.*, 2007). Les souches bactériennes sensibles sont les Bactéries Gram (+) *Staphylococcus aureus* et *S. Faecalis*, et les Bactéries Gram (-) *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* ... (Marcucci *et al.*, 2004).

La propriété antifongique des flavonoïdes et des acides phénoliques de la propolis sur l'*Aspergillus flavus* est présentée par leur capacité à réduire la germination et la production des aflatoxines. Ils inhibent aussi les *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*, *C parapsilosis*, *C tropicalis* et *C guilliermondii*. (Ota *et al.*, 2001).

L'activité antivirale est démontré par l'action de l'acide caféique et de la quercétine de la propolis sur certains types de virus: Virus de l'influenza A et B, adenovirus type 2... (Amoros *et al.*, 1994).

2. Les polyphénols

2.1. Définition

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux, de structure caractérisé par la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, qui varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules polymérisées (tannins condensés) (Macheix *et al.*, 2005). Ils résultent biogénétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et la voie acétate (Lugasi *et al.*, 2003).

2.2. Biosynthèse des composés phénoliques

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues. 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 (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). Ces composés sont issus par deux grandes voies métaboliques. Les deux voies de biosynthèse sont schématisées dans la figure 4.

2.2.1. La voie de l'acide shikimique

Elle conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques. Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques (Bouheroum, 2007).

2.2.2. La voie d'acétate malonate

Elle conduit par condensations répétées à des systèmes aromatiques (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 d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration des composés mixtes comme les flavonoïdes, les stilbènes et les xanthones (Bouheroum, 2007).

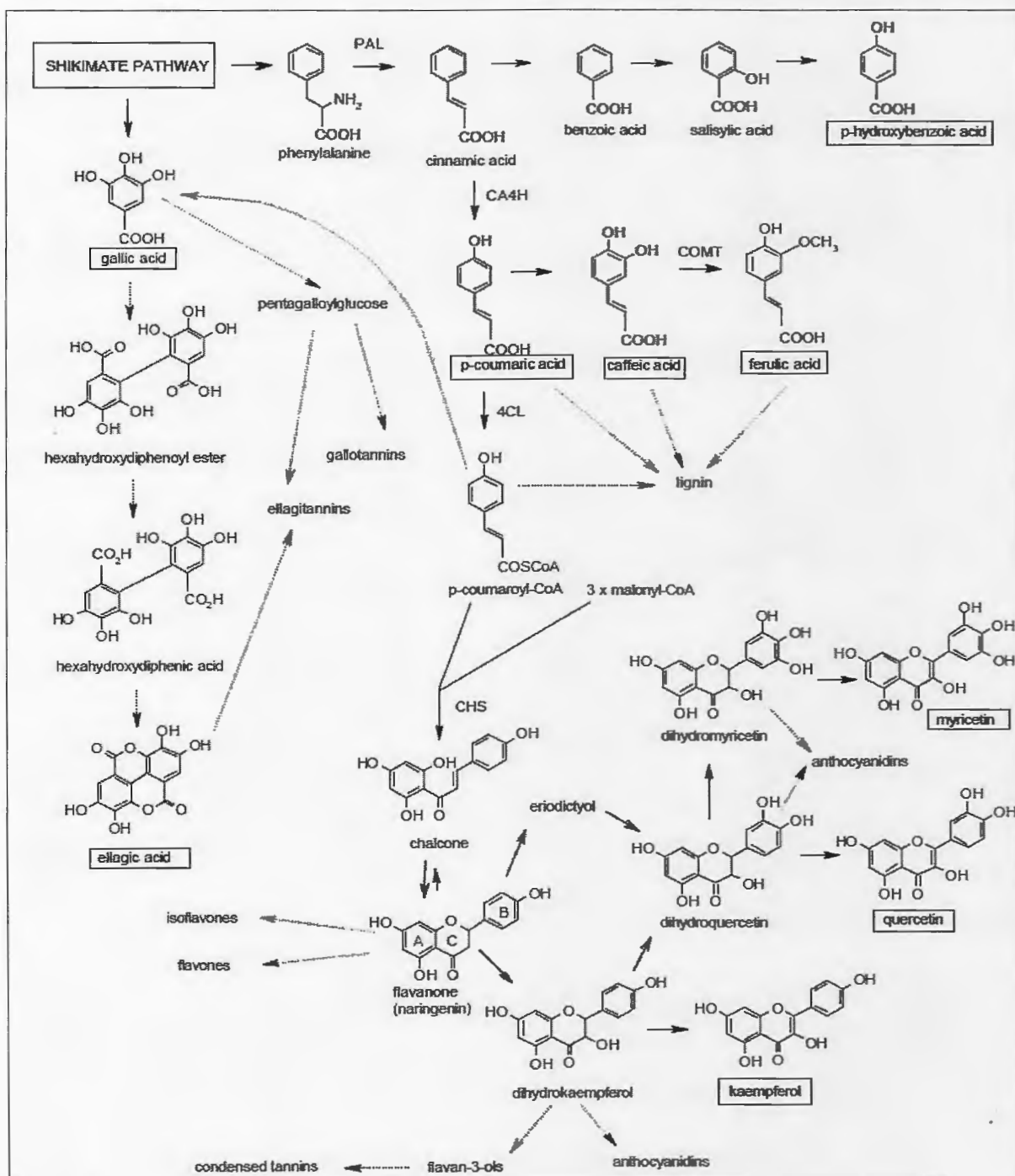


Figure 4. Les voies de biosynthèse des composés phénoliques (Bouheroum, 2007).

2.3. Classification

En se basant sur la structure carbonée de base, on peut dégager les principales classes de composés phénoliques: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins,... figure 5.

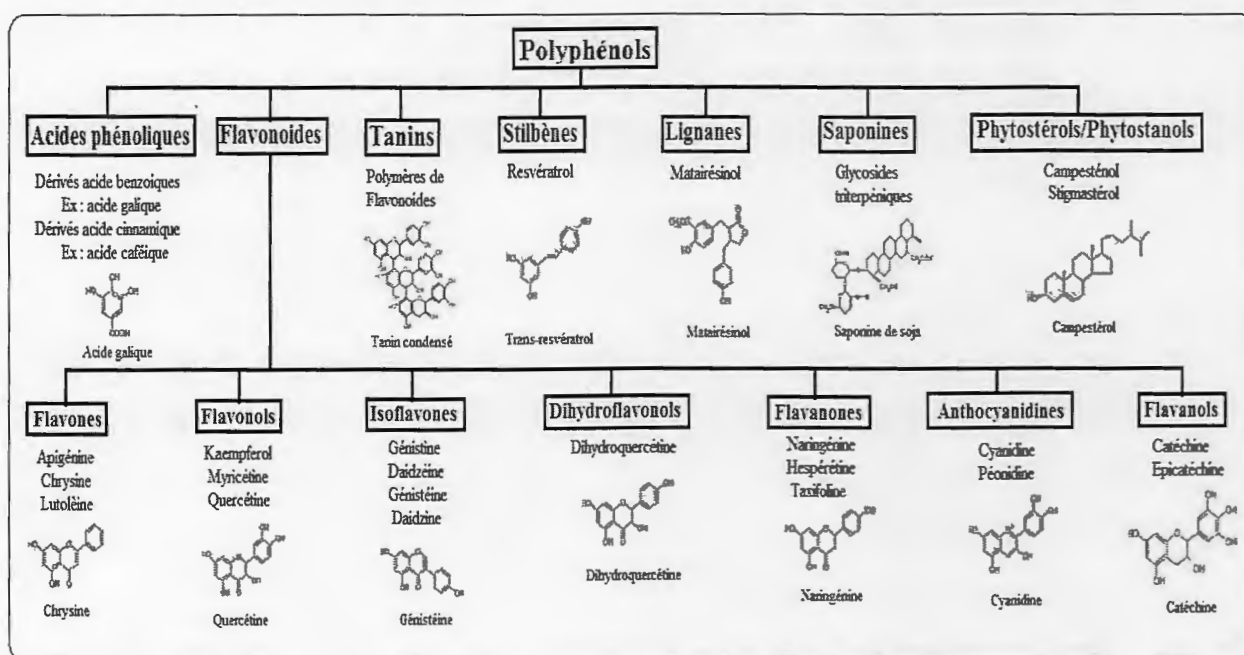


Figure 5. Les différentes classes des composés phénoliques (Yvon, 2004).

2.3.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbone possédant aux moins une fonction carboxyle (Psotová *et al.*, 2003). Ils sont divisés en trois sous classes :

- Les acides hydroxybenzoïques: présent sous forme d'esters ou de glycosides, sont des dérivées de l'acide benzoïque avec une structure de base de type C6-C1.
- Les acides hydroxycinnamiques: sont des dérivées de l'acide cinnamique de structure de type C6-C3 et existent sous forme combinée avec des molécules organiques
- Les coumarines : se dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale (Budic-Leto et Iovric, 2002).

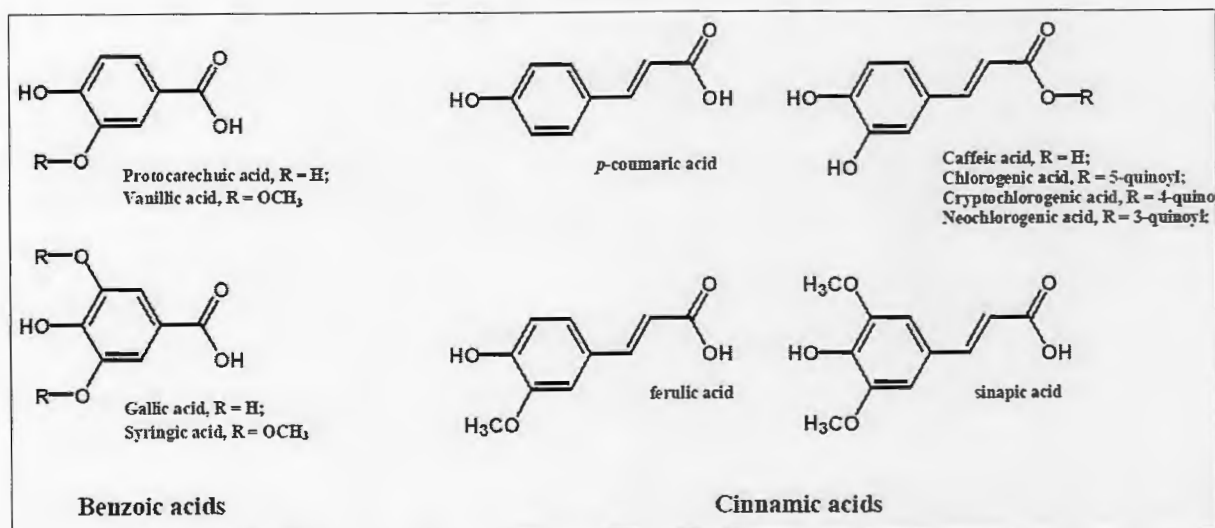


Figure 6. Les structures chimiques des acides phénoliques (Tsao, 2010).

2.3.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent une structure représentée selon le système C6-C3-C6 constituée de deux cycles aromatiques A et B reliés entre eux par une chaîne en C3 formant ainsi un hétérocycle C sur les noyaux de cette structure diphénylpropane des groupements hydroxyles, oxygène, méthyle, ou des sucres peuvent être attachés ce qui contribue à la diversité des structures flavoniques (flavone, flavonol, flavanol, flavanone,...) (Maliseve et Kuntik, 2007).

2.3.3. Les tanins

Les tanins sont des molécules à poids moléculaire relativement élevé, elles possèdent 2 sous groupes; les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les premiers sont des esters de l'acide gallique (gallo et ellagi tannins), et les deuxièmes sont des polymères de polyhydroxyflavan-3-ol monomères (aussi connu proanthocyanidine) (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

2.4. Biodisponibilité des polyphénols

Des études expérimentales réalisées sur des rats, ont démontrés que l'absorption au niveau gastrique des polyphénols est possible pour certaines flavonoides, comme la quercétine mais pas pour leurs glycosides (Passamonti *et al.*, 2005). La plupart des polyphénols sont présents dans les aliments sous forme d'esters, glycosides ou sous forme de polymères qui ne peuvent pas être absorbés qu'après leur hydrolyse par les enzymes intestinales comme la B-glucosidases, et lactase-phlorizin hydrolase, ou par la microflore intestinale (Nemeth *et al.*, 2003).

Tous les flavonoïdes à l'exception de catéchine (flavanol) sont présents dans les plantes sous forme glycosylée seuls les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle, tandis que les glycosides sont hydrolysés tout d'abord en aglycones par l'intermédiaire de la microflore colique qui dispose des enzymes capables de cliver les liaisons β osidiques (Ming, 2007), cette même flore microbienne métabolise en même temps les aglycones libérés.

Les flavonols sont dégradés en acides phénylacétiques et acides phénylpropioniques. Les flavones et les flavanones produisent des acides phénylpropioniques, ces acides sont aussi métabolisés aux dérivés des acides benzoïques.

Des quantités importantes de catéchines polymériques connus sous le nom de proanthocyanidines sont présents dans l'alimentation, des études montrent que les formes dimères et trimères de catéchine sont susceptibles d'être absorbés tandis que les polymères de degré de polymérisation élevé ne peuvent pas être absorbés par la paroi intestinale qu'après leur dégradation (Hollman, 1997).

Après absorption, les polyphénols doivent gagner les différents organes, mais elles ne peuvent pas circuler dans le sang sous leur forme libre pour cela elles se lient aux protéines sériques et plus particulièrement à l'albumine (Dangles *et al.*, 2001). Le foie est largement impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes réabsorbés (Walle, 2004). La muqueuse intestinale et le rein interviennent accessoirement dans ce métabolisme. Les groupements hydroxyles des métabolites générés subissent une conjugaison par l'acide glucuronique, sulfate, ou par la glycine ce qui facilite leur élimination. L'élimination des métabolites de polyphénols se fait par deux voies essentielles d'excrétion, la voie biliaire et la voie urinaire (Hollman, 1997).



Matériel & Méthodes



II. Matériel et méthodes

Notre travail a été effectué au niveau du laboratoire de pharmacologie, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de l'Université de Jijel. Il concerne l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur de la propolis contre la toxicité induite par l'aflatoxine B1.

1. Etude phytochimique de la propolis

1.1. Récolte de la propolis

Quatre échantillons de la propolis ont été recueillis à partir de Kaous, Oudjana, Milia, et Tizi-Ouzou pendant la période du printemps (Avril 2012), et ce par grattage et raclage des parois de la ruche par les apiculteurs.

1.2. Préparation des extraits éthanoliques de la propolis

Selon le protocole décrit par Lahouel *et al.* (2010), les échantillons de la propolis coupés en petits morceaux sont soumis à une extraction par macération dans l'éthanol 96% (20 g de la propolis pour 100 ml de l'éthanol) sous agitation et à l'abri de la lumière pendant 7 jours. Après filtration des macérats sur papier wattman N° 4, une évaporation à sec est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Evaporateur E100, Hei dolph) à 45°C.

Juste après évaporation, les résidus obtenus de chaque échantillon sont pesés pour calculer le rendement d'extraction et ceci selon la formule suivante.

$$\text{Rendement d'extraction en (\%)} = (E_1 / E_0) 100.$$

Avec :

E_1 masse de l'extrait obtenu (g)

E_0 masse de la prise d'essai (g)

1.3. Dosage des polyphénols totaux (TP)

L'estimation du taux des polyphénols totaux est réalisée selon la méthode Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965). L'interaction entre le Folin-Ciocalteu de couleur jaune avec les résidus phénoliques conduit à la formation d'un complexe coloré en bleu dont l'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des polyphénols dans l'extrait. À 500µl de chaque extrait dilué en 1/100^{ème}, 2.25ml d'eau distillée et 250µl du réactif Folin-Ciocalteu (50%) sont ajoutés. Après 5 mn de repos, 2ml de Na₂CO₃ (7.5%) sont additionnés, puis le mélange est incubé pendant 60mn à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, la densité optique (DO) est lue à 760nm en utilisant un spectrophotomètre de type *Ultraspec 100 pro*.

La teneur en composés phénoliques dans les extraits est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (400µg/ml, 200µg/ml, 100µg/ml et 50µg/ml). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de propolis (voir annexe 1 ; figure 1)

1.4. Dosage des flavonoïdes totaux (TF)

Le dosage des flavonoïdes totaux est réalisé selon la méthode de Dewanto *et al.* (2002). 250 µl des différents extraits dilués en 1/1000^{ème} sont mélangés avec 75 µl de NaNO₂ (5%). Après un repos de 6mn, 150 µl d'AlCl₃ (2%) et 500 µl de NaOH (1M) sont ajoutés, le volume est complété par 2.5 ml d'eau distillée, ensuite la DO est lue à 510nm. La teneur en flavonoïdes

totaux est exprimée en milligramme équivalent de la quercétine par gramme de l'extrait, en utilisant une courbe d'étalonnage de la quercétine (25- 200 µg/ml). Tous les dosages sont réalisés 3 fois (voir annexe 1; Figure 2).

1. 5. Analyse par GC\ MS (Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) des extraits éthanoliques

La spectrométrie de masse désigne une méthode d'analyse qui repose sur la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires de l'échantillon analysé, ce qui permet de recueillir des informations sur sa nature, sa composition et même sur sa structure. Le couplage CPG-MS est la technique la plus utilisée dans le domaine des composés phénoliques, il permet de connaître dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (Lavollay et Neumann, 1985).

Une très petite quantité à analyser, sous forme convenable est ionisée, les espèces porteuses de charge électrique qui en résultent sont soumises à l'action d'un champ magnétique et/ou électrique suivant l'appareil. L'étude des trajectoires suivies, dans une enceinte ou règne permet la détermination du rapport masse-charge des ions, donc éventuellement leur nature. Cette méthode détruit le composé à analyser. Le résultat de l'analyse est représenté par un graphe appelé spectre de masse qui représente l'abondance statistique de chaque type d'ion formé, suivant son rapport masse-charge dans l'ordre croissant des masses. La combinaison de ces deux techniques complémentaires, est applicable à l'analyse d'un grand nombre de substances organiques, aussi bien gazeuses que liquides.

Les conditions opératoires sous lesquelles on a travaillé sont : Une colonne apolaire de 25m de longueur et de 0,25mm de diamètre. Le diamètre de la phase stationnaire est de 0,25µm. La température de la colonne 60°C (8min) à 180°C (3°C/min) jusqu'à 230°C (20°C/min), mode d'injection, Split, Split ratio 1: 40, volume injecté d'huile est de 0,6 µl dilué dans l'hexane. Le gaz vecteur est l'Hélium (122,2 Kpa).

1.6. Etude des propriétés anti-radicalaires par le test au DPPH° (2,2-Diphenyl-picrylhydrazyl)

La capacité de piégeage des radicaux libres des extraits éthanoliques est déterminée en utilisant la méthode au DPPH°, comme elle est décrite par Brand *et al.* (1995).

Le principe est basé sur la capacité des extraits à réduire le radical DPPH°. Le DPPH° change sa couleur du violet vers le jaune pâle quand il réagit avec un antioxydant, ce changement de couleur se traduit par une décroissance de l'absorbance en fonction du temps à 515 nm. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité.

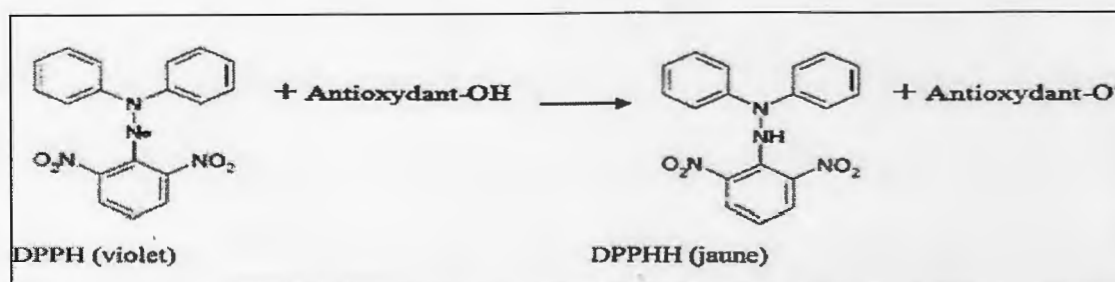


Figure 7. Réduction du DPPH° par un antioxydant (Brand *et al.*, 1995).

La solution du DPPH° est préparée juste avant l'emploi à 10^{-4} M dans l'éthanol (70%). A 0.25 ml de chaque extrait à différentes concentrations, 0.75ml de DPPH° est additionné. Après agitation et incubation pendant 30mn à température ambiante et à l'abri de la lumière, la diminution de la DO est lue à 517nm contre un blanc éthanol.

Le mélange contenant 0.25ml d'éthanol (96%) et 0.75ml de DPPH° est considéré comme contrôle. L'acide gallique et la quercétine sont utilisés comme témoin pour la comparaison de l'effet scavenger de nos extraits aux doses suivantes (200,100 ,50 et 25 µg/ml).

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

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

Dont :

I: Pourcentage d'inhibition.

A_B: Absorbance du contrôle négatif.

A_A: Absorbance de l'échantillon.

Pour calculer les IC50, on détermine l'équation de la droite de régression pour chaque courbe et on calcule pour une inhibition de 50 % la concentration correspondante.

2. Etude *in vivo*

2.1. Entretien des animaux

12 rats *Albinos Wistar* mâles provenant de l'Institut Pasteur, Alger, Algérie ont été divisés en 4 groupes égaux. Ils ont été conservés dans des conditions standard de gestion avec une température de 20-25°C, hygrométrie de 60% et un cycle jour- nuit 12h-12h, avec disponibilité d'alimentation et d'eau.

2.2. Traitement des animaux

Notre travail est consacré à l'étude *in vivo* de l'effet hépatoprotecteur de l'extrait éthanolique de la propolis et de la quercétine contre l'hépatotoxicité induite par l'AFB1. Pour la réalisation de l'étude *in vivo* nous avons choisi la propolis de Kaous.

L'extrait éthanolique de la propolis, la quercétine et l'AFB1 sont administrés aux rats comme suit :

Le premier lot (témoin): les rats reçoivent 1 ml d'eau distillée par voie orale une fois par jour pendant 10 jours, puis une dose unique par voie intrapéritonéale (IP) d'eau distillée.

Le deuxième lot (AFB1): les rats reçoivent 1 ml d'eau distillée par voie orale une fois par jour pendant 10 jours, puis une dose unique IP d'AFB1 1mg/kg dans le 11^{ème} jour.

Le troisième lot (EEP+AFB1): les rats reçoivent une dose de 100 mg/kg/j de la propolis par gavage gastrique pendant 10 jours suivi par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) par voie IP le 11^{ème} jour.

Le quatrième lot (Quercetine +AFB1): les rats reçoivent une dose journalière de 10 mg/kg de la quercétine par gavage gastrique pendant 10 jours, puis une dose unique d'AFB1 1mg/kg en IP.

Dans le 11^{ème} jour, et juste après l'administration d'AFB1 les rats ont été mis dans des cages métaboliques pour la récupération des urines.

2.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du foie

Au 9^{ème} jour après l'administration d'AFB1, les rats ont été sacrifiés, le foie a été prélevé et divisé en trois fractions: la première est plongée dans la solution du KCl sert pour le dosage du MDA, la deuxième dans la solution de TCA (5%) pour le dosage de GSH hépatique cytosolique, la troisième dans le tampon phosphate (0.1M, pH7.4) contenant du KCl (1.17%) et sert pour le dosage de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD,CAT) cytosoliques.

2.4. Prélèvement du sang

Le prélèvement du sang a été réalisé 24h, 48h, et 72h après l'injection d'AFB1 dont le but est d'évaluer sa toxicité en mesurant les variations des paramètres sériques, ainsi pour le dosage de cette mycotoxine et de ses métabolites dans le sang.

Pour cela 3ml du sang sont prélevés à partir du sinus rétro-orbital au niveau de l'œil des rats. Le sang collecté est centrifugé à 4000 rpm pendant 10min. Ensuite le surnageant récupéré est conservé à 4°C. Juste avant l'emploi le surnageant doit être décongelé à la température ambiante.

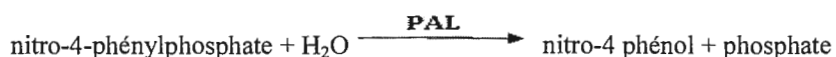
2.5. Paramètres sérique

L'évaluation de la variation du taux des paramètres sériques a été réalisée à l'aide d'un automate (PHD Diam S 2300+) en utilisant des kits (Biomaghreb pour le dosage de la PAL, Spinreact pour les dosages (LDH, TGO, TGP), Biuret pour le dosage des protéines.

2.5.1. La phosphatase alcaline (PAL)

Le principe de ce dosage repose sur la détermination cinétique de l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) selon la méthode recommandée par la société allemande de chimie clinique (DGKG).

On fait agir la phosphatase alcaline (PAL) sur un substrat, le nitro-4-phénylphosphate disodique (PNPP), en milieu alcalin. La réaction d'hydrolyse catalysée par la PAL libère alors du nitro-4-phénol (PNP). Le nitro -4-phénol formé est jaune en milieu alcalin. L'intensité de la coloration après 30 min de contact entre l'enzyme et son substrat, à 37°C est mesurée à 405 nm (Haussamen et al. 1977).



2.5.2. Les protéines totales

Le taux des protéines est mesuré selon la méthode colorimétrique décrite par Gornall *et al.* (1949). Dans une solution alcaline, les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec le cuivre (Cu^{2+}) pour former un complexe coloré dont l'absorbance, proportionnelle à la concentration en protéines dans le spécimen, est mesurée à 550nm. Le réactif Biuret contient du sodium, potassium, tartrate, qui complexe les ions cuivriques et maintient leur solubilité en solution alcaline (Gornall *et al.*, 1949; Tietz, 1995).

2.5.3. Les transaminases (TGO/TGP)

A travers des réactions réversibles, les transaminases catalysent le transfert d'un groupe aminé d'un acide alpha-aminé (l'acide glutamique) à un acide alphacétonique (l'acide oxalacétique et l'acide pyruvique). Cette activité est proportionnelle aux taux des oxalates et pyruvates formés, et mesurée par une réaction avec le 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH) dans une solution alcaline. La densité optique est mesurée à 505 nm (Murray, 1984; Reitman *et al.*, 1957).

1g de foie est coupé et homogénéisé avec 3 volumes de l'acide trichloracétique TCA (5%) à l'aide d'un broyeur de DOUNCE, puis centrifugé à 2000 rpm pendant 15 min. 50 µl du surnageant sont ensuite dilués dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH=8). 20 µl du DTNB (0.01 M) sont ajoutés à 3 ml du mélange de dilution. Après 15 min d'incubation, la lecture de la DO est effectuée à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec le TCA (5%).

Le taux du GSH est déduit à partir d'une gamme étalon de glutathion préparé dans les mêmes conditions que le dosage et les concentrations sont exprimés en millimoles de glutathion par gramme de foie.

2.6.2. Dosage du MDA cytosolique

Le dosage de MDA est réalisé selon la méthode décrite par Okhawa *et al.* (1979). Le MDA réagit avec deux molécules de TBA (acide thiobarbiturique) dans un milieu acide (pH 2-3) et à chaud 100°C pour donner un pigment rose absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques.

1g de foie additionné de 3 ml de la solution de KCL (1,15%) est broyé par un homogénéiseur de DOUNCE. A 0.5 ml de l'homogénat, 0.5 ml de TCA (20%) et 1 ml de TBA (0.67%) sont ajoutés. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 15 minutes, refroidi puis additionné de 4 ml de n-Butanol. Le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 3000 rpm, la DO est effectuée sur le surnageant à 530nm.

Le taux du MDA est déduit à partir d'une gamme étalon préparée dans les mêmes conditions en utilisant une solution du tétraetoxyp propane (TEP) qui donne le MDA après leur hydrolyse.

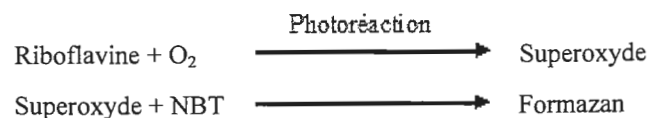
2.6.3. Evaluation de l'activité des enzymes antioxydantes

2.6.3.1. Préparation de la fraction cytosolique

Pour la préparation de la fraction cytosolique, nous avons utilisé la méthode décrite par Iqbal *et al.* (2003). Pour cela, 2g de foie sont coupés et homogénéisés avec 3 volumes du tampon phosphate (0.1M, pH7.4) contenant du KCl à 1.17% à l'aide d'un broyeur de DOUNCE. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2000 rpm pendant 15mn à 4°C pour séparer les débris nucléaires, le surnageant obtenu est centrifugé à 9600 rpm à 4°C pendant 30 mn. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé comme source d'enzymes.

2.6.3.2. Détermination de l'activité enzymatique de la SOD

L'activité enzymatique de la SOD est déterminée selon la méthode de Friedrich et Beauchamp (1971). Cette activité enzymatique dépend de la capacité de l'enzyme à inhiber la réduction du nitroblu-tetrazolium (NBT) par l'anion superoxyde produit suite à la photoréaction de l'oxygène et de la riboflavine en présence d'un donneur d'électron comme la méthionine selon la réaction suivante :



La réduction du NBT par l'anion superoxyde en Formazan a été suivie à 560 nm. Une unité d'activité de la SOD est définie en tant que quantité d'enzyme requise pour empêcher la réduction du NBT par 50%.

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

$\text{SOD UI/ml} = \% \text{ d'inhibition} \times 6,35.$

A 5 μl de la source enzymatique (cytosol), 2 ml du milieu réactionnel composé de cyanide de sodium 10^{-2} M, du NBT $1,72 \times 10^{-4}$ M, d'EDTA 66×10^{-3} M, de riboflavine 2×10^{-6} M, et de méthionine est additionné. Le mélange obtenu est irradié avec une lampe de 15 Watt pendant 10 mn, ensuite la DO est lue à 560 nm et les valeurs ont été exprimées en UI/g de protéine. Le contrôle est préparé dans les mêmes conditions mais sans source enzymatique.

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

L'activité de la catalase a été déterminée selon la méthode décrite par Clairbone (1985). Le principe est basé sur la disparition d' H_2O_2 en présence de la source enzymatique à 25°C . Un mélange constitué de 1 ml du tampon phosphate (KH_2PO_4 0.1M, pH 7.2), 0.950 ml de peroxyde d'hydrogène (0.019M) et 0.025 ml de la source enzymatique est préparé. L'absorbance est mesurée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique est exprimée en UI/g de protéine selon la relation suivante :

$$\text{UI/g de protéine} = (2,3033/T \cdot \text{Log } A_1/A_2)/\text{g protéines}.$$

Sachant que :

A_1 : Absorbance au temps 0 mn.

A_2 : Absorbance après 1 mn.

T : Intervalle de temps en mn.

2.6.3.4. Evaluation de l'activité de la glutathion-S transférase (GST) cytosolique

L'activité de la GST a été déterminée selon la méthode colorimétrique décrite par Habig *et al.* (1974).

L'interaction entre le GSH et le CDNB (1- chloro- 2,4- dinitrobenzene) catalysée par la GST conduit à la formation de dinitrophényle thioéther (GS-DNB). Le taux du complexe formé reflète la quantité du GST active présente (1 μmol de GS-DNB/mn1 pour unité de GST active), qui peut être mesurée par le spectrophotomètre à 340 nm.

Le mélange réactionnel contient 1700 μl du tampon phosphate (0,1 M ; pH 6,5) et 100 μl du CDNB (20 mM).

Après incubation du mélange réactionnel à 37°C pendant 10 min, la réaction est démarrée par l'addition de 100 μl de l'homogénat diluée 1/100 et de 100 μl du glutathion (20mM).

La variation de la densité optique est lue chaque minute pendant 5 min à 340 nm. Le calcul de l'activité de la GST se fait selon la relation suivante :

$$\text{Enzyme (UI/ml)} = [(\Delta A_{340}/\text{min Test} - \Delta A_{340}/\text{min Blanc}) / (V_t) (F_d)] / [(9,6) (V_e)]$$

V_t : volume total (en millilitres) de l'essai ;

F_d : facteur de dilution ;

9,6 : coefficient d'extinction milli molaire du glutathion-1-chloro-2,4-dinitrobenzène conjugué à 340 nm ;

V_e : volume (en millilitre) de l'enzyme utilisée.

$$\text{Units/mg de protéines} = (\text{Units/ ml enzymes}) / (\text{mg protéines / ml enzymes})$$

2.7. Etude histologique

Afin de réaliser l'étude histologique, les échantillons du foie sont coupés en morceaux puis fixés dans du formol 10% pour que les composants des tissus soient préservés. Ensuite pour couper les morceaux fixés en tranches fines, un processus de déshydratation est réalisé, dont les organes sont mis dans des bains successivement plus concentré d'éthanol puis l'éthanol absolu, et puisque l'alcool n'est pas miscible avec la paraffine, les morceaux du foie infiltrés sont baignés dans du xylène pour éliminer l'alcool, ensuite tombés dans des bains de paraffine et laissés se solidifier à froid. Cette méthode permet d'obtenir des coupes d'organes aussi minces que 5µm. Après la réalisation des blocs, des coupes de 5µm d'épaisseur ont été préparées à l'aide du microtome.

Les coupes obtenues sont déparaffinées par le xylène puis réhydratées dans des bains d'éthanol successivement moins concentré, puis dans l'eau, ensuite colorées avec l'hématoxyline et l'éosine, afin de permettre la mise en évidence des noyaux (bleu pourpre) et du cytoplasme (rouge).

Pour observation microscopique des coupes colorées, ces dernières sont montées sur des lames de verre préalablement recouvertes de colle de gélatine pour en assurer l'adhérence, puis recouverte d'une lamelle avant durcissement.

2.8. Traitement des résultats

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous forme de moyenne \pm écartype. Nos résultats sont vérifiés par le test de *student* avec un seuil de signification supérieur à 95% ($p < 0.05$).

($p > 0.05$), effet non significatif ns.

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

($p < 0.01$), désigne un effet très significatif **.

($p < 0.001$), désigne un effet très hautement significatif ***

Résultats

&

Discussion

III. Résultats et Discussion

1. Etude phytochimique

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

Après la récolte de différents échantillons, on a remarqué que les échantillons ont des couleurs différentes (*Propolis Kaous* : marron, *Propolis d'El-Milia* : noir, *Propolis d'Oudjana* : marron foncé, *Propolis de Tizi-Ouzou*, noir). Cette variabilité de couleur est la conséquence d'une composition chimique différente. Les différents échantillons possèdent également des odeurs un peu différentes.

Après évaporation à sec des extraits nous avons pris le poids de l'extrait sec de chaque échantillon afin de calculer le rendement. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2. Rendement d'extraction des extraits éthanoliques de la propolis des quatre régions.

Les échantillons	Poids de la propolis (g)	Poids sec de l'extrait éthanolique (g)	Rendement d'extraction(%)
EEP kaous	66	15.96	24.18%
EEP Milia	25	5.4	21.6%
EEP Oudjana	9	2.04	22.68%
EEP Tizi-Ouzou	30	7.19	26.36%

On constate que le rendement des extraits éthanoliques diffère d'un extrait à l'autre selon les régions. L'extrait de la propolis de Tizi-Ouzou présente le meilleur rendement (26.36%), suivi par la propolis de kaous (24.18%), la propolis d'Oudjana (22.68%) et enfin celle d'El-Milia avec un rendement de 21.6%.

La quantité des composés phénoliques des différents extraits éthanoliques de la propolis, exprimée en mg EAG/g de propolis, est illustrée dans le tableau 3 et la figure 9.

Tableau 3. Teneur en polyphénols dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent acide gallique/g de propolis (mg EAG /g).

	EEP Kaous	EEP Milia	EEP Oudjana	EEP Tizi-Ouzou
Concentration (mg EAG/ g de propolis)	253.6± 2.51	117.6± 2	138.6± 2.30	151.6± 3.21

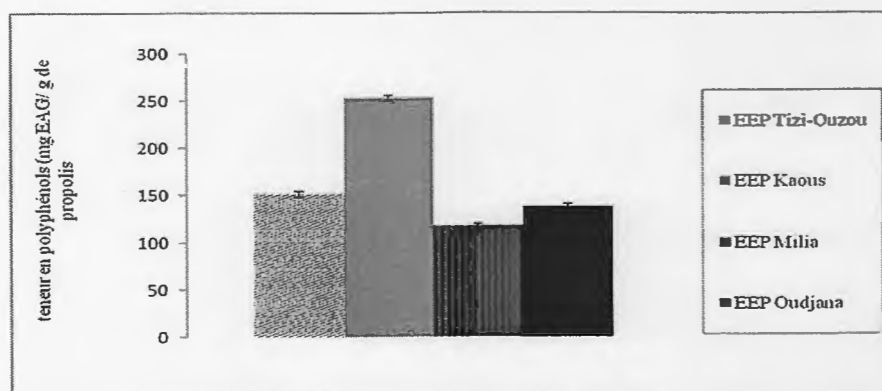


Figure 9. Teneur en polyphénols dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent acide gallique/g de propolis (mg EAG /g).

On constate que les teneurs en polyphénols diffèrent d'un extrait à un autre selon la région de provenance de chaque la propolis. La propolis de Kaous présente la teneur la plus élevée en polyphénols (253.6 ± 2.51 mg EAG /g) suivie par l'extrait de *Tizi-Ouzzou* (151.6 ± 3.21 mg EAG /g). La concentration polyphénolique la plus faible est enregistrée avec l'extrait d'El-Milia, une teneur moyenne est enregistrée avec la propolis d'Oudjana.

D'après les résultats obtenus, la teneur en polyphénols totaux des différents échantillons est très variable d'une région à l'autre, ceci est expliqué par l'influence des facteurs environnementaux sur la synthèse et l'accumulation de ces composés phénoliques.

Comparant ces résultats, on constate que les taux enregistrés dans notre étude avec tous les échantillons sont plus bas que ceux obtenus par (Kebsa *et al.*, 2006) avec la propolis de Kaous (370 mg éq quercétine/g de l'extraits brut, ceci peut être expliqué par l'effet de la saison.

La teneur en polyphénols totaux de la propolis Brésilienne est de l'ordre de 232 ± 22.3 mg EAG/g, (Alencar *et al.*, 2007). Cette valeur est en accord avec celle trouvée dans la propolis de Kaous (253.6 ± 2.51 mg EAG/g). L'étude réalisée sur la propolis de la Chine indique des résultats semblables aux résultats obtenus dans notre étude, ces teneurs en composé phénoliques oscillent entre 85 ± 2 mg EAG/g et 228 ± 8 mg/g de propolis (Mok-Ryeon *et al.*, 2007).

L'étude réalisée par Ferhoum (2010) montre des teneurs en polyphénols totaux passant de 11.53 ± 0.6 mg EAG/g à 310.37 ± 0.163 mg EAG/g. Les teneurs en polyphénols trouvés pour la propolis de Dellys et Isser sont 135.37 ± 0.16 mg EAG/g et 100.57 ± 1.27 mg EAG/g respectivement. Ces résultats sont en corrélation avec ceux trouvés pour El-Milia (117.6 ± 2 mg EAG/g) Tizi ouzou (151.6 ± 3.21 mg EAG/g) et Oudjana (138.6 ± 2.30 mg EAG/g). De même la teneur en polyphénols trouvée pour Kaous (253.6 ± 2.51 mg EAG/g) est en forte corrélation avec celle trouvée pour Yakouren (254.30 ± 3.30 mg EAG/g), et en corrélation avec la propolis Saharienne (247 ± 3.80 mg EAG/g) et la propolis de Laghouat (241.2 ± 3.25 mg EAG/g).

Les flavonoïdes constituent la classe la plus abondante des polyphénols dans la nature. Le principe de leur dosage repose sur la propriété de ces composés à chélater les ions aluminiums en donnant un complexe coloré en jaune dont l'intensité de la coloration est proportionnelle avec la concentration des flavonoïdes dans l'extrait.

Le tableau 4 et la figure 10 expriment les teneurs en flavonoïdes des différents extraits éthanoliques de la propolis exprimée en mg EQ/g de propolis.

Tableau 4. Teneur en flavonoïdes dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent Quercétine/g de propolis (mg EQ /g).

	EEP Kaous	EEP Milia	EEP Oudjana	EEP Tizi-Ouzou
Concentration (mg EQ/ g de propolis)	70 ± 5.77	60 ± 10	60 ± 7.07	100 ± 5.77

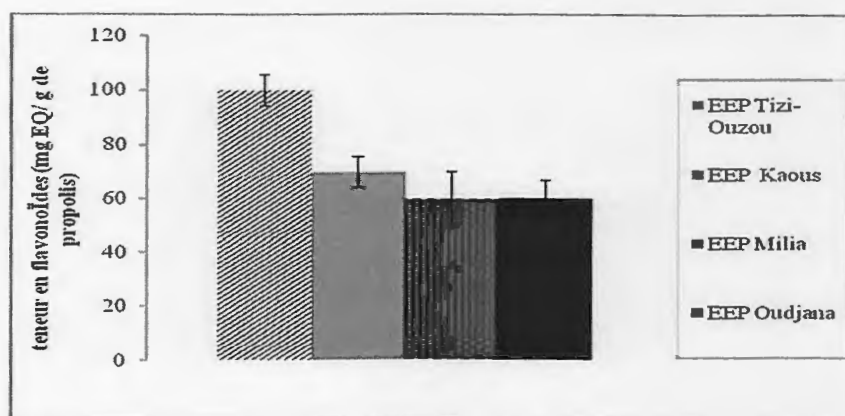


Figure 10. Teneur en polyphénols dans les différents échantillons de propolis en mg équivalent acide gallique/g de propolis (mg EAG /g).

Les résultats montrent que la propolis de Tizi-Ouzou est la plus riche en flavonoïdes (100 ± 5.77 mg EAG /g), suivie par celle de Kaous. Les extraits d'El-Milia et d'Oudjana ont la même teneur en flavonoïdes ($P > 0.05$).

Une étude réalisée par (Kartal et al., 2002) confirme que la teneur en flavonoïdes totaux ainsi que la quantification des flavonoïdes peut être très utile pour différencier entre les échantillons de la propolis.

La teneur en flavonoïdes de la propolis de Mitidja (103.48 ± 0.28 mg EQ/g) trouvée par Ferhoum (2010) est conforme avec la teneur en flavonoïdes de la propolis de Tizi ouzou (100 ± 5.77 mg EQ/g). Cette variation observée dans la teneur des différents extraits de la propolis en polyphénols et en flavonoïdes dépend essentiellement de l'origine de la propolis, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, et la durée de conservation.

Nous avons réalisés la GC-MS de 3 extraits seulement (la propolis de kaous, propolis d'El-Milia et la propolis d'Oudjana). Les résultats sont représentés dans les spectres des figures 11, 12, 13, respectivement.

On constate que tous les échantillons contiennent des flavonoïdes, des acides phénoliques, acides aliphatiques, terpènes, alcools, esters, huiles essentielles, dont les types varient d'un extrait à l'autre. La banque de données est incomplète pour cela il y a beaucoup de molécules qui ne sont pas identifiées.

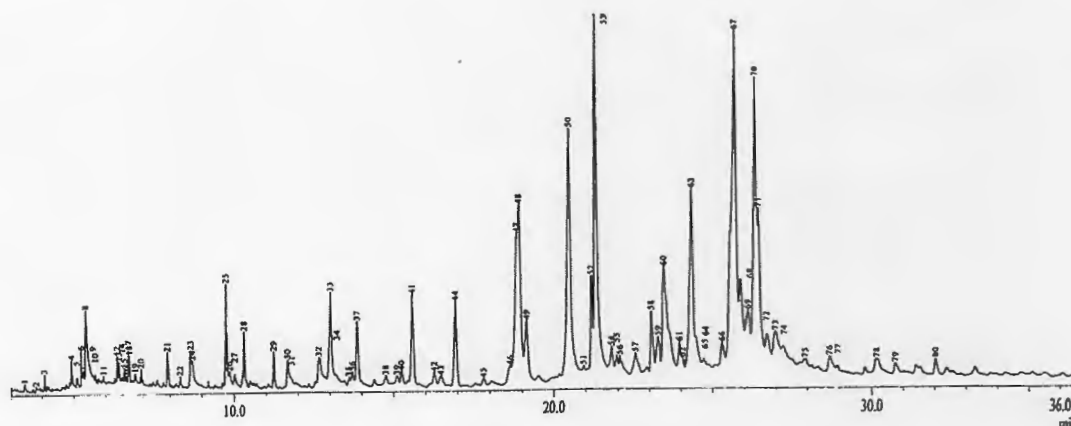


Figure 11. GC-MS de l'extrait éthanolique de la propolis d'Oudjana.

La propolis de Oudjana contient des flavonoïdes (La naringenin 8.68%, Pinostrobin chalcone 4.56%, Chrysin 9.33%, 4-ethyl cathécol 0.24%), des acides phénols (dimethoxycinnamic acide 0.90%, p-hydroxycinnamic acid 0.73%), des acides gras (acide oleique 2.33%). Cette propolis est caractérisée essentiellement par sa richesse en terpènes et sesquiterpènes (tridecène 0.41%, pentadécène 0.94%, cedrol 0.56%, tau cadenol 0.19%, alpha bisabolol 0.28%, veridiflorol 0.89%, lanceol 0.41%, gamma-elemene 0.30%,...). La composition chimique détaillée est représentée dans le tableau 3 (annexe 2).

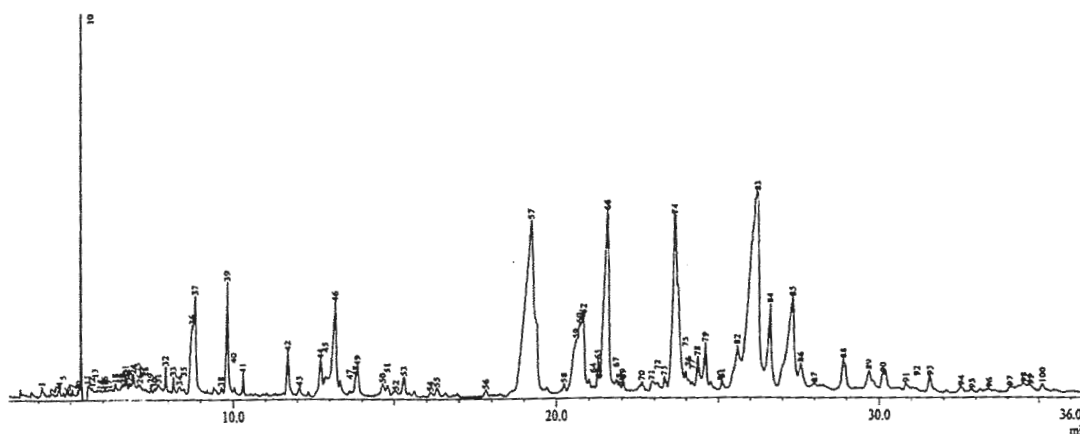


Figure 12. GC-MS de l'extrait éthanolique de la propolis de Kaous

La propolis de Kaous contient des Flavonoïdes (2-Methoxy-4-vinylphenol 0.39%, Tectochrysin 5.64%, Chrysin 6.34%, Naringenin 0.24%), Acides phénols (p-Hydroxycinnamic acid 0.36%,...), des terpènes (Retinol, acetate 0.24%), des esters (Cinnamyl cinnamate 0.27%). Cette propolis est riche en acides gras. La composition chimique détaillée est représentée dans le tableau 1 (annexe 2).

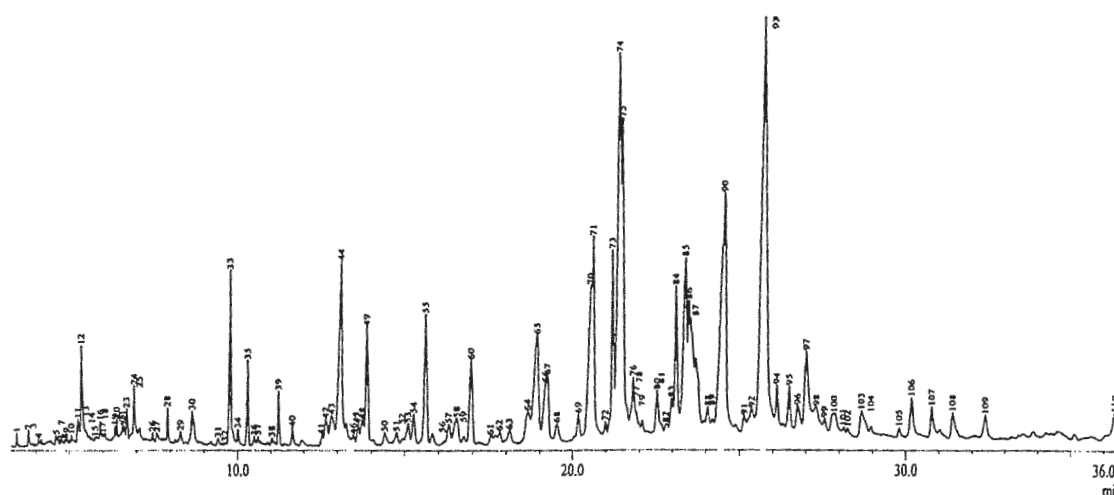


Figure 13. GC-MS de l'extrait éthanolique de la propolis d'El-Milia

La propolis d'El-Milia est composée de Flavonoïdes (Pinostrobin chalcone 2.11%, Naringenin 0.14%, Galangin 1.54%, Chrysin 8.24%), Diterpénoïde (kauran-18-al, 17-acetyloxy)-, (4.beta)- 0.21%) ; Sesquiterpènes (Cedrol 0.42%), en plus des acides aliphatiques,

aromatiques, des alcools et des esters. La composition chimique détaillée est représentée dans le tableau 2 (annexe 2).

La GC-MS a montré que les échantillons possèdent des acides aliphatiques tels que les acides gras, des huiles essentielles (*beta-pinene, alpha cubebene, valencene, ...*), des acides phénols (ac.cinnamique, coumarique, ac cafeique), des alcools, des esters et des flavonoïdes (*pinocembrin chalcone, naringénine et techtochrysine*) dont les types de chaque classe et leur pourcentage sont différents selon les régions. Ces variations peuvent être expliquées par l'influence de la situation géographique, et les conditions climatiques, comme la température, la précipitation, la composition du sol..., qui peuvent influencer la composition chimique des différents échantillons de propolis.

On constate que tous les échantillons contiennent de la naringénine comme flavonoïde, ceci est expliqué par la présence commune d'une espèce de plante dans la flore des sites étudiés comme source de ce composé. On constate donc une variabilité importante qualitativement et quantitativement ce qui prouve l'effet de l'origine botanique sur la composition chimique et confirme les résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes. En Algérie, les études montrent que selon la flore botanique disponible, la propolis Algérienne est d'origine soit du pin (*Pinus sp*) qui occupe les zones semi arides, le chêne (chêne liège et chêne zeen) qu'on trouve au nord du pays, châtaignier, cyprès (*Cupressus sp*), Casuarina et le peuplier (*Populus sp*) (Moudir, 2005).

Le tableau 5 et la figure 14 montrent les variations de l'effet scavenger de l'extrait éthanolique des quatre échantillons de la propolis, de l'acide gallique et de la quercétine à différentes concentrations molaires vis-à-vis le radical DPPH°.

Tableau 5. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des différents extraits éthanoliques de la propolis à différentes concentrations vis-à-vis le radical libre DPPH°.

	25µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	Ic ₅₀
EEP Tizi ouzou	30,76± 5.59	41,02± 5.65	65,38± 1.99	74,35± 4.60	40.63±0.32
EEP Kaous	39,74± 2.72	53,84± 9.97	56,41± 7.51	64,1± 0.90	31.45± 0.12
EEP Milia	35,89± 9.97	52,56± 6.45	71,79± 2.71	74,35± 4.53	34.82±1.02
EEP Oudjana	37,17± 0.90	48,71± 7.23	56,41± 6.67	65,38± 2.71	33.62±0.61
Quercétine	24,35± 2.97	31,42± 1	35,71± 1.01	42,85 ± 6.05	51.35±2.12
L'acide gallique	28,58± 2	37,14± 1.01	41,42± 2.01	47,14 ± 11.63	43.74±2.02

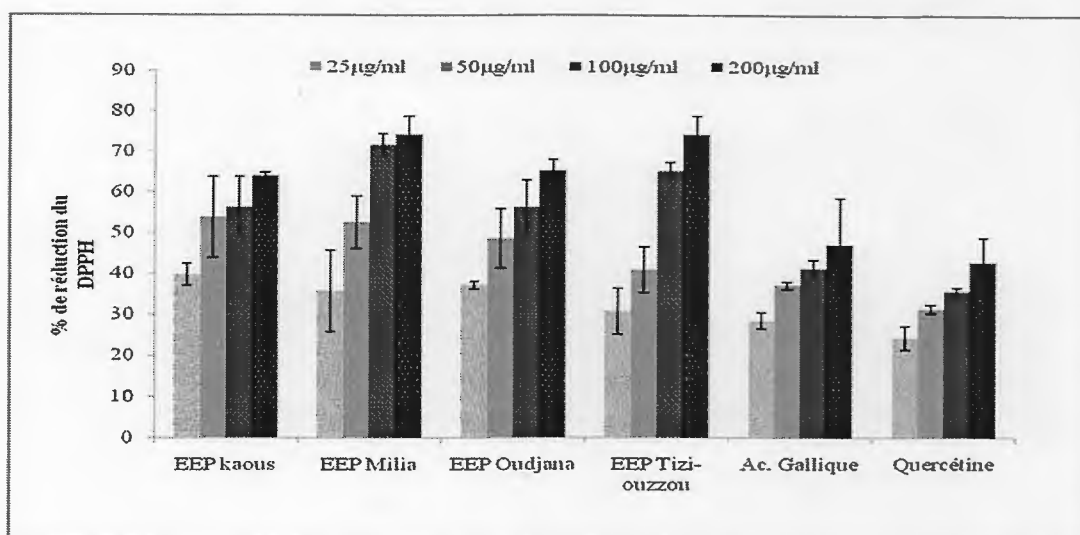


Figure 14. Evaluation de l'activité anti-radicalaire des différents extraits éthanoliques de la propolis à différentes concentrations vis-à-vis le radical libre DPPH°.

En se basant sur le pourcentage de réduction du DPPH°, on a évalué le pouvoir antiradicalaire des différents extraits de la propolis aux concentrations de 25, 50, 100 et 200 µg/ml. On a enregistré un effet anti-radicalaire concentration dépendant avec les quartes extraits de propolis, le même résultat est enregistré avec la quercétine et l'acide gallique. L'acide gallique a donné un effet mieux que celui obtenu avec la quercétine. A la concentration de 200 µg/ml, la propolis de Tizi-Ouzzou et de Milia ont la même activité anti-radicalaire ($P > 0.05$), de même pour les extraits d'Oudjana et de Kaous. Les IC_{50} obtenues avec nos extraits sont mieux que celles des molécules pures. Selon les IC_{50} on peut conclure que la propolis de Kaous a le meilleur effet scavenger avec une IC_{50} de 31.45 ± 0.12 µg/ml.

On a remarqué que tous les extraits ont donné un effet très puissant et concentration dépendant mieux que celui des standards. Ce ci est expliqué par le fait que les composés phénoliques ont la capacité à réduire et à décolorer le DPPH° à cause de leur pouvoir à céder des protons. Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus par (Kebsa *et al.*, 2006) avec la propolis de Kaous.

2. Etude *in vivo*

L'évaluation de l'effet hépatoprotecteur de la propolis contre la toxicité induite par l'AFB1 a été effectué on se basant sur des paramètres sériques, des paramètres du stress oxydant et enfin l'évaluation des variations histologiques.

2.1. Dosage des paramètres sériques

Les paramètres sériques évalués sont: TGO, TGP, PAL, LDH, protéines totaux et Bilirubine.

Les variations des taux de TGO dans le sérum des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou la quercétine 24h, 48h et 72h après l'injection de l'AFB1 sont regroupées dans le tableau 6 et illustrées dans la figure 15.

Tableau 6. Variations des taux de TGO en UI/L dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	24h	48h	72h
Témoin	211± 5.65	213± 13.43	207.5± 3.53
AFB1	214± 8.48 a*	216± 16.97 a*	229± 0.70 a**
EEP+AFB1	196± 67.64 b*	141,5± 24.74 b***	158± 5.65 b***
Quercétine+ AFB1	191± 2.82b*	162,5± 17.67b**	176,5± 4.94b***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type UI/L. Test de student: (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis-à-vis du: a- groupe témoin, b-groupe AFB1.

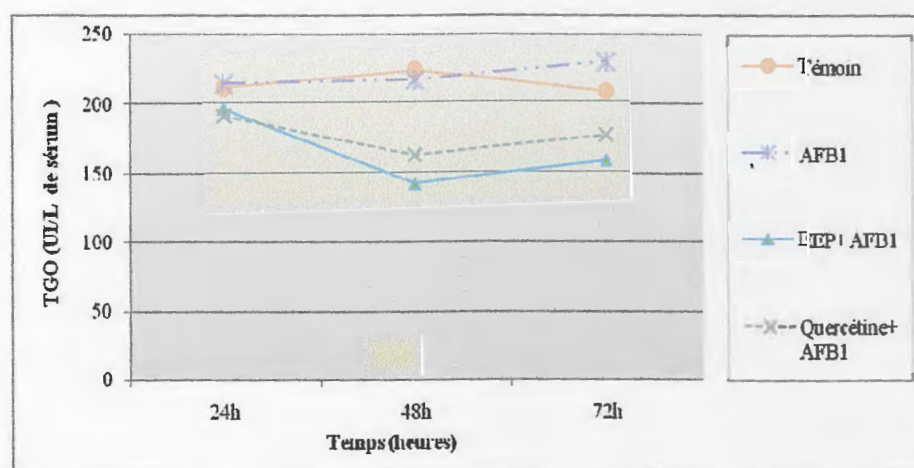


Figure 15. Variations des taux de TGO dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

On constate une augmentation significative des taux de TGO des rats traités par l'AFB1 par rapport à ceux obtenus chez le témoin. Cette augmentation est significative ($P < 0,05$) à 24h, 48h, et très significative ($P < 0,001$) à 72h.

Pour les rats prétraités par l'EEP, une diminution significative ($P < 0,05$) par rapport aux rats traités par l'AFB1 seule est constatée 24h après l'injection. Cette diminution est hautement significative ($P < 0,001$) 48h après l'injection, après 72h une petite augmentation dans les taux de TGO est constatée, mais elle est toujours moindre de façon hautement significative ($P < 0.001$) (158 ± 5.65) par rapport à celle des rats traités par l'AFB1 (229 ± 0.70). Les mêmes variations sont obtenues chez les rats prétraités par la quercétine, l'effet de la propolis est mieux que celui de la quercétine.

Les variations des taux de TGP dans le sérum des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou la quercétine, et ceci à 24h, 48h, et 72h après l'injection d'AFB1, sont démontrées dans le tableau 7 et la figure 16 ci-dessous.

Tableau 7. Variations des taux de TGP dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	24h	48h	72h
Témoin	56± 1.41	60.5± 4.94	55± 11.31
AFB1	60± 1.41a*	70.5± 2.12a**	80± 5.65a***
EEP+ AFB1	62± 5.65b ns	54± 0.70b***	51± 2.82b***
Quercétine+ AFB1	52,5± 3.53b**	51,5± 7.77b***	54,5± 28.99b***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student: (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis: a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

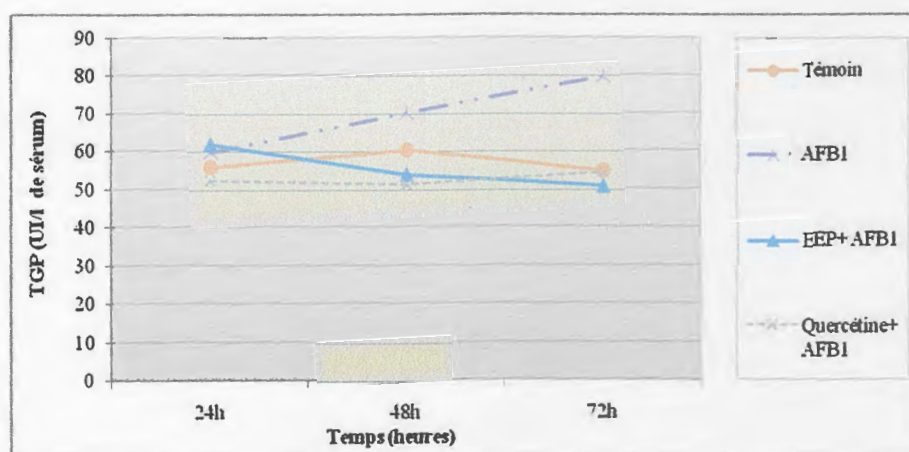


Figure 16. Variations des taux de TGP dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

L'évaluation des taux de TGP dans le sérum des rats traités par l'AFB1 a révélé des niveaux successivement croissants en fonction du temps. Cette élévation est significative ($p < 0.05$) après 24h, très significative ($p < 0.01$) après 48h et hautement significative ($p < 0.001$) après 72h de l'injection d'AFB1 et ceci par rapport aux rats témoins.

Pour les rats prétraités par l'EEP, on constate qu'après 24h le taux de TGP est supérieur à celui des rats traités par l'AFB1. Après 48h, le taux a significativement diminué ($p < 0.001$) (54 ± 0.70 UI/l) par rapport à celui des rats traités par l'AFB1, cette diminution successive a persisté jusqu'au 72h de l'injection IP d'AFB1. Concernant les rats prétraités par la quercétine, on constate que le taux de TGP est significativement inférieur à celui des rats traités par l'AFB1 et ceci durant les trois temps de prélèvements.

La figure 17 et le tableau 8 illustrent les variations des taux du PAL dans le sérum des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine et ceci à 24h, 48h, et 72h après l'injection IP d'AFB1.

Tableau 8. Variations des taux du PAL dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	24h	48h	72h
Témoin	222,5± 55.86	175± 42.42	167,5± 38.89
AFB1	248,66± 46.36a*	261± 42.42a**	231,5± 13.43ab**
EEP+ AFB1	171,5± 38.89b***	183,5± 55.86b***	173,5± 13.43b***
Quercétine+ AFB1	200± 83.44b**	183,5± 45.96b***	181,5± 20.50b***

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis: a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

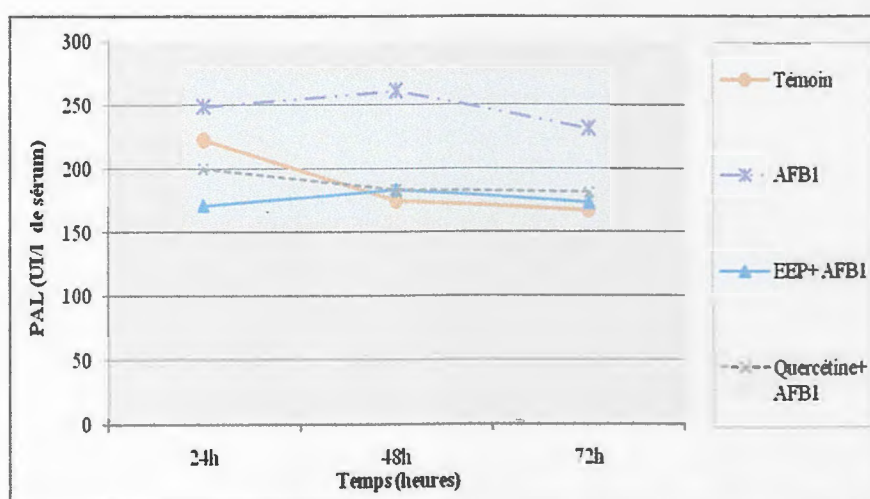


Figure 17. Variations des taux du PAL dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

En fonction du temps on constate une augmentation successive du taux de PAL des rats traités par l'AFB1 par rapport à celui des témoins, le pic est obtenu après 48 heures de traitement.

Chez les rats prétraités par l'EEP ou la quercétine une diminution hautement significative ($p < 0.001$) de PAL a été observée durant les trois temps par rapport aux rats traités par l'AFB1 les valeurs sont comparables ($P > 0.05$) à ceux obtenues avec les rats témoins non traités.

La figure 18 et le tableau 9 ci-dessous représentent les variations du taux de LDH dans le sérum des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine et ceci à 24h, 48h, et 72h après l'injection IP d'AFB1.

Tableau 9. Variations des taux du LDH dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	24h	72h
Témoin	1086± 85.50	1150± 140
AFB1	3360± 60a***	3218± 318a***
EEP+ AFB1	1553± 48.13b***	1721± 221b***
Quercétine+ AFB1	2796± 76.73b**	2778± 278b**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis: a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

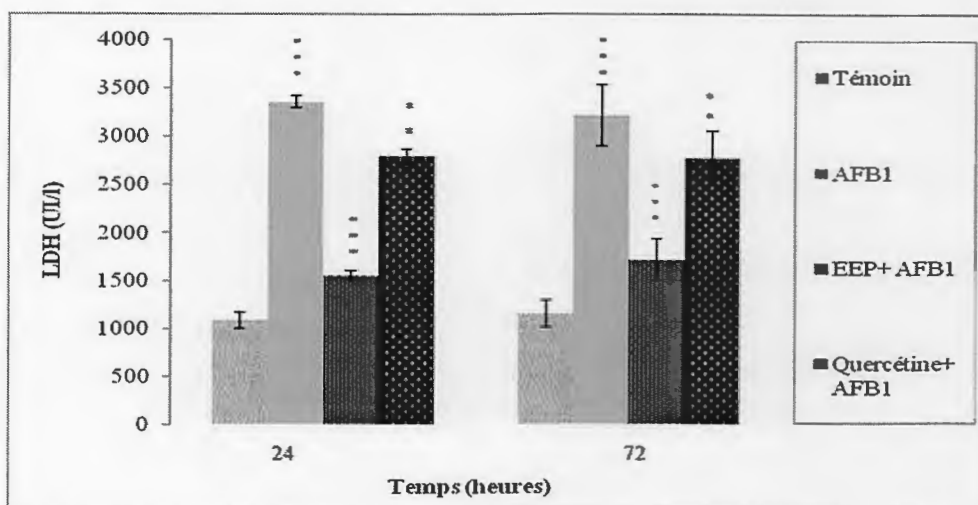


Figure 18. Variations des taux du LDH dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

Chez les rats traités par l'AFB1, une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) du taux de la LDH a été observée 24h et 72h après le traitement, ces taux atteignent 3360 ± 60 UI/l contre 1086 ± 85.50 UI/l seulement chez le témoin après 24 heures. Les taux de la LDH ont été diminués de façon hautement significative ($p < 0.001$) chez les rats prétraités par l'EEP et par la quercétine. L'effet de la propolis est mieux ($p < 0.01$) que celui de la quercétine.

La figure 19 et le tableau 10 illustrent les variations de la concentration des protéines totales dans le sérum des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine et ceci à 24h, 48h, et 72h après l'injection IP d'AFB1.

Tableau 10. Variations de la concentration des protéines sériques des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	24h	48h	72h
Témoin	83 ± 0.70	82 ± 2.82	80 ± 0.70
AFB1	66 ± 1.41a**	64,5 ± 2.12a**	64 ± 0.70a**
EEP+ AFB1	68,5 ± 2.12b*	74 ± 11.31b**	77,5 ± 4.94b**
Quercétine+ AFB1	76 ± 8.48b**	82 ± 2.82b**	70 ± 12.02b**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis: a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

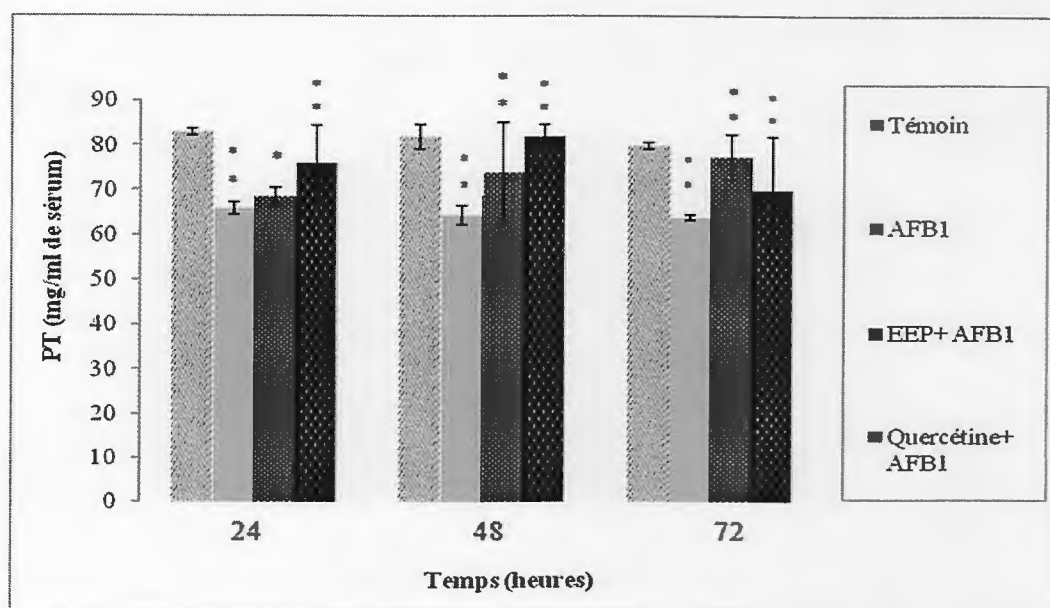


Figure 19. Variations de la concentration des protéines sériques des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

Par comparaison aux rats témoins, une diminution très significative ($p < 0.01$) de la des protéines totales est constaté chez les rats traités par l'AFB1 (66 ± 1.41 mg/ml à 24h contre 83 ± 0.70 mg/ml chez le témoin non traité). Par contre, une augmentation très significative ($p < 0.01$) de ces protéines est observée chez les rats prétraités par l'EEP et la quercétine par rapport aux rats traités par l'AFB1. Les taux de protéines se normalisent autours des valeurs normales du témoin sous l'effet des deux extraits.

La bilirubine représente le produit final de la dégradation de l'hémoglobine. Les variations du taux de la bilirubine dans le sérum des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine et ceci à 24h, 48h, et 72h après l'injection IP d'AFB1, sont illustrées dans la figure 18 et le tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11. Variations des taux de la bilirubine dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	24h	48h	72h
Témoin	1.79 ± 0.32	1.83 ± 0.29	1.80 ± 0.41
AFB1	$2.04 \pm 0.29a^{**}$	$2.91 \pm 0.90a^{***}$	$4.08 \pm 0.83a^{***}$
EEP+ AFB1	$1.85 \pm 0.31b^*$	$1.98 \pm 0.3b^*$	$2.31 \pm 0.92b^{**}$
Quercétine+ AFB1	$1.83 \pm 0.23b^*$	$1.94 \pm 0.2b^*$	$2.48 \pm 0.37b^{**}$

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis: a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

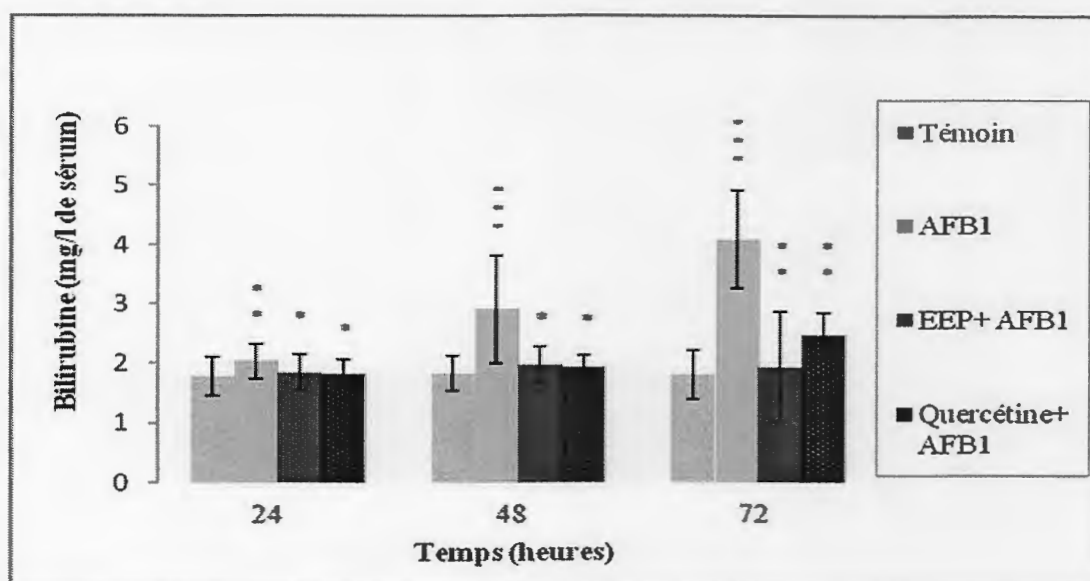


Figure 20. Variations des taux de la bilirubine dans le sérum des rats traités par une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

Pour les rats traités par l'AFB1, on constate une augmentation très significative ($p < 0.01$) du taux de la bilirubine (2.04 ± 0.29 mg/l) par rapport à celui du témoin (1.79 ± 0.32 mg/l). Cette augmentation atteint 4.08 ± 0.83 mg/ml après 72h. En ce qui concerne les rats prétraités par l'extrait éthanolique de la propolis (EEP), on a constaté un retour aux valeurs normales durant les trois prélèvements. Les mêmes observations sont constatées pour les rats prétraités par la quercétine à 24 et à 48 heures.

Dans les situations normales, les enzymes TGO, TGP, PAL, LDH, et bilirubine sont localisées au niveau du cytoplasme cellulaire, mais suite à des lésions ou à des nécroses cellulaires, elles seront libérées dans le plasma (Plaa et Hewitt, 1986). Une élévation significative de ces paramètres a été constatée chez les rats traités par l'AFB1. Nos résultats sont en accord à ceux de plusieurs auteurs (Plaa et Hewitt, 1986; Wang *et al.*, 1991; Souza *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2002; Abdel-Wahhab et Aly, 2003; Preetha *et al.*, 2006).

Il semble bien que l'EEP et la quercétine ont des effets hépatoprotecteurs contre les dommages induits par l'AFB1, ceci est illustré par la diminution du taux de ces enzymes et par l'augmentation du taux des protéines dans le sérum des rats prétraités par l'EEP et la quercétine. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par El-shoaki *et al.* (2011), qui ont démontré que le traitement des rats par la propolis a diminué le taux de TGO et TGP dans le sérum. Une autre étude réalisée par Souza *et al.* (1999) démontre que les flavonoïdes tannatins sont capables de réduire avec environ 90% l'activité des transaminases dans le sérum des rats.

La stabilisation du taux de TGO et TGP activée par l'ingestion de la propolis indique la présence d'une amélioration dans le statut fonctionnel des cellules hépatiques, cette amélioration peut être attribuée à la capacité de piégeage des ROS par la propolis. Ces résultats assurent que la propolis sous sa forme intacte ou sous forme d'extrait, peut protéger le foie contre les facteurs d'endommagement incluant les mycotoxines (El-shoaki *et al.*, 2011). Il est noté que les rats prétraités par la propolis ont une activité enzymatique moindre par rapport à celle des rats témoins, ce qui indique que la propolis est efficace sur les différents types d'inflammations.

pouvant affectées le foie. Cette propriété anti-inflammatoire a été rapportée précédemment par Teixeira *et al.* (2008).

2.2. Détection de l'AFB1 dans le sérum et les urines

Selon la littérature, le dosage d'AFB1 et de ses métabolites dans le sérum et les urines est un marqueur important pour l'évaluation de l'hépatotoxicité de cette mycotoxine. On a fait passer d'abord l'AFB1 pure (1 µg /ml) pour obtenir le temps de rétention de cette molécule. L'AFB1 a un temps de rétention autour de 6. D'après les chromatogrammes obtenus en HPLC, on a pu détecter de l'AFB1 dans les sérums (figure 20) des rats traités par l'AFB1 seule, l'association avec l'EEP ou la quercétine permet de diminuer le taux d'apparition, cela est probablement due à la complexation de l'AFB1 par les constituants de la propolis. Ainsi on a constaté l'apparition d'autres molécules qui peuvent être des métabolites de l'AFB1 ou de ses adduits avec l'ADN ou l'albumine,... . Par manque de molécules pures de qualité analytique on n'a pas pu identifier ces métabolites. Au niveau des urines, il n'y a pas d'AFB1 inchangé mais apparition des molécules ayant un temps de rétention entre 0 et 2mn dans les urines des rats traités par l'AFB1 seule ou en association avec les molécules bioactives (figure 22). Ces molécules sont probablement des métabolites ou des conjugués hydrosolubles de l'AFB1.

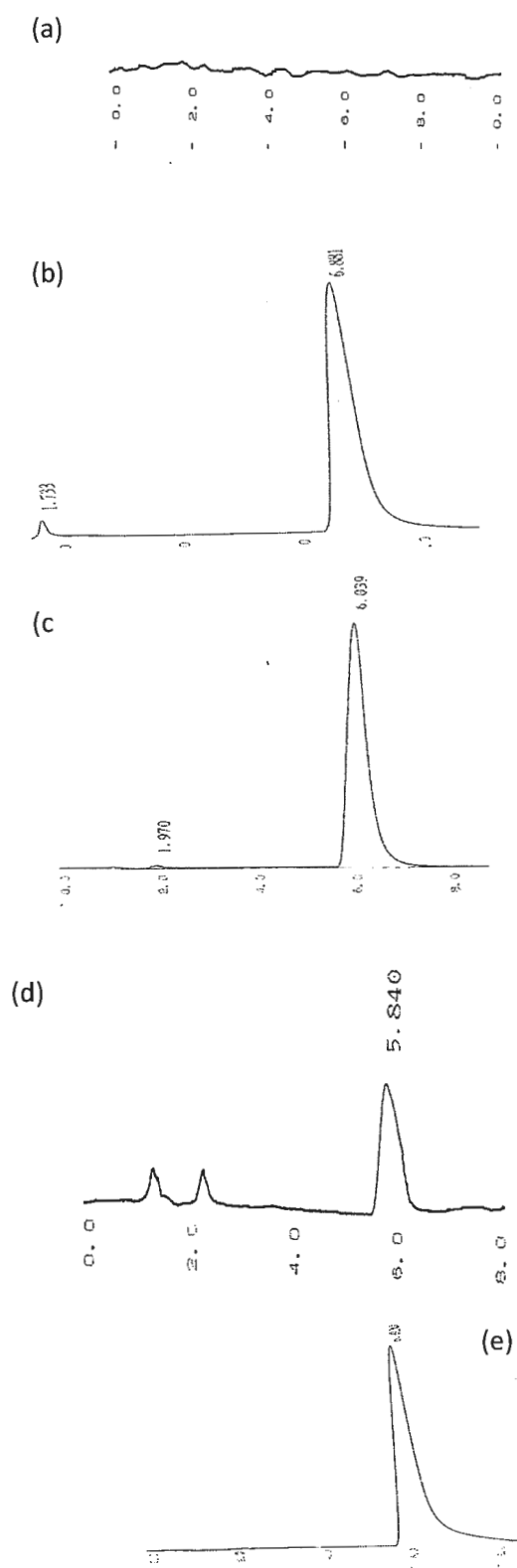


Figure 21. Détection de l'AFB1 dans le sérum des rats recevant:

- (a) Eau distillée (témoin). (b) AFB1. (c) EEP+AFB1.
(d) Quercetine+AFB1. (e) Control positif (AFB1 pure à la Concentration de 1mg/ml).

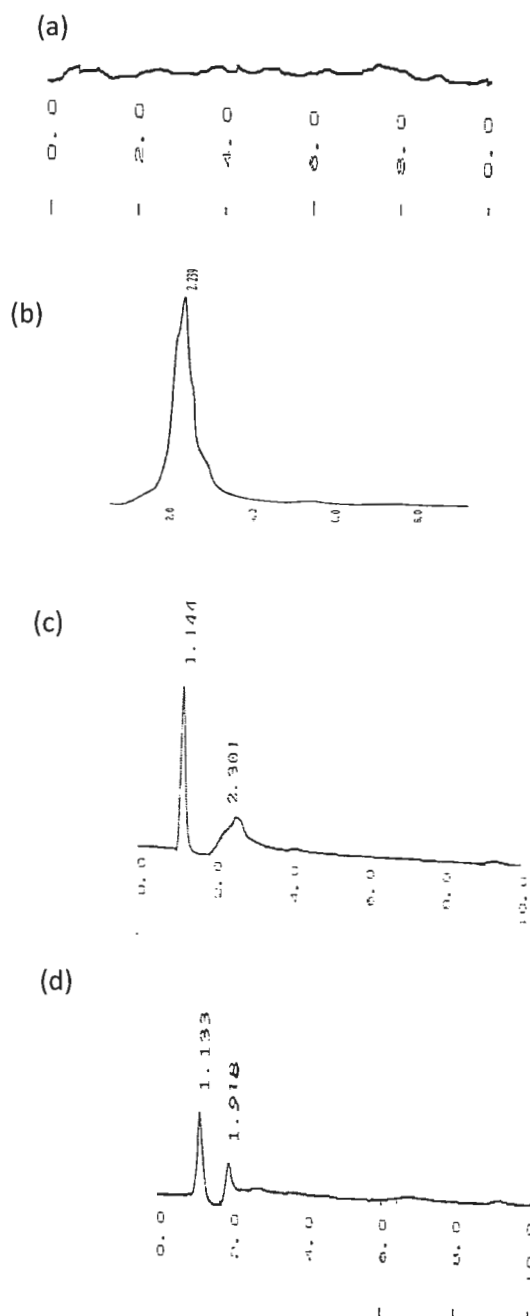


Figure 22. Détection de l'AFB1 dans les urines des rats recevant:

- (a) Eau distillée (témoin). (b) AFB1. (c) EEP+AFB1.
(d) Quercetine+AFB1. (e) Control positif (AFB1 pure à la Concentration de 1mg/ml).

2.3. Dosage tissulaire

Les variations du taux du GSH des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine sont représentées dans le tableau 12 et la figure 21 ci-dessous.

Tableau 12. Variations des taux de GSH cytosolique hépatique après administration IP d'AFB1 (1mg/kg), administration orale de l'EEP (100mg/kg/jr), et la quercétine (10 mg/kg/jr).

	Témoin	AFB1	EEP+AFB1	Quercétine+AFB1
GSH (mM/g de tissu)	7,44±0,127	2,01±0,091a***	8,83±0,021b***	5,24±0,558b*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis: a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

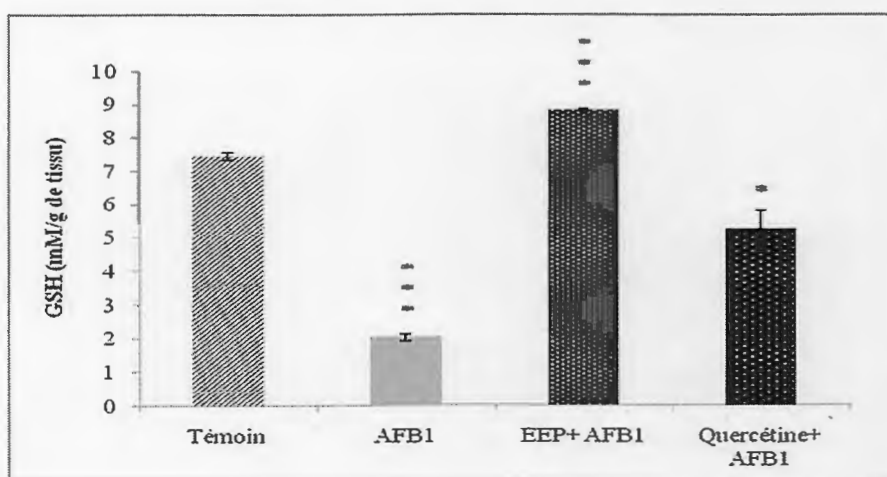


Figure 23. Variations des taux de GSH cytosolique hépatique après administration IP d'AFB1 (1mg/kg) seule, en association avec l'EEP (100mg/kg/jr), ou avec la quercétine (10 mg/kg/jr).

Les rats traités par l'AFB1 subissent une diminution hautement significative ($p < 0.001$) de GSH qui atteint $2,01 \pm 0,091$ mM/g de tissu, avec $7,44 \pm 0,127$ mM/g de tissu chez le groupe témoin. Alors que le taux du GSH varie de façon hautement significative ($p < 0.001$) chez les rats prétraités par la propolis ($8,83 \pm 0,021$ mM/g de tissu) et de façon significative ($p < 0.05$) chez les rats prétraités par la quercétine par rapport aux rats traités par l'AFB1.

On constate une augmentation de 15.75% de GSH des rats prétraités par l'EEP, avec une diminution de 29.57% chez les rats prétraités par la quercétine par rapport au témoin.

Le traitement des rats par l'AFB1 a provoqué une réduction dans la concentration du GSH hépatique ce qui est conforme avec les résultats obtenus par plusieurs auteurs (Sharma *et al.*, 1991 ; Yang *et al.*, 2000 ; Liebert *et al.*, 2006 ; Preetha *et al.*, 2006). Cette déplétion en GSH peut s'expliquer par sa conjugaison avec le métabolite réactive AFB1 -8,9 époxyde (AFBO) issue du métabolisme d'AFB1 (Raney *et al.*, 1992 ; Yang *et al.*, 1999 ; Klein *et al.*, 2002). Cependant le prétraitement par l'EEP a supprimé l'effet d'AFB1 sur la GSH et a augmenté sa concentration de façon considérable par rapport aux témoins. Cette augmentation du taux du GSH pourrait être due à l'induction de sa synthèse, à sa régénération ou aux effets scavenger des flavonoïdes. Nos résultats sont similaires avec ceux obtenus par (Kebsa, 2006 ; Liebert *et al.*, 2006). D'autres études ont démontré que le picroliv, qui a un effet hépatoprotecteur contre la toxicité d'AFB1, restaure le contenu cellulaire en GSH à son niveau normal (Liebert *et al.*, 2006).

Les variations des taux du MDA des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine sont illustrées dans le tableau 13 et la figure 21 ci-dessous.

Tableau 13. Variations des taux du MDA cytosolique généré suite à la peroxydation lipidique induite par l'AFB1 seule, en association avec l'EEP, et la quercétine.

	Témoin	AFB1 (1mg/kg)	EEP (100mg/kg)	Quercétine (10mg/kg)
Concentration du MDA cytosolique (nmoles/g de foie)	0,785± 0,031	1,46±0,098a***	1,115 ±0,007b**	1,17 ± 0,098 b*

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis : a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

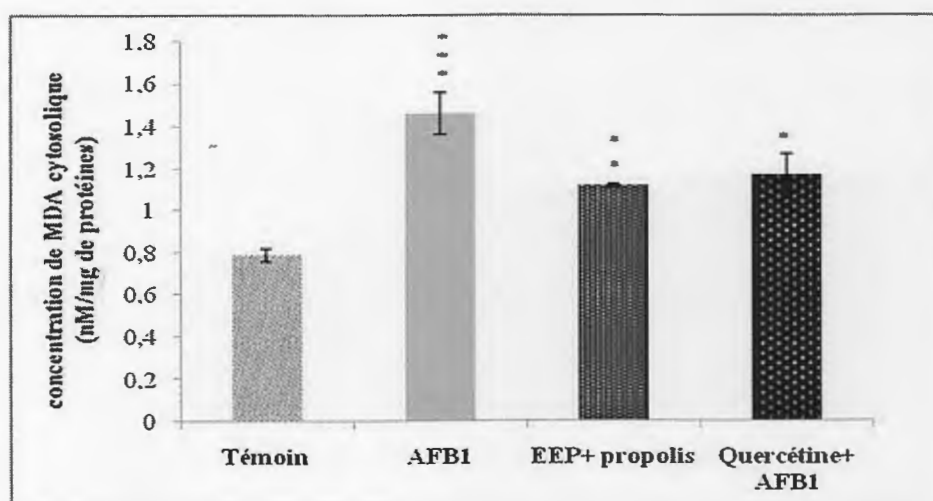


Figure 24. Variations des taux du MDA cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

On se référant au témoin ($0,785 \pm 0,0318$ nmoles/g de foie), une augmentation hautement significative ($p < 0.001$) du taux du MDA cytosolique des rats traités par l'AFB1 est constatée ($1,46 \pm 0,098$ nmoles/g de foie). Par ailleurs, la variation des taux du MDA est très significative ($p < 0.01$) chez les rats prétraités par la propolis ($1,115 \pm 0,007$ nmoles/g de foie) et significative ($p < 0.05$) chez les rats prétraités par la quercétine ($1,17 \pm 0,0989$ nmoles/g de foie) par comparaison avec les rats traités par l'AFB1 ($1,46 \pm 0,0989$ nmoles/g de foie). Le taux de réduction de la peroxydation lipidique par l'EEP (23.64%) est supérieur à celui de la quercétine (19.87%).

Le traitement des rats par l'AFB1 provoque une augmentation significative du taux de MDA cytosolique, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Rastogi *et al.* (2001a,b) qui ont constaté une élévation des peroxydes lipidiques après six semaines de traitement des rats par l'AFB1. Cette augmentation peut être due à la surproduction des ROS tel que le radical hydroxyl OH^\bullet accompagnée par un déficit dans le système antioxydant (Shen *et al.*, 1994; Rastogi *et al.*, 2001 a). Selon Amstad *et al.* (1984), l'AFB1 peut détruire l'intégrité des membranes cellulaires par stimulation de phospholipide A_2 qui va initier la peroxydation lipidique. Concernant les rats prétraités par l'EEP et la quercétine, une diminution de la peroxydation lipidique est constatée : ce qui prouve leurs effets préventifs contre le stress hépatique induit par l'AFB1. Ces résultats

sont conformes avec ceux obtenus par Lahouel *et al.*, (2010). Cet effet protecteur peut être dû à l'effet scavanger des flavonoïdes de la propolis qui réagissent avec les radicaux peroxyde des acides gras polyinsaturés ; inhibant de ce fait la peroxydation lipidique. Ces flavonoïdes inhibent ainsi l'activité des enzymes impliquées dans la conversion des acides gras polyinsaturés des membranes en des médiateurs actifs comme la phospholipase A₂ lacyclooxygenase et la lipoxigénase (Lee Malteliano et Middleton, 1982). L'acide phényl ester caféique de la propolis présente un effet hépatoprotecteur puissant à travers la réduction de la lipoperoxydation et la réduction des ROS avec augmentation de l'activité des enzymes (Souza *et al.*, 1999).

Les variations de l'activité de la catalase des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine sont illustrées dans le tableau 14 et la figure 23 ci-dessous.

Tableau 14. L'évaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	Témoin	AFB1	EE+AFB1	Quercétine+AFB1
Catalase cytosolique (UI/mg de protéines)	5,13±0.063	2,42±0.014 a***	4,96±0.076b*** a ns	4,98±0.53b*** a ns

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis : a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

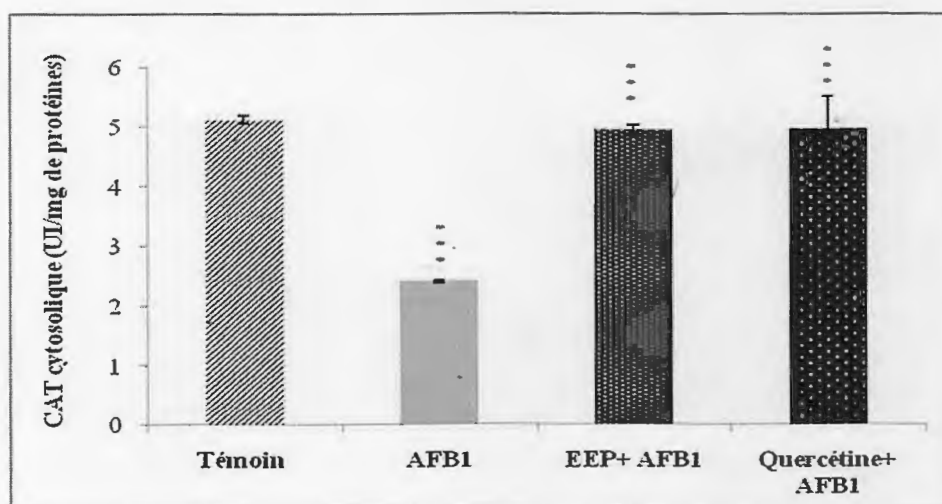


Figure 25. L'évaluation de l'activité enzymatique de la catalase cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

On constate une réduction hautement significative ($p < 0.001$) de l'activité enzymatique de la catalase chez les rats traités par l'AFB1 (2.42 ± 0.014) par rapport à celle des témoins (5.13 ± 0.063), alors qu'un prétraitement par l'EEP et la quercétine a provoqué une augmentation hautement significative ($p < 0.001$), (4.96 ± 0.076 et 4.98 ± 0.53 respectivement) par rapport aux rats traités par l'AFB1, par contre la comparaison avec les rats sains a démontré une diminution non significative ($p > 0.05$) de l'activité enzymatique de la catalase.

Les variations de l'activité de la SOD des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine sont représentées dans le tableau 15 et la figure 24 ci-dessous.

Tableau 15. Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	Témoin	AFB1	EEP+AFB1	Quercétine+AFB1
SOD cytosolique (U/mg de protéines)	9.62±0.59	6.15±0.21a***	8.91±0.53b*** a ns	8.83±0.52b*** a ns

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis : a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

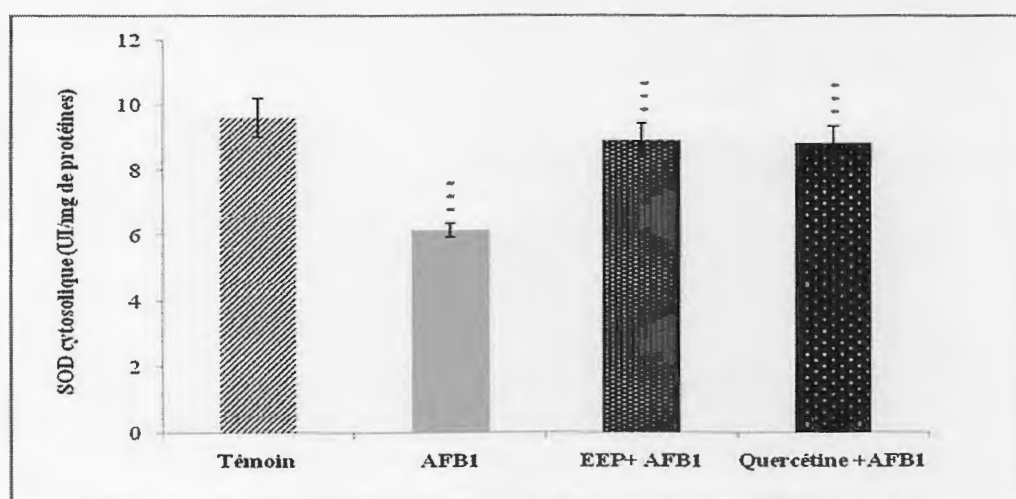


Figure 26. Variations de l'activité enzymatique de la SOD cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

L'activité de la SOD a significativement diminué ($p < 0.001$) chez les rats recevant l'AFB1 seule (6.15 ± 0.21) par rapport à celle mesurée chez les témoins (9.62 ± 0.59). L'activité enzymatique de ce système antioxydant chez les rats prétraités par l'EEP et la quercétine a significativement augmenté ($p < 0.001$), (respectivement 8.91 ± 0.53 et 8.83 ± 0.52) par rapport à celle des rats traités par l'AFB1. Ses valeurs ont diminué de façon non significative ($p > 0.05$) par rapport aux témoins.

L'injection intrapéritonéale d'AFB1 aux rats a entraîné une diminution de la concentration des SOD et CAT; ces résultats sont similaires à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Verma et Nair, 2001; Yener *et al.*, 2009; Kotan *et al.*, 2011). Cette diminution pourrait être due à la destruction de ces enzymes suite au stress cellulaire induit par les métabolites toxiques d'AFB1, ou encore suite à son inactivation par les ROS (Preetha *et al.*, 2006). Le prétraitement des rats par l'EEP a augmenté la concentration du SOD au-delà de celle enregistrée chez le témoin, alors que le prétraitement par la quercétine a maintenu le taux du SOD à son niveau cellulaire normal.

L'EEP et la quercétine préviennent la diminution de l'activité enzymatique de la CAT induite par l'AFB1. Cette prévention est considérable chez les rats prétraités par la quercétine que chez

les rats prétraités par la propolis. L'explication probable de cet effet est l'induction de l'expression des SOD et CAT, ou l'activation de ces enzymes ce qui prouve l'effet préventif de la propolis et de la quercétine (Kebba, 2006). Des études récentes ont montré que la propolis renforce le système antioxydant par réduction des ROS et augmentation de l'activité des SOD et CAT (Koya *et al.*, 2009 ; Newairy *et al.*, 2009 ; Youcef *et al.*, 2009). D'autres études réalisées par ont montré également qu'avec un supplément de 2% de la propolis l'efficacité antioxydante s'améliore chez les rats sénésant par augmentation de l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT (Gülinnaz *et al.*, 1998). De plus, plusieurs autres études ont montré également que les flavonoïdes améliorent l'activité des enzymes antioxydantes. L'augmentation de l'activité de la Mn-SOD cérébrale des rats a été enregistrée après l'administration orale de la catéchine (Komatsu et Himaratzu, 2000). L'hespéridine, un flavonoïde de citrus, améliore les taux de la SOD et de la CAT de façon significative (Kanwaljit *et al.*, 2005).

Les variations du taux de la GST des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou avec la quercétine sont illustrées dans le tableau 16 et la figure 25 ci-dessous.

Tableau 16. Variations de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

	Témoin	AFB1	EE+AFB1	Quercétine+AFB1
GST (UI/g de protéines)	2,05± 0,452	1,19± 0,254a**	2,28± 0,127b**	1,83± 0,707b**

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Test de student : (ns) désigne un effet non significatif ($P > 0.05$), (*) désigne un effet significatif ($P < 0.05$), (**) désigne un effet très significatif ($P < 0.01$), (***) désigne un effet hautement significatif ($P < 0.001$). Les comparaisons sont faites vis à vis: a- le groupe témoin, b-groupe AFB1.

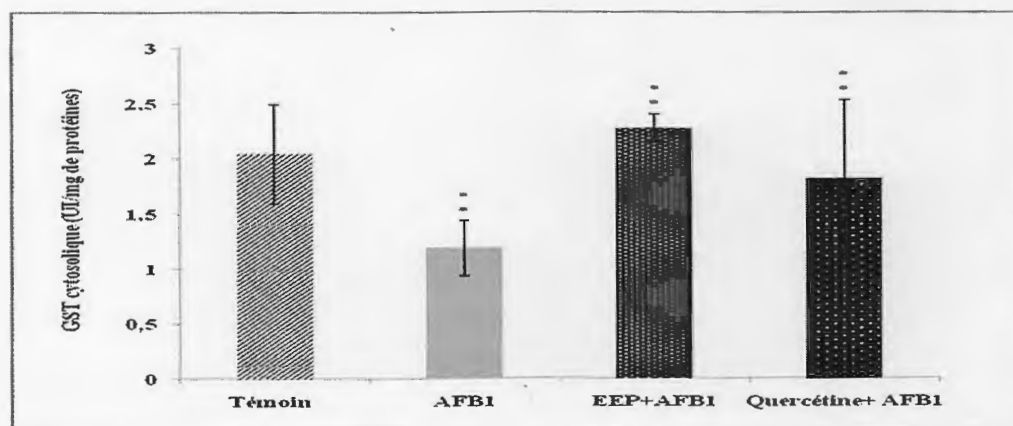


Figure 27. Variations de l'activité enzymatique de la GST cytosolique hépatique après administration d'une dose unique d'AFB1 (1mg/kg) seule, en combinaison avec l'extrait éthanolique de la propolis (100mg/kg) ou avec la quercétine (10mg/kg).

Une diminution très significative ($p < 0.01$) de l'activité de la GST a été constatée chez les rats traités par l'AFB1 (1.19 ± 0.254) par rapport aux témoins (2.05 ± 0.452). Alors que cette activité, chez les rats prétraités par l'EEP et la quercétine (2.28 ± 0.127 , 1.83 ± 0.707 respectivement) est très significativement élevée ($p < 0.01$) par rapport aux rats traités par l'AFB1. On constate une augmentation de 10.09% de l'activité enzymatique de la GST des rats prétraités par l'EEP, avec une diminution de 10.74% chez les rats prétraités par la quercétine par rapport au témoin.

La GST Catalyse la réaction de conjugaison de l'AFB1-8,9-epoxides avec le GSH formant l'AFB1-epoxide-GSH (Raney *et al.*, 1992 ; Stewart *et al.*, 1996). Ceci explique la déplétion en GSH et la diminution de l'activité de la GST obtenues chez les rats recevant l'AFB1. Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats obtenus par Rastogi *et al.* (2001 a, b) qui ont observé une réduction allant de 20% à 34% de l'activité GST chez les rats traités par l'AFB1.

Le prétraitement par l'EEP a permet la restauration de l'activité de la GST. Le prétraitement par la quercétine présente des taux de GST supérieurs à ceux obtenus chez les rats recevant l'AFB1 seule et inférieurs à ceux obtenus chez les rats témoins. Ainsi d'après les résultats, il est bien constaté que la propolis est plus efficace que la quercétine. L'augmentation des taux de GST peut être due à l'induction de sa synthèse, sa régénération ou aux deux effets, comme elle peut être due a l'effet scavenger des flavonoïdes qui vont capter l'AFB1 réduisant de ce fait les réactions de conjugaisons entre le GSH et l'AFBO et par conséquent la diminution de l'activité de la GST (Raney *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1996; Preetha *et al.*, 2006). La restauration intracellulaire de l'activité de la GST vers des valeurs normales montre l'effet préventif de l'EEP et de la quercétine contre la déplétion en GST et indique bien qu'elles jouent un rôle vital dans la diminution du stress et des dommages du foie induite par l'AFB1.

2.4. Etude histologique

Des coupes histologiques au niveau des foies des rats témoins, traités par l'AFB1, ou prétraités par l'extrait ethanologique de la propolis ou la quercétine ont été réalisés afin de permettre la visualisation des changements tissulaires qui peuvent être s'installer suite à l'administration de l'AFB1.

Les coupes histologiques des foies des rats témoins montrent un tissu hépatique d'architecture normale sans anomalies histologiques (figure 28.A).

Chez les rats traités par l'AFB1, on a constaté l'apparition de nombreux changements dégénératifs, des espaces hémorragiques associés à des nécroses de coagulation débutantes au niveau du tissu hépatique. Des vacuolations des hépatocytes, congestion de la veine centrolobulaire et des sinusoides ont été également observé (figure 28.B, figure 29.A). De multiples foyers de nécrose avec infiltration lymphocytaires au niveau des espaces portes.

Des altérations moindres apparaissent dans le foie des rats prétraités par l'EEP (figure 28.C) et la quercetina (figure 28.D).

Des altérations nucléaires de type II des hépatocytes ont été installées également: noyau semi-rond, de forme irrégulière avec augmentation du volume des noyaux occupant presque les deux tiers de cytoplasme (figure 29.D). On constate également la condensation de la chromatine nucléaire avec apparition de corps apoptotiques multiples au niveau des cellules de kupffer (figure 29. C).

Apparition de foyer prénéoplasique dans lequel des hépatocytes deviennent un peu plus volumineuses et présentent un arrangement ou une distribution atypique (cncentrique) (figure 29.B).

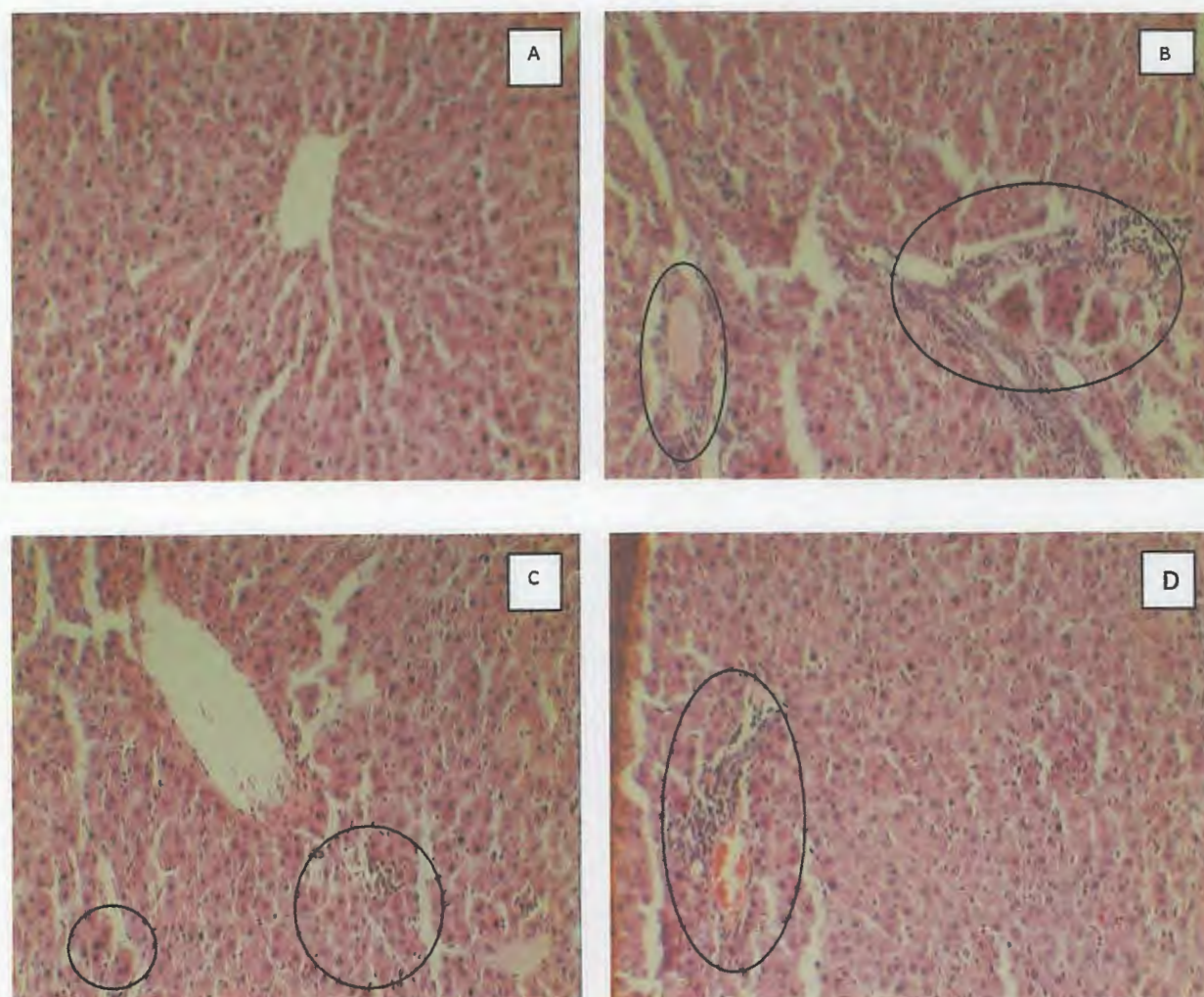


Figure 28. Coupes histologiques de foies des rats traités par l'AFB1 seule, en association avec la propolis ou la quercétine (10x10).

A. rat témoin, tissu hépatique d'architecture normale sans anomalies histologiques, B. rat traité par l'AFB1, Apparition de multiples foyers de nécrose avec infiltration lymphocytaires (mononucléaires) au niveau des espaces portes, congestion de la veine, nécrose de coagulation, C. rat traité par EEP+AFB1, infiltration lymphocytaires moindres, D. rat traité par Quercétine+AFB1, infiltration lymphocytaires moindre, début de congestion veineuse.

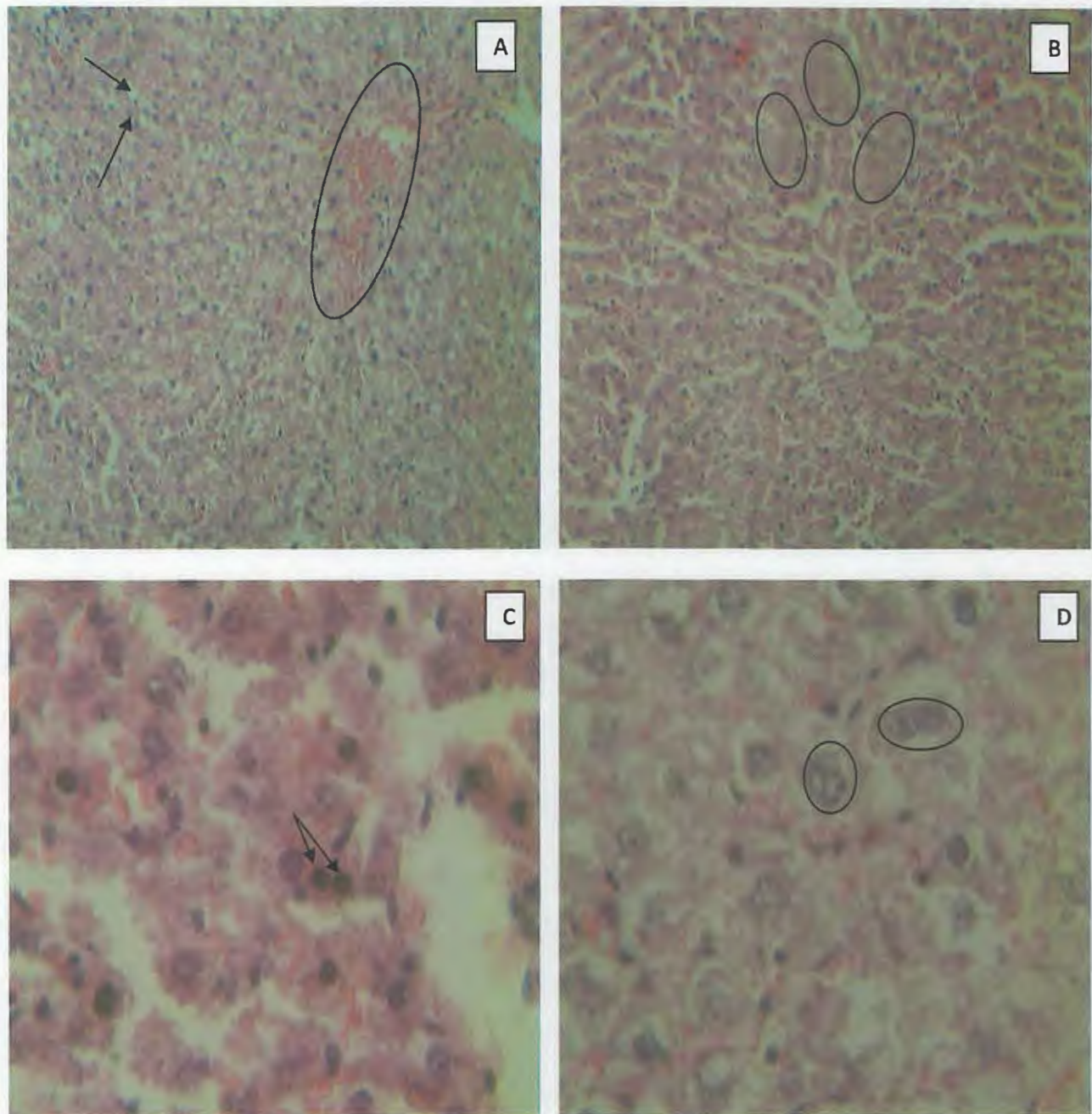


Figure 29. Coupes histologiques montrant les différents changements au niveau du foie des rats traités par l'AFB1.

A. Nécrose de coagulation+ vacuolation des hépatocytes, B. Foyers prénéoplasiques. C. Apparition de corps apoptotiques dans les cellules de kupffer (10x100).D. Altération de la forme de certain nyau (allongé), condensation de la chromatine et augmentation de leurs tailles.

Plusieurs changements structuraux dégénératifs ont été détectés dans les coupes histologiques. Chez les rats traités par l'AFB1, on a constaté l'apparition de nombreux changements dégénératifs, des espaces hémorragiques associés à des nécroses de coagulation. Des vacuolations des hépatocytes, congestion de la veine centrolobulaire et des sinusoides, de multiples foyers de nécrose avec infiltration lymphocytaires au niveau des espaces portes.

Des changements nucléaires des hépatocytes ont été installés également: noyau semi-rond, de forme irrégulière avec augmentation du volume des noyaux occupant presque les deux tiers de cytoplasme, condensation de la chromatine nucléaire avec apparition de corps apoptotiques multiples au niveau des cellules kupfferiennes. Ces changements morphologiques en relation

avec l'apoptose ont été décrits antérieurement par Méki *et al.* (2004), comprenant la condensation de la chromatine nucléaire et son fragmentation, le noyau se fragmente puis la cellule elle-même pour former des corps apoptotiques. Ces derniers vont subir une phagocytose par les macrophages hépatiques ce qui explique l'apparition de corps apoptotiques au niveau des cellules de kupffer (macrophages hépatiques).

Les lésions d'ADN mitochondriale sont persistantes et peuvent être dues à un manque des mécanismes de réparation dans cette organelle. Par conséquent, la transcription et la traduction mitochondriale sont inhibées ce qui conduit à une transformation néoplasique des cellules (Hsieh, 1987). Ceci peut expliquer l'apparition de foyers préneoplasiques obtenus dans notre étude.

Conclusion

Les résultats des essais relatifs à l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur de la propolis contre la toxicité induite par l'AFB1 nous permettent de tirer un certain nombre de conclusions :

L'étude phytochimique de la propolis nous permet de conclure que:

- Tous les échantillons sont très riches en polyphénols et en flavonoïdes. Les différences entre les teneurs en composés phénoliques sont liées à l'origine botanique de la propolis, c'est à dire de la couverture végétale et du type des plantes à partir desquelles l'abeille fait la récolte des constituants de la propolis.
- L'analyse par GC-MS a montré que tous les échantillons contiennent des flavonoïdes, des acides phénoliques, terpènes, alcools, esters, huiles essentielles, dont les types et les teneurs varient d'une région à l'autre. ce qui prouve l'effet de l'origine botanique sur la composition chimique. La propolis Jijilienne est très riche en acides gras expliquant la richesse de la wilaya en olivier.
- les échantillons de la propolis possèdent une activité anti-radicalaire concentration dépendant.

L'étude *in vivo* portée sur l'évaluation de l'effet hépatoprotecteur de la propolis contre la toxicité induite par l'AFB1, montre que :

- l'AFB1 est hautement hépatotoxique conduisant à un dysfonctionnement hépatique sévère, une cytolyse caractérisée par la libération dans le sang des transaminases, LDH, bilirubine, et un stress oxydant exprimé par un déficit dans les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques avec augmentation de la peroxydation lipidique. Conduisant à l'apparition de changements dégénératifs sévères au niveau tissulaire (necrose, vacuolation des hépatocytes, congestions veineuses et sinusoidales, changements nucléaires et apparition des corps apoptotiques et des foyers prénéoplasiques).

Le prétraitement des rats par l'EEP a permis la mise en évidence d'un effet préventif contre l'hépatotoxicité induite par AFB1 et ce à travers :

- La limitation des effets délétères de l'AFB1 et la protection de la fonction hépatique démontrée par le maintien du taux des paramètres sériques à des niveaux cellulaires normaux: transaminases, LDH, bilirubine et protéines.

- Le maintien de l'équilibre de la balance antioxydant-prooxydant, par le renforcement des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques présentés par l'augmentation des taux de GSH, de l'activité enzymatique de la SOD, CAT et GST.
- La protection des membranes cellulaires contre les effets délétères de ROS, et ce par inhibition de la peroxydation lipidique et réduction des taux du MDA.
- Le maintien de l'intégrité du tissu hépatique en réduisant les changements dégénératifs.

L'activité hépatoprotectrice de la propolis est très considérable, raison pour laquelle nous recommandons des études plus approfondies pour bien comprendre les mécanismes moléculaires de l'hépatotoxicité de l'AFB1 ainsi que les mécanismes moléculaires de l'activité hépatoprotectrice de la propolis. Comme la propolis est un mélange de composés divers nous recommandons de poursuivre l'étude phytochimique par séparation et identification des constituants afin d'arriver à la molécule hépatoprotectrice et permettre l'évaluation de la relation structure-activité.

Références Bibliographiques

- Abdel-Wahhab M.A., Aly S.E., 2003.** Antioxidants and radical scavenging properties of vegetable extracts in rats fed aflatoxin-contaminated diet. *J. Agric. Food Chem*; 51: 2409–2414.
- Abdulmajeed N., 2011.** The protective ability of some plant extracts on aflatoxin B₁ induced renal and cardiac damage, *Arabian journal of chemistry*; 4: 1-10.
- Afanasiev I.B., Dorozhko A.I., Brodshi A.V., Kostyak V.A., Potaporritch A.I., 1989.** Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol*; 38, 1763– 1769.
- Agarwal A., Prabhakaran S.A., and Sikka S.C., 2007.** Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: Evidence-based analysis. *AUA Update Ser*; 26: 1–12.
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA), 2009.** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. P43.
- Agnes V.F., Akbarsha M.A., 2003.** Spermatotoxic effect of aflatoxin B₁ in the albino mouse. *Food Chem Toxicol*; 41: 119-30.
- Aguilar F., S.P. Hussain S.P., Cerutti P., 1993.** Aflatoxin B₁ induces the transversion of G.T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci; USA* 90: 8586–8590.
- Ahn M.R., Kumazawa S., Usui Y., Nakamura J., Matsuka M., Zhu F., Nakayama T., 2007.** Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various area of china. *Food chemistry*; 101: 1383-1392.
- Akao M., Kuroda K., and Wogan G.N., 1971.** Aflatoxin B₁: The kidney as a site of action in the mouse. *Life Sci*; 10: 495-501.
- Akinrimisi E.O., Benecke B. J. and Seifart K. H., 1974.** Inhibition of rat-liver RNA polymerase *in vitro* by aflatoxin B, in the presence of a microsomal fraction. *Eur. J. Biochem*; 42: 333-339.
- Alencar S.M., Oldoni T.L.C., Castro M.L., Cabral I.S.R., Costa-Neto C.M., Cury J.A., Rosalen P.L., Ikegaki M., 2007.** Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis, Red propolis. *J. ethnopharmacology*; 113: 278-283.
- Amoros M., Lurton F., Bowtie J.; Girre L., Sauvager F. and Cormier M., 1994.** Comparison of the antiherpes simplex virus activities of propolis and 3 methylbut- 2 enyl caffeate. *J. Nat. Prod*; 57(5): 644-647.
- Amstad, P., Levy A., Emerit I., Cerutti P., 1984.** Evidence for membrane mediated chromosomal damage by aflatoxin b₁ in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 5.
- Babior B.M., Lambeth J.D., and Nauseef W., 2002.** The neutrophil NADPH Oxidase. *Archive of Biochemistry and Biophysics*; 397: 342-344.
- Baertschi, S.W., Raney, K.D., Stone, M.P. and Harris, T.M. 1988.** Preparation of 8,9 epoxide of the mycotoxin aflatoxin B, the ultimate carcinogen species. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 7929-7931.
- Bancova V.S., De castro S.L., Mara-cucci M.C., 2000.** Propolis. Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*; 31: 3-15.
- Barbas C., Dams A., Majors R.E. 2005.** Separation of Aflatoxins by HPLC. Application. Environmental, Food Safety. Agilent Technologies, Inc.

- Bartosz G., 2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*; 9: 5-21.
- Barzilai A., et Yamamoto K.I., 2004.** DNA damage response to oxidative stress. *DNA*
- Beauchamp C., Fridovich I., 1971.** Assay of superoxide dismutase. *Anal Biochem*; 44:276-287.
- Benasutti M., Ejadi S., Whitlow M. D. and Loechler E. L. 1988.** Mapping the binding site of aflatoxin B, in DNA: systematic analysis of the reactivity of aflatoxin B, with guanines in different DNA sequences. *Biochemistq*; 27: 472-248.
- Berlett B.S., and Stadtman E.R., 1997.** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*; 272:20313-6.
- Bhadauria M., Nirala S. K. and Shukla S., 2007.** Hepato-protective efficacy of propolis extract: A biochemical and histopathological approach Iranian. *Journal of Pharmacology Therapeutics*; 6:145-154.
- Biswas G., Raj H.G., Allameh A., Saxena M., et al., 1993.** Comparative kinetic studies on aflatoxin B1 binding to pulmonary and hepatic DNA of rat and hamster receiving the carcinogen intratracheally. *Teratogcarcinog Mutagen*; 13(6): 259-68.
- Borrelli F., Maffia P., Pinto L., Ianaro A., Russo A., Capasso F. and Ialenti A., 2002.** Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*; 73(1): S53-S63.
- Bouheroum M., 2007.** Etude phytochimique des plantes medicinales algériennes : *Rhantherim adpressum et Ononis anfastissima*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine.
- Brand W.W., Cuveleir M.E., and Berset C., 1995.** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lenbensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology* ; 28 : 25-30.
- Brochard G., Le Bâcle C., 2009.** Mycotoxines en milieu de travail. Département études et assistance médicales, INRS, document pour le médecin de travail, N° 119, p. 305- 306.
- Brochard G., 2005.** Mycotoxines en milieu de travail. Thèse de doctorat en médecine de l'université de RENE DESCARTES. Paris 5.p 4-5.
- Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *La Voisier TEC*, Paris.
- Bruneton., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie: Plantes médicinales, Eds. *Technique et documentation Lavoisier*, Paris.
- Budic-Leto,T., Lovric, J., 2002.** *Food Technol. and Biotechnol*; 40 (3): 221-225.
- Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., and Sauvaigo S., 2002.** Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem* ; 383(6): 93.
- Caillas A., 1978.** propolis. In Remarkable hive product: Propolis; Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in thepapeutics. *APIMONDIA standing commission on Beekeeping technology and Equipment*, Bucharest.
- Calleri E., Marrubini G., Brusotti G., Massolini G., Caccialanza G., 2007.** Development and integration of an immunoaffinity monolithic disk for the on-line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detection of aflatoxin B1 in aqueous solutions. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 44: 396-403.

- Ch'ih J. J., and Devlin T. M., 1984.** The distribution and intracellular translocation of aflatoxin B, in isolated hepatocytes. *Biochem. biophys. Res. Commun.*; 122: 1-8.
- Ch'ih J. J., Ewaskiewicz J. I., Taggart. P. and Devlin, T. M. 1993.** Nuclear translocation of aflatoxin B₁-protein complex. *Biochem. biophys. Res. Commun.* ; 190: 186- 191.
- Chen K., Suh J., Carr A.C., Morrow J.D., Zeind J. and Frei B., 2000.** Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 279(6): 1406-1412.
- Chou C.C. and Marth E. H., 1975.** Incorporation of [2-¹⁴C] acetate into lipids of mink (Mus musculus) liver and intestine during in vitro and in vivo treatment with aflatoxin B. *Appl. Microbiol*; 30: 946-950.
- Choy W.N. 1993.** A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B, and its implications to quantitative cancer-risk assessment. *Mutat. Res*; 296: 181- 198.
- Claiborne A., 1985.** Catalase activity. In: CIRC handbook of methods for oxygen radical research. Ed Greenwald RA, CRC Press, Boca Raton; 283-284.
- Comhair S. A., and Erzurum S.C., 2002.** Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. physiol* ; 283: 246-255.
- Coppock R.W., Christian R.G., 2007.** Aflatoxins. In: Gupta R (ed.) Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles. New York: Academic Press; p.939-950.
- Coulombre R.J., Sharma R.P., 1985.** Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B₁ in the rat. *Food Chem Toxicol*; 23(9): 827-30.
- Dahlmann A., Dantzer W.H., Silbernagl S., Gekle M., 1998.** Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron in vivo: The nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther*; 286(1):157-162.
- Dangles O., Dufour C., Manach C., Morand C., Remesy C., 2001.** Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol*; 335:319-33.
- Decker E.A., 1998.** Antioxidant mechanisms. In: Akoh CC, Min DB, editors. Food lipids, chemistry, nutrition, and biotechnology. New York: Marcel Dekker; pp. 397– 401.
- Delattre J., Beaudeau J.L., et Bonnefont-Rousselot., 2005.** Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. *Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales, Paris* ; pp 1-405.
- Do J.H., Choi D.K., 2007.** Aflatoxins: Detection, toxicity, and biosynthesis. *Biotechnol. Bioprocess Eng*; 12:585–593.
- Dragacci S., Zakhia-Rozis N., Galtier P., 2011.** Danger dans l'assiette. *Ed Quæ*, France.
- Dufour C., Dangles O., 2005.** Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*; 1721:164-73.
- Durk E., 1997.** The Ability of bee products to modulate human immune system. Eight International Symposium on trends in Biomedicine in Finland: allergy, oxidants and antioxidants, and human health.
- Eaton D.L., Gallagher E.P., 1994.** Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*; 34: 135–172.

- Eaton D.L., Groopman J.D., 1994.** The Toxicology of Aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Ed.; *Academic Press*, London.
- Egbunike G. N., and Ikeguonu F.I., 1984.** Effect of aflatoxicosis on acetylcholinesterase activity in the brain and adenohypophysis of the male rat. *Neurosci.Lett*; 52: 171-174.
- Egbunike G.N., Emerole G.O., Aire T.A., Ikegwuonu F.I., 1980.** Sperm production rates, sperm physiology and fertility in rats chronically treated with sublethal doses of aflatoxin B₁. *Andrologia*; 12: 467-75.
- Ellman G.L., 1959.** Plasma antioxidants. *Arch Biochem Biophys*, 82: 70-77.
- El-Shobaki F.A., Refaat O.G., Saleh Z.A., Abd-Elfatah A.S., and El- Hagar E.F., 2011.** The Effect of Consuming a Cake Containing Propolis on Gut Micro flora and Toxicity. *Journal of American Science* ; 7(7).
- Epstein S.M., Bartus B., Farber E., 1969.** Renal epithelial neoplasms induced in male wistar rats by oral aflatoxin B₁. *Cancer Res*; 29: 1045-1050.
- Faisal K., Faridha A., Akbarsha M.A., 2008.** Induction of micronuclei in spermatocytes in vivo by Aflatoxin B₁: light and transmission electron microscopic study in swiss mouse. *Reprod. Toxicol*; 26:303-9.
- Faridha A., Faisal K., Akbarsha M.A., 2006.** Duration-dependent histopathological and histometric changes in the testes of Aflatoxin B₁- treated mice. *J. endocrinol Reprod*; 10: 117-33.
- Favier A., 2003.** Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Review. L'actualité chimique novembre*; 5: 108-115.
- Ferhoum F., 2010.** Analyse physicochimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (*Apis mellificaintermissaet Apis mellifica saharienne*). Thèse de Magister en technologie alimentaire de l'Université de M'hamed Bougara ,Boumerdes, pp. 67-69.
- Friedrich et Beauchanp, 1971.** Assay of superoxyde dismutase. *Anal Biochem* ; 44 : 276-87.
- Galtier P., 2003.** Toxic effects of mycotoxins: importance of biotransformation systems. In: nottingham university press (éd.): Proceedings of Alltech's 19th international symposium, T.P. Lyons and K.A. Jacques ed, Nottingham, p. 489-497.
- Ghisalberti E.L., 1978.** Propolis: a review, *Bee Wld* ;60: 59-84.
- Goerttler K., Löhrke H., Schweizer H. J., and Hesse B., 1980.** Effects of aflatoxin B₁ on pregnant inbred Sprague-Dawley rats and their F₁ generation. A contribution to transplacental carcinogenesis. *J. Natl. Cancer. Inst*; 64: 1349-1354.
- Gornall A.C., Bradawill C.J., David M.M. 1949.** *J.Biol.Chem*; 177-751.
- Gourama H., and Bullerman L.B., 1995.** *Aspergillus flavus* and *aspergillus parasiticus* ; aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds : a review. *J. Food Prot*; 58: 1395-1404.
- Gregory S.R. et al., 2002.** Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J Altern Complement Med*; 8(1): 77-83.
- Grosman M.E., Elias M.M., Comin E.J., Garay E.A.R., 1983.** Alterations in renal function induced by aflatoxin B₁ in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol*; 69: 310-325.

- Guengerich F. P., Johnson W. W., Ueng Y. F., Yamazaki H., Shimada T., 1996.** Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environ Health Perspect*; 104 (3): 557-562.
- Gülinnaz A., Eser Y., Lütffiye K., Gülriz M., Biltan E., Fatma Z., 1998.** Age-Related Alterations in Superoxyde Dismutase and Catalase Activities in Rat Brain. *Tr.J. of Medical Sciences*; 28:491-494.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B., 1974.** Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem*; 249:7130-7139.
- Hafez A.H., Megalla S.E., Abdel-Fattah H.M., Kamel Y.Y., 1982.** Aflatoxin and aflatoxicosis II. Effects of aflatoxin on ovaries and testicles in mature domestic fowls. *Myopathologia*; 77 (3): 137-9.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1999.** Free Radicals in Biology and Medicine. 3^{ed}. *Oxford University Press*.
- Halliwell B., Whiteman M., 2004.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*; 142: 31-2.
- Hamilton P. B., 1975.** Lipid and vitamin metabolism during mycotoxicoses. (ed.) *American Society for Microbiology, Washington, D.C*; pp. 381-387.
- Harley E. H., Rees K. R. and Cohen A., 1969.** A comparative study of the effects of aflatoxin B, and actinomycin D on HeLa cells. *J. Biochem*; 114: 289-298.
- Haussamen T.U., et al., 1977.** *Clin. Chim. Acta*; 35:271-273.
- He X.Y., Tang L., Wang S.L., Cai Q.S., Wang J.S. and Hong J.Y., 2006.** Efficient activation of aflatoxin B1 by cytochrome P450 2A13, an enzyme predominantly expressed in human respiratory tract. *Int. J. Cancer* ; 118 : 2665–2671.
- Hollman P. C. H., 2001.** Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. *Journal of the science of food and agriculture*; 81: 825-842.
- Hsieh D. P. H., 1987.** Mode of action of mycotoxins. In: *Mycotoxins in Food*, Krogh, P. (ed.) *Academic Press, Cambridge*; pp. 149-176.
- Hussein H.S., Brasel J.M., 2001.** Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol* ; 167:101–134.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993.** Aflatoxins. In *Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*; Lyon, France: 56: 245-395.
- Iqbal M., Som D.S., Yasumasa O., Masayoshi F. and Shigero O., 2003.** Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacology and toxicology*; 92: 33-38.
- Jadwiga Jodynys-Lieberta, Irena Matławska, Wiesława Byłk, Marek Murias, 2006.** Protective effect of *Aquilegia vulgaris* L. on aflatoxin B1-induced hepatic damage in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 22: 58–63.
- Janssen Y.M., Van Houten, B., Borm, P.J., Mossman, B.T., 1993.** Cell and tissue
- Jard G., 2009.** Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales: Adsorption et Biotransformation. Thèse de doctorat de l'université de toulouse. P. 2-6.

- Jean M. P., 1999.** Le guide pratique d'apiculture, *Eds Edisud. France.*
- Kanbak G., Inal M., Bayeu C., 2001.** Ethanol – induced hepatotoxicity and protective effect of betaine. *Cell Biochem.Funct*;19: 281-285.
- Kanwaljit C., Sangeeta P., Naveen T., 2005.** Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC pharmacology*; 5: 2.
- Kaplan A., et al., 1984.** Bilirubin. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1238-1241.436 and 650.
- Kartal M., Kaga S., and Kurucu S., 2002.**GG-MS analysis of propolis simple from different régions of turkey .*Z.Naturforsch*.57c; pp 905-909.
- Kebieche M., 2009.** Activité biochimique des extraits flavonoidiques de la plante *Ranunculus repens L.*: effet sur le diabète experimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. *Thèse de doctorat de l'université de jijel.*
- Kebsa., 2006.** Evaluation de l'effet de la propolis algérienne sur le stress oxydatif mitochondriale induit par la doxorubicine. *Thèse de Magister, Université de jijel.*
- Kebsa, W., Rouibah, H., Bousnane, H., Benguedouer, L., Alyane, M. and Lahouel, M., 2007.**Effect of a long term treatment by Algerian Propolis flavonoids on mitochondrial antioxidant-prooxidant balance.*West African Journal of Pharmacology and Drug Research*. 22/23 : 16-26.
- Keller-Seitz M. U., Certa U., Sengstag C., Wurgler F. E., Sun M., Fasullo M., 2004.** Transcriptional response of yeast to aflatoxin B1: recombinational repair involving *RAD51* and *RAD1*. *Molecular biology of the cell*; 15: 4321-4336.
- Kelly E. J., Erickson K. E., Sengstag C., Eaton D. L., 2002.** Expression of human microsomal epoxide hydrolase in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a functional role in aflatoxin B1 detoxification. *Toxicol. Sci*; 65: 35-42.
- Kiessling K. H., 1986.** Biochemical mechanisms of action of mycotoxins. *Pure appl. Chem*; 58: 327-338.
- Kirby G., Wolf C., Neal G., Judah D., Henderson C., Srivatanakul P. and Wild C. P. 1993.** *Carcinogenesis*; 14: 2613 - 2620.
- Klein P. J., Van Vleet T. R., Hall J. O., Coulombe R. A., JR., 2000.** Biochemical factors underlying the age-related sensitivity of turkeys to aflatoxin B (1).*Comp BiochemPhysiol C ToxicolPharmacol*; 132:193-201.
- Klein P.J., Van Vleet T.R., Hall J.O., Coulombe R.A., 2002.** Dietary butylatedhydroxytoluene protects against aflatoxicosis in Turkeys. *Toxicol. Appl. Pharmacol*; 182: 11–19.
- Kohen R., Nyska A., 2002.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*; 30: 620-650.
- Kokaleci A., Marina B., Pepel S., 2003.** Analysis of propolis from the continental and adreatic regions of Croatia. *Acta pharm*; 53:275-285.
- Komatzu M., and Himaratzu., 2000.** The efficacy of an antioxydant cocktail lipid peroxyde level and superoxyde dismutase activity in the aged rat brain and DNA damage in iron induced épileptogenic foci. *Toxicol*; 148: 143-148.

- Kotan E., Alpsoy L., Anar M., Aslan A., and Agar G., 2011.** Protective role of methanol extract of *Cetraria islandica* (L.) against oxidative stress and genotoxic effects of AFB 1 in human lymphocytes in vitro. *Toxicology and Industrial Health* ; 27(7) : 599–605.
- Krell R., 1996.** Value-added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin N°. 124. Rome.
- Kunimoto, T., Kurimoto, Y., Aibara, K. and Miyaki K., 1974.**Inhibition of nucleoside transport by aflatoxins and sterigmatocystin. *Cancer Res*; 34: 968-973.
- Kusumoto T., Miyamoto T., Higuchi R., Doi S., Sugimoto H. and Yamada H., 2001.** Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. *Chem Pharm Bull*; 49: 1207–1209.
- Lahouel M., Boutabet K., Kebza W. and Alyane M., 2010.**Polyphenolic fractions of Algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress *African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 4(10), pp. 712 - 72.*
- Lanz S., 2009.** Le cancer du foie, Carcinome hépatocellulaire, *Ligue suisse contre le cancer* ; Berne.
- Larsson P., Busk L., Tjälve H., 1994.** Hepatic and extrahepatic bioactivation and GSH conjugation of aflatoxin B1 in sheep. *Carcinogenesis*; 15: 947–955.
- Lee T. P., Matteliano M. L., & Middleton E., 1982.** Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte enzyme release and phospholipid metabolism. *Life Science*; 31: 2765–2774.
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., Stocker P., Durand P., Prost M., 2001.** Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*; 30: 1076-1081.
- Li F., Awale S., Tezuka Y., Kadota S., 2008.** Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem*; 15: 5434-5440.
- Liu J., Yang C.F., Wasser S., Shen H.M., Tan C.E., Ong C.N., 2001.** Protection of salvia miltiorrhiza against aflatoxin-B1-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats dual mechanisms involved. *Life Sci*; 69: 309–326.
- Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V., Biro L., 2003.** The rôle of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedensis*; p. 1-4, 119-125.
- Macheix J J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed Presses*.
- Malešev D. and Kuntić V., 2007.** Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the serbian chemical society*; 72 (10): 921-939.
- Malloy H.T., et al. 1937.** The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol Chem*; 112 ,2; 481-491.
- Marcucci M.C., Salatino M.L.F., Salatino A., Lopes C.M.A., 1994.** Chemical and biological studies of Brazilian propolis. Proc IV Iberolatinamerican Meeting Apic, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Recursos Renovables, Rio Cuarto, Argentina, pp.193-196.
- Marivane Lemos Muriel Primon de Barros et al., 2007.** Baccharis dracunculifolia, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *J Pharm Pharmacol.*; 59(4):603-8.

- Massy T.E., Smith G.B., Tam A.S., 2000.** Mechanisms of aflatoxin B1 tumorigenesis. *Exp Lung Res*; 26(8): 673-83.
- Matsuno T., 1992.** Isolation and characterization of the tumoricidal substance from Brazilian propolis. *Honeybee Sci*; 13:49-54.
- Meki A.R., Esmail E., Hussein A.A., Hassanein H.M., 2004.** Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin. *Toxicol*; 43: 93-100.
- Milane H., 2004.** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. *Thèse de doctorat de l'université de Louis Pasteur* ; pp. 13-36.
- Miller E. C., 1978.** *Cancer Res*; 38: 1479 – 1496.
- Ming H., 2007.** Commentary: bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *molecular pharmaceutics* ; 4 (6) : 803-806.
- Moudir N., 2005.** Les polyphénols de la propolis Algérienne. Thèse de magister en chimie. *Université Mouhamed Boudiaf, M'sila*. ✕
- Murray R., 1984.** Aspartase aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronoto. Princeton 11:112-116.
- Nemeth K., Plumb G.W., Berrin J.G., Juge N., Jacob R., Naim H.Y., Williamson G., Swallow D.M., Kroon P.A., 2003.**
Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur J Nutr*; 42: 29-42.
- Neuzil J., Stocker R., 1993.** Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett*; 331 (3): 281 - 284.
- Nirala S.K., Bhadauria M., 2008.** Propolis reverses acetaminophen induced acute hepatorenal alterations: a biochemical and histopathological approach. *Arch. Pharm. Res*; 31: 451-461. ✕
- Niranjan B. G., Bhat N. K. and Avadhani N. G., 1982.** Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B, during hepatocarcinogenesis. *Science*; 215: 73-75.
- Ohkawa H., Ohishi N., and Yagi K., 1979.** Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*, 95: 351-358.
- Onibi G.E., Scaife J.R., Murray I., and Fowler V.R., 2000.** Supplementary α -tocopherol acetate in full-fat rapeseed-based diets for pigs: effect on performance, plasma enzymes and meat drip loss. *J Agric Food Chem*; 80(11): 1617-24.
- Orsatti C.L., Missima F., Pagliarone A.C., Bachiega T.F., Búfalo M.C., Araújo J.P. Sforcin J.M. 2009.** Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytother Res*. ✕
- Ota C., Unterkircher C., Fantinato V., Shimizu M.T., 2001.** Antifungal activity of propolis on different species of Candida. *Mycoses*; 44(9-10): 375-8. ✕
- Ozsoy N., Candoken E., and Akev N., 2009.** Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in Aloe vera. *Oxid Med Cell Long*; 2(2): 99-106.

- Pfohl-Leszkowicz A., 1999.** Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Conseil supérieur d'hygiène publique, *technique et documentation, Paris* ; p. 478.
- Pier A.C., 1991.** The influence of mycotoxins on the immune system. In: J.E. Smith and R.S. Henderson (Ed). *Mycotoxins in Animal Foods.CRC press, Boca Raton, FL*; pp. 489-497.
- Plaa G.L., Hewitt W.R., 1986.** Detection and evolution of chemically induced liver injury. In: Hayes, A.W. (Ed.), *Principles and Methods of Toxicology. Raven press, New York*, pp. 401–441.
- Preetha S.P., Kannappan M., Selvakumar E., Nagaraj M., Varalakshmi P., 2006.** Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comparative Biochemistry and Physiology C Toxicology and Pharmacology*; 143: 333–339.
- Psotova J, Lasovsky J et Vicar J, 2003.** Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic. *Biomed. Papers*; 174-153 p.
- Raney K.D., Meyer D.J., Ketterer B., Harris T.M., Guengerich F.P., 1992.** Glutathione conjugation of aflatoxin B1 exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. *Chem. Res. Toxicol*; 5: 470–478.
- Rastogi R., Srivastava A.K., Rastogi A.K., 2001a.** Biochemical changes induced in liver and serum of aflatoxin B1-treated male wistar rats: preventive effect of picroliv. *Pharmacol. Toxicol*; 88:53–58.
- Rastogi R.K.S., Dogra S.K., Khanna M., 2006.** Das Skin tumorigenic potential of Aflatoxin B1 in mice *Food Chem. Toxicol* ; 44: 670–677.
- Rastogi, R., Srivastava, A.K., Rastogi, A.K., 2001b.** Long term effect of aflatoxinB(1) on lipid peroxidation in rat liver and kidney: effect of picroliv and silymarin. *Phytother. Res.* 15: 307–310.
- Reitman S., Frankel S.J., 1957.** *Clin Path*; 28-56. *Repair*; 3(8-9): 1109-1115.
- Ross P.B., 1990.** The effects of propolis fractions on cells in tissue culture. MPhil thesis ; University of Wales College of Cardiff, UK, p. 193.
- Roy A. K., 1968.** Effects of aflatoxin B, on polysomal profiles and RNA synthesis in rat liver. *Biochim.Biophys. Acta* ; 169: 206-211.
- Sarni M.P., Cheynier V., 2006.** Les polyphenols en agroalimentaire. Ed Lavoisier, science et technologie ; P. 2-10.
- Saunders F. C., Barker E. A. and Smuckler E. A. 1972.** Selective inhibition of nucleoplasmic rat liver-dependent RNA polymerase by aflatoxin B. *Cancer Res*; 32: 2487-2494.
- Schmidt F. R., Esser K., 1985.** Aflatoxins: medical, economic impact, and prospects for control. *Proc. Biochem*; 167-174.
- Sharma G., Nath R., Gill K.D., 1991.** Effect of ethanol on cadmium-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochem.Pharmacol*; 42:S9–S16.
- Shen H.M., Shi C.Y., Lee H.P., Ong C.N., 1994.** Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol.Appl. Pharmacol*; 127: 145–150.
- Singleton V. L., Rossi J.A. 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology Viticulture*; 37: 144-158.
- Smela M.E., Currier S.S., Bailey E.A., and Essigmann J.M. 2001.** The chemistry and biology of aflatoxinB1 : from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis* 22: 535-545.

- Sohn, D.H., Kim Y.C., Oh S.H., Park E.J., Li X., Lee B.H., 2003.** Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumbo nucifera*. *Phytomedicine* ; 10: 165–169.
- Sorg O., 2004.** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*; 327: 649-662.
- Souza M.F., Tome A.R., Rao V.S., 1999.** Inhibition by the bioflavonoid tennatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *J. Pharm. Pharmacol*; 51: 125–129.
- Stewart R.K., Serabjit-Singh C.J., Massey T.E., 1996.** Glutathione S-transferase- catalyzed conjugation of bioactivated aflatoxin B1 in rabbit lung and liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol*; 140: 499–507.
- Stubblefield R. D., Pier A.C., Richard J.L., Shotwell L.O., 1983.** Fate of aflatoxins in tissues, fluids, and excrements from cows dosed orally with Aflatoxin-B1. *Am. J. Vet. Res* ;
- Sulaiman Gh., Al-Sammarae Kh., Ad'hiah A., 2012.** Anti-tumour Properties of Iraqi Propolis: in vitro and in vivo investigation of anti-tumour effects of Iraqi propolis in human cancer cell lines in vitro and in nude mice xenografts. *LAP Lambert Academic publishing*. Iraq.
- Talayakul P., Sakuda S., Dong K.S., Kumagai S., 2005.** Comparative activities of glutathione-S-transferase and dialdehyde reductase toward aflatoxin B1 in livers of experimental and farm animals. *Toxicol*; 46: 204-209.
- Teeter T., et Franciscus A., 2004.** Comment interpreter un rapport de laboratoire : notions élémentaires. HCSP ; San Francisco.
- Teixeira E.W., Message D., Negri G., Salatino A. and Stringheta P.C., 2008.** Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *ECAM*; 2(1): 1-9.
- Terao K., and Ueno Y., 1978.** Morphological and functional damage to cells and tissues. In: *Toxicology. Biochemistry and Pathology of Mycotoxins*, Uraguchi, K. and Yamazaki, M., (eds) Kodansha Press, Tokyo. pp. 189-238.
- Tietz N.W., 1995.** Text book of clinical chemistry, 3 Ed. C.A. Curtis, E.R. Silverman L.M., Christensen R.H. p. 523-524.
- Towner R.A., Qian S.Y., Kadiiska M.B., Mason R.P., 2003.** In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radic Biol Med*; 35: 1330–1340.
- Tremellen K., 2008.** Oxidative stress and male infertility: A clinical perspective. *Hum. Reprod. Update*; 14: 243–58.
- Tsao R., 2010.** Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Journal nutrients*. ISSN 2072-6643. review.
- Tung H. T., Donaldson W. E. and Hamilton P. B., 1972.** Altered lipid transport during aflatoxicosis. *Toxicol. appl. Pharmac* ;22: 97-104.
- Urquiaga I., Leighton F., 2000.** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*; 33 (2): 55-64.
- Van Egmond H.P., Schothorst R.C., Jonker M.A., 2007.** Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem* ; 389: 147-157.

- Verma R.J., Nair A., 2001.** Ameliorative effect of vitamin E on aflatoxininduced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian. J. Androl*; **3**: 217–221.
- Verma R.J., Raval P.J., 1991.** Cytotoxicity of aflatoxinon red blood Corpuscles. *Bull EnvironContamToxicol*; **47**: 428–432.
- Vertuani S., Angusti A., and Manfredini S., 2004.** The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*; **10**: 1677-1694.
- Virag L., Szabo E., Gergely P., and Szabo C., 2003.** Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett*; **140/141**: 113–24.
- Walle T., 2004.** Absorption and metabolism of flavonoids. *Free RadicBiol Med*; **36 (7)**: 829-37
- Wang C.J., Shiow S.J., Lin J.K., 1991.** Effects of quercetin on the hepatotoxicity and hepatic DNA binding of aflatoxin B1 in rats. *Carcinogenesis*; **12**: 459–462.
- Wang J. S., and Groopman J. D., 1999.** DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research*; **424**: 167-181.
- Weekly L. B., and Llewellyn G. C., 1984.** Activities of tryptopban-metabolizing enzymes in liver and brain of rats treated with aflatoxins. *Food chem. Toxicol*; **22**: 65-68.
- Weekly L. B., Kimbrough T. D., and Llewellyn G. C., 1985.**Disturbances in tryptophan metabolism in rats following chronic dietary aflatoxin treatment. *Drug Metab.Toxico*; **8**: 145-154.
- Wieder R., Wogan G.N., Shimkin M.B., 1968.** Pulmonary tumors in strain A mice given injections of aflatoxin B1. *J.Natl.Cancer Inst*; **40**: 1195-1197.
- Wild C.P., and Turner P.C., 2002.**The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions.*Mutagenesis*; **17 (6)**: 471–481.
- Wild P.C., Turner., 2002.** *Mutagenesis*; **17**: 471-481.
- Wilson V. L. and Jones P. A., 1983.** Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens.*Cell*; **32**: 239-246.
- Yalmaz S., Atessahin A., Sahna E., Ozar S., 2006.** Protective effect of lycopene on adriamycin – induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *J.Toxicol* ;**218**: 164-171.
- Yang C.F. Liu J., Shen H.M., and Ong C.N., 2000.** Protective Effect of Ebselen on Aflatoxin B1- Induced Cytotoxicity in Primary Rat Hepatocytes. *Pharmacology & Toxicology*; **86**: 156–161.
- Yener Z., Celik I., Ilhan F., Bal R., 2009.** Effects of Urtica dioica L. seed on lipid
- Yu F. L., 1977.** Mechanism of aflatoxin B, inhibition of rat hepatic nuclear RNA synthesis.*J. hiol.Chem*; **252**: 3245-3251.
- Yu F. L., 1981.** Studies on the mechanism of aflatoxin B, inhibition of rat liver nucleolar RNA synthesis. *J. biol. Chem*; **256**: 3292-3291.
- Yu F. L., 1983.** Preferential binding of aflatoxin B, to the transcriptionally active regions of rat liver nucleolar chromatin in vivo and in vitro.*Curcinogenesis*; **4**: 889-893.
- Yunus A.W., Razzazi-Fazeli E., Bohm J., 2011.** Aflatoxin B1 in Affecting Broiler’s Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues. *Toxins*; **3**: 566-590.
- X Yves D., 2005. Anatomo-physiologie du foie. Université de Rennes-1.

Yves M., 2002. Petit Larousse de la médecine; Paris. [x](#)

Yvon Gervaise, 2004. Analyse des antioxydants naturels dans les matières premières et les produits ; Paris.

Zhang Y., Fujii J., Phillips M. S., Chen H. S., Karpati G., Yee W. C., Schrank B., Cornblath D. R., Boylan K. B. and MacLennan D. H. 1995. *Genomics*; 30: 415 - 424.

Annexes

Annexe 1

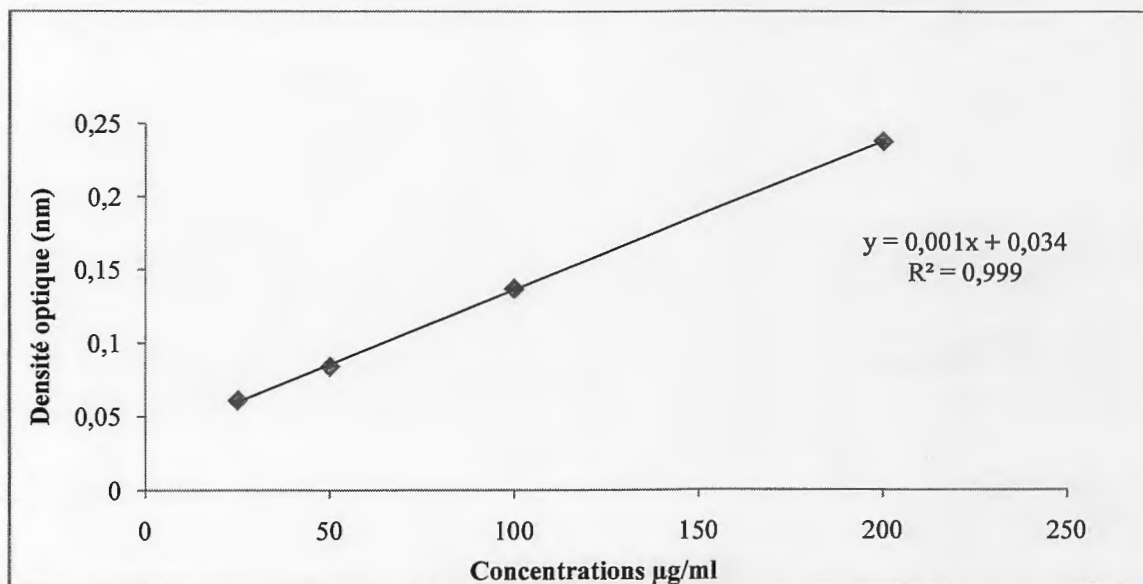


Figure 01. Courbe étalon du dosage des polyphénols en $\mu\text{g/ml}$ (acide gallique comme standard), (Moyenne de 3 essais).

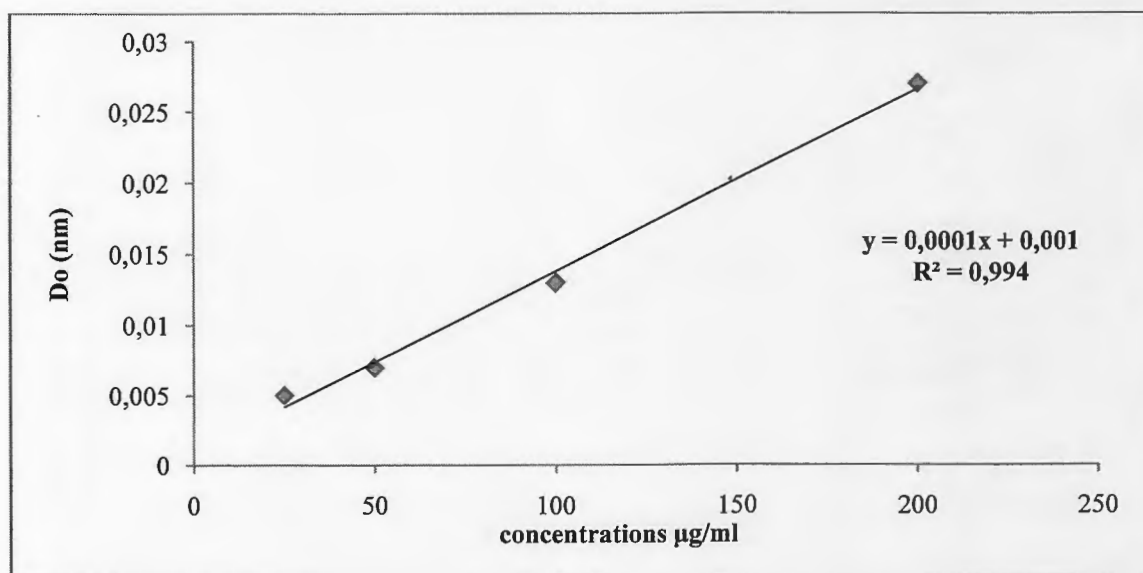


Figure 02. Courbe étalon du dosage des flavonoïdes en $\mu\text{g/ml}$ (quercétine comme standard), (Moyenne de 3 essais).

Annexe 2

Tableau 01.GC-MS de la propolis de Kaous

Peak#	R-Time	Area	Area%	Height	Height%	Name	Base m/z
1	4.110	4232077	0.21	832597	0.34	Benzo[<i>a</i>]furan, 2,3-dihydro-	120.00
2	4.443	2909349	0.14	380728	0.16	Nonanoic acid	73.00
3	4.617	2031323	0.10	661057	0.27		92.05
4	4.660	2662781	0.13	942872	0.39	2-Methoxy-4-vinylphenol (Flavonolide)	150.05
5	4.785	2303845	0.11	322862	0.22	Benzene-3-propanoic acid (Acide aromatique)	91.00
6	4.925	1987232	0.10	604028	0.25	Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy-	164.05
7	5.064	2577006	0.13	826900	0.34	4-Ethylcatechol	123.00
8	5.233	3597382	0.18	832651	0.34	1-Pentadecene	55.00
9	5.290	3126544	0.15	1151445	0.48		147.05
10	5.347	36473896	1.80	30268939	12.54	Benzaldehyde, 2-hydroxy-6-methyl-	136.00
11	5.544	4192870	0.21	1176322	0.49	Benzaldehyde, 2-hydroxy-6-methyl-	136.00
12	5.674	7986829	0.39	981938	0.41	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	119.05
13	5.767	2016056	0.10	720561	0.30	Phenol, 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	191.05
14	5.933	7808130	0.38	759498	0.31		121.00
15	6.025	2396819	0.13	676531	0.28		107.00
16	6.065	2132636	0.11	1007335	0.42	Dodecanoic acid (Acide aliphatique)	73.00
17	6.185	10095815	0.50	720202	0.36		123.00
18	6.387	4339050	0.21	1156945	0.48	Benzophenone	105.00
19	6.585	7050904	0.35	1095723	0.45	2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-, alpha, alpha, 4a,8-tetramethyl-, (2R-cis)-	161.10
20	6.637	4068460	0.20	1082943	0.45		137.00
21	6.708	4137035	0.20	1775068	0.74	2-Naphthalenemethanol, decahydro-, alpha, alpha, 4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	59.00
22	6.742	3170858	0.16	1453995	0.60	2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-, alpha, alpha, 4a,8-tetramethyl-, (2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	59.00
23	6.831	4710340	0.23	1139743	0.47	2-Propanone, 1-(3,5,5-trimethyl-2-cyclohexen-1-ylidene), (2Z)-	145.00
24	6.949	11863751	0.58	1790087	0.74	2-Naphthalenecarboxylic acid, 3,4-dihydro-	129.00
25	7.086	4736613	0.23	973543	0.40	2,6,9,11-Dodecatetraenal, 2,6,10-trimethyl-	95.05
26	7.147	4188678	0.21	982633	0.41	Nonadecane (Hydrocarbure aliphatique)	57.00
27	7.233	2195255	0.11	631504	0.26	Hexadecane, 2,6,10,14-tetramethyl-, (hydrocarbure)	57.00
28	7.313	2269949	0.11	516281	0.24	Retinol, acetate (Tropène)	181.00
29	7.480	3244499	0.16	935440	0.40	Tetradecanoic acid (Acide aliphatique)	73.00
30	7.600	2442580	0.12	583768	0.25		148.10
31	7.708	7423487	0.37	833219	0.36	p-Hydroxycinnamic acid (Acide aromatique)	164.00
32	7.935	8598677	0.42	2259356	0.94	Linal (Isosulfiteur)	149.10
33	8.173	1835026	0.34	1344295	0.57	2,6,9,11-Dodecatetraenal, 2,6,10-trimethyl-	95.05
34	8.380	3601109	0.18	610863	0.25		122.00
35	8.500	1953332	0.10	354313	0.15	Bergamotol, 7Z-alpha-,trans-	93.05
36	8.761	31688561	1.56	536270	2.20		193.95
37	8.838	36947305	1.82	7553979	3.13	3,4-Dimethoxycinnamic acid	208.00
38	9.643	2083145	0.10	350042	0.23	2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)- (Acide aliphatique)	164.00
39	9.848	39114223	1.93	8816713	3.65	n-Hexadecanoic acid (Acide aromatique)	73.00
40	10.034	2307124	0.11	534763	0.24	p-Hydroxycinnamic acid (Acide aromatique)	147.00
41	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
42	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
43	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
44	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
45	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
46	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
47	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
48	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
49	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
50	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
51	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
52	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
53	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
54	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
55	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
56	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
57	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
58	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
59	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
60	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
61	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
62	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
63	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
64	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
65	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
66	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
67	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
68	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
69	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
70	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
71	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
72	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
73	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
74	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
75	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
76	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
77	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
78	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
79	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
80	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
81	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
82	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
83	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
84	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
85	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00
86	10.207	16681238	0.82	380035	0.24	(Flavonolide)	153.00

Tableau 02. GC-MS de la propolis d'EL Milia

Peak#	R. Time	Area	Area%	Height	Height%	Name	Base m/z
1	3.425	691084	0.07	406596	0.26	Phenylethyl Alcohol (Alcool aromatique)	91.00
2	3.776	1217145	0.12	508708	0.32	Benzenecarboxylic acid (Acide aromatique)	122.00
3	3.925	387462	0.04	110394	0.07	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- (Alcool)	71.05
4	4.077	405610	0.04	179994	0.11	1-Tridecene	55.00
5	4.613	847056	0.08	271932	0.17		92.00
6	4.683	313944	0.03	70454	0.04		93.00
7	4.775	440953	0.04	140115	0.09	Benzenepropanoic acid (Acide aromatique)	91.00
8	4.870	294799	0.03	125505	0.08	Benzo[c][1,2,5]-thiadiazole, 4,5,6,7-tetramethyl-	191.95
9	4.917	521162	0.05	303956	0.19	Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy-	164.05
10	5.061	639787	0.06	237467	0.15	4-Ethylcatechol (Flavonoïdes)	123.00
11	5.267	3437288	0.34	719057	0.46	2-Propenoic acid, 3-phenyl- (Acide aliphatique)	147.00
12	5.354	10440457	1.03	3052858	1.94	Benzaldehyde, 2-hydroxy-4-methyl-	136.00
13	5.492	1455198	0.14	326313	0.21	2H-Pyran-2-one, 5,6-dihydro-6-pentyl-	97.00
14	5.675	564958	0.06	97481	0.06	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	119.00
15	5.767	561186	0.06	86347	0.05		191.05
16	5.922	1379871	0.14	586840	0.37	4-Pentenoic acid, 5-phenyl- (Acide aromatique)	117.00
17	5.992	323227	0.03	176853	0.11		59.00
18	6.063	475477	0.05	174766	0.11	Dodecanoic acid (Acide aliphatique)	73.00
19	6.362	936612	0.09	433897	0.28	1-Nonadecene	83.00
20	6.413	1383859	0.14	659187	0.42	Cedrol (Sesquiterpénoides)	95.00
21	6.584	1926445	0.19	545663	0.35	2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetramethyl-, (2R-cis)-	161.05
22	6.634	1148701	0.11	402039	0.26		161.10
23	6.708	2676436	0.26	940421	0.60	2-Naphthalenemethanol, decahydro-.alpha.,.alpha.,4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]-	59.00
24	6.930	6466546	0.64	1654268	1.05	2-Naphthalenecarboxylic acid, 3,4-dihydro-	129.00
25	7.090	1137259	0.11	286594	0.18		73.00
26	7.476	518774	0.05	267329	0.17	Tetradecanoic acid (Acide aliphatique)	73.00
27	7.603	353084	0.03	163046	0.10	2-Naphthalenemethanol, 2,3,4,4a,5,6,7,8-octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetramethyl-, [2R-(2.alpha.,4a.beta.,8a.beta.)]-	149.10
28	7.927	2507292	0.25	1062837	0.68	Leodol (Sesquiterpène)	148.95
29	8.314	1722252	0.17	362378	0.23	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (Ester)	207.95
30	8.656	5859253	0.58	1010351	0.64	3,4-Dimethoxycinnamic acid (Acide aromatique)	149.00
31	9.418	886805	0.09	203264	0.13		164.00
32	9.625	442064	0.04	83632	0.05		73.00
33	9.791	20171815	1.99	5505120	3.50	n-Hexadecanoic acid (Acide aliphatique)	147.05
34	10.011	2175785	0.21	511609	0.33	Bicyclo[5.3.0]decane, 2-methylene-5-(1-methylvinyl)-8-methyl-	88.00
35	10.312	8034097	0.79	2696760	1.72	Hexadecanoic acid, ethyl ester (Ester)	81.05
36	10.504	865775	0.09	240896	0.15		257.15
37	10.617	768798	0.08	243795	0.16	1H-Naphtho[2,1-b]pyran, 3-ethenyldodecahydro-3,4a,7,7,10a-pentamethyl-, [3R-(3.alpha.,4a.beta.,6a.alpha.,10a.beta.,10b.alpha.)]-	105.00
38	11.037	763200	0.08	213107	0.14		95.00
39	11.240	5915033	0.58	1719052	1.09	1-Naphthalenepropanol, .alpha.-ethenyldodecahydro-.alpha.,5,5,8a-tetramethyl-2-methylene-, [1S-(1.alpha.(S*),4a.beta.,8a.alpha.)]-	164.00
40	11.663	2018148	0.20	527944	0.34	2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)- (Acide aliphatique)	147.00
41	12.533	1299914	0.13	300489	0.19	Bicyclo[2.2.2]octa-2,5-diene, 1,2,3,6-tetramethyl-	164.00
42	12.658	4996930	0.49	806182	0.51	p-Hydroxycinnamic acid (Ester)	67.00
43	12.832	7963471	0.79	907530	0.58	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (Acide aliphatique)	55.00
44	13.124	39006695	3.85	5702619	3.63	9-Octadecenoic acid, (E)- (Acide aliphatique)	55.00
45	13.263	3092529	0.31	597109	0.38	Oleic Acid (Acide aliphatique)	93.05
46	13.472	912441	0.09	208074	0.13		67.00
47	13.608	2199069	0.22	530716	0.34	Linoleic acid ethyl ester	73.00
48	13.742	4128355	0.41	676878	0.43		55.00
49	13.873	16643895	1.64	3601725	2.29	Ethyl Oleate (Ester aromatique)	81.05
50	14.402	1816316	0.18	323964	0.21	Kauran-18-ol, 17-(acetyloxy)-, (4.beta.)- (Diterpénoides)	88.00
51	14.769	1133502	0.11	246484	0.17	Octadecanoic acid, ethyl ester (Ester)	93.05
52	14.933	518180	0.05	104332	0.07		81.05
53	15.109	3664570	0.36	585147	0.37		193.95
54	15.275	4602318	0.45	910525	0.58	2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- (Acide aliphatique)	81.05
55	15.639	21462895	2.12	4019659	2.56	9,19-Cyclolanostan-3-ol, acetate, (3.beta.)-	107.05
56	15.828	1532354	0.15	285797	0.18	2-Butenal, 2-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-	121.05
57	16.317	3073842	0.30	519683	0.33		121.10
58	16.555	6292164	0.62	727562	0.46		191.05
59	16.753	603897	0.06	145972	0.09		271.10
60	16.977	15672236	1.55	2601247	1.66	2-Phenanthrenol, 4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahydro-4b,8,8-trimethyl-1-(1-methylethyl)-, (4bS-trans)-	271.10
61	17.542	2819280	0.28	177528	0.11		97.05
62	17.811	1301260	0.13	310208	0.20	9-Tricosene, (Z)-	79.00
63	18.106	1165495	0.12	243714	0.16		81.00
64	18.653	7877399	0.78	898919	0.57		270.00
65	18.948	33841263	3.34	3308918	2.11	Pinostrobin Chalcone (Flavonoïde)	57.05
66	19.192	10517440	1.04	1802673	1.15		119.05
67	19.257	10009701	0.99	2051846	1.31	1-Naphthalenecarboxylic acid, decahydro-1,4a-dimethyl-6-methylene-5-(3-methyl-2,4-pentadienyl)-, methyl ester, [1S-(1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)]-	69.05
68	19.335	4205112	0.42	540779	0.34	2-Dodecen-1-yl(-)succinic anhydride	131.00
69	20.182	2772872	0.27	668690	0.43	Cinnamyl cinnamate (Ester)	179.95
70	20.550	27817613	2.75	4673659	2.97		121.05
71	20.640	32378520	3.20	6196093	3.94		283.05
72	20.982	1469142	0.15	372454	0.24	1-Phenanthrenecarboxylic acid, 1,2,3,4,4a,9,10,10a-octahydro-1,4a-dimethyl-7-(1-methylethyl)-, [1R-(1.alpha.,4a.beta.,10a.alpha.)]-	81.05
73	21.212	27417519	2.71	5747862	3.66	9,19-Cycloergost-24(28)-en-3-ol, 4,14-dimethyl-, acetate, (3.beta.,4.alpha.,5.alpha.)-	255.95
74	21.452	95425646	9.42	11966496	7.62	Pinocembrin (Flavonoïde)	69.00
75	21.532	37095760	3.66	9900604	6.30	(1S,2E,4S,5R,7E,11E)-Cembra-2,7,11-trien-4,5-diol	189.05
76	21.827	11336177	1.12	1735563	1.10	9,19-Cyclolanostan-3-ol, acetate, (3.beta.)-	302.10
77	21.917	2481367	0.24	635190	0.40	Abietic acid (Ester)	69.00
78	22.008	772495	0.08	239142	0.15	Cyclooctanecarboxaldehyde	69.05
79	22.091	1246690	0.12	339584	0.22	Bicyclo[4.3.0]nonane, 2,2,6,7-tetramethyl-7-hydroxy-	105.00
80	22.546	7028243	0.69	1282659	0.82		285.05
81	22.683	772014	0.08	197322	0.13		153.00
82	22.808	1332554	0.13	217144	0.14	Naringenin (Flavonoïde)	82.00
83	22.989	5560599	0.55	1023221	0.65		81.05
84	23.127	23880562	2.36	4536881	2.89	1-Naphthalenemethanol, decahydro-5-(5-hydroxy-3-methyl-3-pentenyl)-1,4a-dimethyl-6-methylene-, [1S-(1.alpha.,4a.alpha.,8a.alpha.)]-	189.05
85	23.422	43926379	4.34	5400522	3.44		91.00
86	23.522	35287008	3.48	4061887	2.59		125.00
87	23.711	17042464	1.68	2255599	1.44		57.05
88	24.064	5040399	0.50	673212	0.43	Nonacosane	189.05
89	24.192	1544690	0.15	256778	0.16		121.10
90	24.590	78542721	7.75	7341700	4.67	Kauren-18-ol, acetate, (4.beta.)-	57.00
91	25.149	2532629	0.25	448584	0.29	Ethyl iso-allocholate	153.00
92	25.368	6122156	0.60	658404	0.42		253.95
93	25.814	145494889	14.36	1294099	8.24	Chrysin (Flavonoïde)	125.00
94	26.131	6423763	0.63	1298479	0.83	Acetic acid, 1-[2-(2,6-trimethyl-bicyclo[4.1.0]hept-1-yl)-ethyl]-vinyl ester (Ester)	121.05
95	26.511	6540685	0.65	1304337	0.83	Kauren-18-ol, acetate, (4.beta.)-	282.95
96	26.757	4670048	0.46	657993	0.42		269.95
97	27.025	21315912	2.10	2413493	1.54	Galangin (Flavonoïde)	285.95
98	27.317	8075089	0.80	700140	0.45		117.00
99	27.559	2019752	0.20	360731	0.23		153.00
100	27.860	5886387	0.58	522947	0.33		97.05
101	28.139	386568	0.04	134866	0.09	1-Nonadecene	97.10
102	28.256	455877	0.05	133659	0.09	1-Tetracosanol	147.00
103	28.675	7426137	0.73	753041	0.48	Benzene, 1-(1,1-dimethylethyl)-4-ethyl-	57.00
104	28.957	1002561	0.10	202502	0.13		57.00
105	29.805	1206419	0.12	260858	0.17	Dotriacontane	57.00
106	30.178	7586202	0.75	1173633	0.75		57.00
107	30.791	4652509	0.46	864318	0.55	Tetrapentacontane, 1,54-dibromo-	57.05
108	31.424	5948394	0.59	772431	0.49		117.00
109	32.403	4527139	0.45	669100	0.43	Propenoic acid, 3-(cycloheptatrien-7-yl)-, methyl ester (Ester)	343.90
110	36.343	5154886	0.51	657535	0.42	9,9'-Spirobis(fluorene), 2,2'-dimethyl-	
		1013031456	100.00	157114716	100.00		

Tableau 03. GC-MS de la propolis d'Oudjana

Peak#	R.Time	Area	Area%	Height	Height%	Name	Base m/z
1	3.437	254155	0.08	86260	0.17	Phenylethyl Alcohol	91.05
2	3.808	274314	0.09	61798	0.12	Methanol, oxo-, benzoate (Acide aromatique)	105.00
3	4.076	265694	0.08	205303	0.41	1-Tridecene	55.00
4	4.926	797110	0.25	358141	0.72	Benzene, 4-ethenyl-1,2-dimethoxy-	164.05
5	5.095	452732	0.14	118695	0.24	4-Ethylcatechol (Flavonoïdes)	123.00
6	5.234	771778	0.24	466465	0.94	1-Pentadecene	55.00
7	5.297	545918	0.17	196867	0.40		57.00
8	5.380	5911097	1.86	984306	1.97	Benzaldehyde, 2-hydroxy-6-methyl-	136.00
9	5.608	477258	0.15	135307	0.27	cis-1-Chloro-9-octadecene	70.05
10	5.675	292604	0.09	128446	0.26	Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-4-methyl-	119.05
11	5.935	561223	0.18	101497	0.20		73.00
12	6.364	613638	0.19	349268	0.70	1-Heptadecene	83.05
13	6.414	636601	0.20	278368	0.56	Cedrol (Sesquiterpénoides)	95.05
14	6.517	261100	0.08	87568	0.18	Acetic acid, octadecyl ester (Ester)	55.00
15	6.583	396817	0.12	194768	0.39	2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-, alpha., alpha., 4a,8-tetramethyl-, (2R-cis)- (Huile essentiel)	161.10
16	6.634	263493	0.08	94103	0.19	tau-Cadinol (Terpène)	161.10
17	6.708	767499	0.24	431209	0.87	2-Naphthalenemethanol, decahydro-, alpha., alpha., 4a-trimethyl-8-methylene-, [2R-(2.alpha.,4a.alpha.,8a.beta.)]- (HE)	59.00
18	6.738	545064	0.17	366613	0.74		59.00
19	6.918	776842	0.24	138210	0.28	alpha.-Bisabolol (Huile essentiel)	69.05
20	7.104	524016	0.16	205257	0.41	3-Isopropoxy-1,1,1,7,7,7-hexamethyl-3,5,5-tris(trimethylsiloxy)tetrasiloxane	73.00
21	7.926	1314705	0.41	442177	0.89	Veridiflorol (Sesquiterpène)	59.00
22	8.325	402055	0.13	138350	0.28	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester (Ester)	149.00
23	8.652	1643360	0.52	450035	0.90	3,4-Dimethoxycinnamic acid (Acide aromatique)	208.00
24	8.708	971021	0.31	305714	0.61	1,1,1,3,5,7,9,11,11,11-Decamethyl-5-(trimethylsiloxy)hexasiloxane	73.00
25	9.766	4111562	1.29	1345517	2.70	n-Hexadecanoic acid (Acide aliphatique)	73.00
26	9.860	952131	0.30	203097	0.41	Lanceol, cis (Sesquiterpénoides)	93.05
27	10.020	717934	0.23	162964	0.33		147.00
28	10.312	2590982	0.81	716626	1.44	Hexadecanoic acid, ethyl ester (Ester)	88.00
29	11.236	1556794	0.49	464717	0.93	1-Naphthalenepropanol, alpha.-ethenyldecahydro-2-hydroxy-, alpha., 2,5,5,8a-pentamethyl-, [1R-[1.alpha.(R*),2.beta.,4a.	95.05
30	11.671	1669235	0.52	338571	0.68	2-Propenoic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)- (Acide aliphatique)	163.95
31	11.800	378007	0.12	82919	0.17		93.05
32	12.659	3079024	0.97	364003	0.73	p-Hydroxycinnamic acid (Ester)	164.00
33	13.037	6921466	2.17	1162017	2.33	Oleic Acid (Acide aliphatique)	55.00
34	13.225	382842	0.12	58367	0.12		95.05
35	13.600	358526	0.11	86985	0.17		67.00
36	13.708	604788	0.19	144261	0.29		55.00
37	13.861	3600184	1.13	783144	1.57	Ethyl Oleate (Ester aromatique)	55.00
38	14.759	524504	0.16	99197	0.20		88.00
39	15.116	409410	0.13	87699	0.18		95.05
40	15.253	797805	0.25	155904	0.31		193.95
41	15.599	5522820	1.74	1136212	2.28	Kauran-18-al, 17-(acetyloxy)-, (4.beta.)- (Huile essentiel)	81.05
42	16.277	760791	0.24	150014	0.30	gamma-Elementene	247.00
43	16.482	807992	0.25	111143	0.22		121.10
44	16.948	6165870	1.94	1085347	2.18	2-Phenanthrenol, 4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahydro-4b,8,8-trimethyl-1-(1-methylethyl)-, (4bS-trans)- (Flavonoïdes)	271.10
45	17.810	351072	0.11	68745	0.14	9-Hexacosene	97.10
46	18.633	1543437	0.48	204061	0.41		81.05
47	18.858	11295220	3.55	1908297	3.83		180.00
48	18.927	13347622	4.19	2270646	4.56	2-Propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-, (E)-	270.00
49	19.146	5511482	1.73	751302	1.51	2H-Pyran, 2-(7-heptadecynyl)oxytetrahydro-	57.05
50	20.512	26251257	8.25	3202000	6.42	2,3,3-Trimethyl-2-(3-methylbuta-1,3-dienyl)-6-methylenecyclohexanone	69.05
51	20.933	1105244	0.35	98860	0.20		97.10
52	21.180	5512045	1.73	1257263	2.52	9,19-Cycloergost-24(28)-en-3-ol, 4,14-dimethyl-, acetate, (3.beta.,4.alpha.,5.alpha.)-	81.05
53	21.340	29943955	9.41	4651287	9.33	4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-, (S)- (Flavonoïdes)	256.00
54	21.804	1947187	0.61	305422	0.61		149.00
55	21.968	833371	0.26	187272	0.38	2-Naphthalenol, 1,2,3,4-tetrahydro-3-(1-hydroxy-1-methylethyl)-5-methoxy (Terpénoides)	175.05
56	22.064	680846	0.21	175773	0.35	2,4a,8,8-Tetramethyldecahydrocyclopropa[d]naphthalene	95.05
57	22.560	2111707	0.66	250930	0.50	2-Benzoyloxy-1,1,10-trimethyl-6,9-epidioxycalinal	105.00
58	23.074	4172718	1.31	778816	1.56	1-Naphthalenemethanol, decahydro-5-(5-hydroxy-3-methyl-3-pentenyl)-1,4a-dimethyl-6-methylene-, [1S-[1.alpha.,4a.alpha.]	81.05
59	23.282	3081279	0.97	437930	0.88		55.00
60	23.481	15646325	4.92	1339139	2.69		268.00
61	23.961	1783874	0.56	334183	0.67	2H-1-Benzopyran-2-one, 7-methoxy-6-(3-methyl-2-butenyl)-	228.95
62	24.058	383220	0.12	124434	0.25	Heptadecane	57.00
63	24.372	17300114	5.44	2299156	4.61	Cycloheptane, 4-methylene-1-methyl-2-(2-methyl-1-propen-1-yl)-1-vinyl- (Huile essentiel)	121.05
64	24.492	2265941	0.71	372254	0.75		283.95
65	24.767	378989	0.12	42116	0.08		207.05
66	25.309	1899821	0.60	281544	0.56		153.00
67	25.750	44079179	13.85	4327453	8.68	Naringenin (Flavonoïdes)	153.00
68	25.901	8302175	2.61	1077950	2.16	2-Allyl-1,4-dimethoxy-3-vinylloxymethylbenzene	191.00
69	26.130	5887663	1.85	666951	1.34	2H-1-Benzopyran-2-one, 7-methoxy-6-(3-methyl-2-butenyl)-	228.95
70	26.384	24880995	7.82	3684818	7.39	Ethanone, 1-[6-(1,1-dimethylethyl)-2,3-dihydro-1,1-dimethyl-1H-inden-4-yl]- (Terpène)	228.95
71	26.464	10768353	3.38	1981747	3.98		231.00
72	26.709	2977953	0.94	343820	0.69		283.00

Evaluation de l'effet hépatoprotecteur de l'Extrait Brut de la propolis contre la toxicité de l'aflatoxine B1 chez les Rats.

Résumé : L'aflatoxine B1 est un agent potentiellement hépatotoxique et hépatocarcinogène, sa toxicité est principalement due à des dommages peroxydatifs et à la formation des espèces réactifs de l'oxygène. Notre étude vise à évaluer l'effet hépatoprotecteur de la propolis contre la toxicité induite par l'AFB1. L'étude phytochimique a montré que la propolis est riche polyphénols et en flavonoïdes et possède une activité anti-radicalaire concentration dépendante contre le radical libre DPPH°. La composition chimique qualitative et quantitative dépend de l'origine botanique de la propolis. L'effet hépatoprotecteur de la propolis est comparé à celui de la quercétine, un flavonoïde hépatoprotecteur de référence. L'augmentation des taux de la lactate déshydrogénase, phosphatase alcaline, bilirubine et transaminases dans le sérum des rats traités par une dose unique intrapéritonéale d'AFB1 (1mg/kg) suggère la présence d' atteintes hépatiques. Une augmentation significative dans le niveau du malondialdéhyde, avec une diminution concomitante des systèmes antioxydants enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion-s-transférase) et non enzymatique (glutathion) ont été également observé au niveau du foie des rats traités par l'AFB1. Chez les rats prétraités par la propolis (100mg/kg/orale) ou la quercétine (10mg/kg/orale), diminue les effets délétères de l'AFB1 et protège la fonction hépatique par le maintien des paramètres sériques et ceux du stress oxydant à des taux normaux. Les taux des paramètres sériques et ceux du stress oxydant sont revenu à la normale. L'effet hépatoprotecteur de la propolis est confirmé par l'étude histologique.

Mots clés: Aflatoxin B1, propolis, composés phénoliques, hépatotoxicité, stress oxydant.

Abstract: Aflatoxin B1 is a potent hepatotoxic and hepatocarcinogenic agent. Reactive oxygen species and consequent peroxidative damages are considered to be the main mechanisms leading to its hepatotoxicity. The present investigation aims to assessing the hepatoprotective effect of propolis, on aflatoxin B1- induced hepatotoxicity in a rat model. The phytochemical study showed that propolis is rich in polyphenols and flavonoids and have a concentration dependant anti-radical activity against DPPH° radicals. Its qualitative and quantitative chemical composition depends on its botanical origin. The hepatoprotective effect of propolis is compared with that of quercetin, a standard hepatoprotective flavonoid. Bilirubine, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, alanine and aspartate aminotransferases were found to be significantly increased in the serum of AFB1 administered rats, suggesting hepatic damages. Marked increase in malondialdehyd levels and a concomitant decrease in the enzymatic (superoxide dismutase, catalase, and glutathione-S-transferase) and non enzymic (reduced glutathione) antioxidants in the hepatic tissue were observed in AFB1 administered rats. Pretreatment with propolis (100 mg/kg body mass/ orally) and quercetin (10 mg/kg body mass/ orally) reverted biochemical and oxidative stress parameters to near normalcy. Hepatoprotection by propolis is further substantiated by the normal histologic findings.

Keywords: Aflatoxin B1, propolis, polyphenolic compounds, hepatotoxicity, oxidative stress.

ملخص: الأفلاتوكسين ب1 هو عامل مسمم ومسرطن للكبد، سميته تعزى أساسا الى تسببه في حدوث تلف بيروكسيدي وإنتاج كبير للجذور الحرة. دراستنا تهدف الى تقييم الدور الوقائي للدنج ضد السمية الكبدية للأفلاتوكسين ب1. أظهرت الدراسة الكيميائية غنى مادة الدنج بمتعددات الفينول والفلافونويدات، كما بينت أن لها خاصية أسرة للجذر الحر DPPH° مرتبطة بالتركيز. التركيب الكمي والنوعي مرتبط بالأصل النباتي لمادة الدنج. تمت مقارنة تأثير مادة الدنج بفلافونويد (مرجعي الكرسيتين). لوحظ ارتفاع معتبر في كمية المعايير البيوكيميائية (Lactate déshydrogénase، Transaminases، Bilirubine، Phosphatase alcaline) في مصل الجرذان المعاملة بالأفلاتوكسين ب1 (100 مغ/كغ)، وهذا ما يؤكد حدوث تلف على مستوى النسيج الكبدى. كما لوحظ ارتفاع في نسبة malondialdéhyde مصحوبا بنقصان في كمية مضادات الأكسدة الأنزيمية (Superoxyde، Glutathion-s-transférase، Catalase، dismutase)، وغير الأنزيمية (Glutathion) في الخلايا الكبدية. المعالجة المسبقة للجرذان بالدنج (100 مغ/كغ)، والكرستين (10 مغ/كغ) تعيد قيم المعايير البيوكيميائية ومعايير الإجهاد التأكسدي إلى حالتها العادية. الدراسة النسيجية تؤكد الدور الوقائي لمادة الدنج.

الكلمات المفتاحية: أفلاتوكسين ب1، الدنج، متعددات الفينول، السمية الكبدية، الإجهاد التأكسدي.