

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحيى-جيجل-

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة
قسم البيولوجيا الخلوية والجزيئية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option: Biochimie

Thème

Etude de l'effet de l'extrait éthanolique de la propolis sur la
génotoxicité et le stress oxydatif hépatique induit par le
valsartan, un antagoniste de l'angiotensine II

Membres du Jury:

Présidente : Dr. BOUTENNOUN H.
Examineur : Dr. BENGUEDOUAR L.
Encadreur : Dr. BOUHAFS L.

Présenté par:

Bouzok Fatma
Bouchkara Ratiba
Boutebakh Yassamine

Numéro d'ordre :

Année Universitaire : 2018-2019

Remerciements

Nous remercions d'abord Allah qui nous a donné la force et la volonté de développer ce travail.

C'est avec un énorme plaisir que nous réservons ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l'aboutissement de ce travail.

Nos vifs remerciements vont notre encadreur Dr. Bouhafis Leila pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils et ses orientations enrichissantes de ce travail.

Nous tenons à remercier infiniment les membres du jury :

Dr. Boutennoun Hanane, qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de soutenance.

Dr. Benguedouar Lamia, pour avoir accepté de prendre part au jury de soutenance, tout le plaisir est pour nous.

Nos sincères remerciements vont également : a ingénieurs de laboratoire de Pharmacologie Expérimentale (Université de Jijel).

Dédicace

Au nom d'ALLAH, le tout Miséricordieux le très Miséricordieux

Je remercie Allah Le tout puissant, clément et Miséricordieux de m'avoir motivé à réaliser ce modeste travail, en suite je remercie infiniment mes parents qui m'ont encouragé et aidé à arriver à ce stade de formation.

*Je dédie ce modeste travail à ma mère **Rahima**, qui a sacrifiée sa vie afin de réussir dans le parcours de l'enseignement, celle qui est restée toujours à mes côtés dans les moments rudes de ma vie.*

*Je dédie ce modeste travail à mon père **Ahcen**, qui m'a accompagné durant les moments les plus pénibles de ce long parcours de mon éducation.*

*A mes frères **Walid, Aziz, Ammar** et sa femme **Meriem** et leur fils **Joujou, Adel** et sa femme **Dounia**,*

*A ma sœur **Siham** et son époux **Ali** et leurs fils **Islam** et **Iyad**, à **Meriem** et son époux **Aimed** et leur fille **Amani**, et à **Douaa**.*

*A mon mari **Hamid**, ma belle –mère **Wardia**.*

A tous mes amis

*A mon trinôme et également à toute la promotion **Master II Biochimie, 2019**.*

A tous ceux qui ont, contribué de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire.

Fatma

Dédicace

Au nom d'ALLAH, le tout Miséricordieux le très Miséricordieux

Je remercie Allah Le tout puissant, clément et Miséricordieux de m'avoir motivé à réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

A ma Mère : Fatiha

“Tu m’as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t’offrir ne pourra exprimer l’amour et la reconnaissance que je te porte. En témoignage, je t’offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l’affection dont tu m’as toujours entourée “

A mon Père : Abd-Rahman

”L’épaule solide, l’œil attentif compréhensif et la personne a plus digne de mon estime et de mon respect. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Allah te préserve et procure santé et longue vie “

A mes frères Habib et Ramzi, et mes sœurs Nounou, Kroma, Wiwi, Assia, Ilham, Souhila.

A mon oncle Mohamed et sa famille, spécialement Zouheyr et Amina.

A mes amis Yassamine, Fatma, Sawzan, Souhila, Zina, Nadjjet et Nada.

A toute la promotion 2019.

A tous ceux qui ont, contribué de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire.

Ratiba

Dédicace

À L'aide d'Allah, le tout puissant, on a pu réaliser ce travail, que je dédie en signe de respect et de reconnaissance à :

La fleur de ma vie: ma mère «FATIHA» pour sa tendresse, sa gentillesse et son sacrifice, à mon père "ZAHY" pour sa sympathie et son sacrifice afin de nous rendre la vie aisée.

À mes chères sœurs SARAH, WIAM, NEDJLA,

IMAN et son mari AIMEN et leur fils HAZEM

"Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Allah vous préserve et procure santé et longue vie "

Je passe également la dédicace à tous mes amis, à toutes personnes que j'aime, et à tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire.

À mon trinôme FATMA et RATIBA, pour tous les bons moments que l'on a pu passer ensemble.

Finalement à toute la promotion master II Biochimie 2019.

Yassamine

Liste de figures	
Liste de tableaux	
Liste d'abréviations	
Introduction.....	01

Synthèse bibliographique

Chapitre I : La génotoxicité

I.1. Définition.....	03
I.2. Agents génotoxiques.....	03
I.2.1. Agents chimiques.....	03
I.2.2. Agents physiques.....	04
I.2.3. Agents biologiques.....	04
I.3. Mécanisme de la génotoxicité.....	04
I.3.1. Les lésions primaires.....	04
I.3.2. Les mutations géniques.....	05
I.3.3. Les mutations chromosomiques.....	05
I.4. Exploration.....	06
I.4.1. Test de comète.....	06
I.4.2. Test d'âmes.....	07
I.4.3. Test de micronoyaux.....	07
I.4.3.1. Historique.....	07
I.4.3.2. Définition.....	07
I.4.3.3. Principe et but de test.....	08
I.4.3.4. Mécanisme de formation des micronoyaux.....	08
I.4.3.5. Les avantages et les inconvénients.....	09

Chapitre II : Le valsartan

II.1. Généralités.....	10
II.2. Propriétés physico-chimiques.....	10
II.3. Pharmacocinétique.....	11
II.4. Pharmacodynamique.....	12
II.5. Effets indésirables.....	13
II.6. Toxicité aiguë et chronique.....	13

Chapitre III : La propolis

III.1. Origine et composition chimique.....	15
---	----

III.2. Les propriétés physico-chimique.....	15
III.2.1. Les propriétés physiques.....	15
III.2.2. Les propriétés chimiques.....	16
III.3. Les propriétés thérapeutiques.....	16
III.3.1. L'activité hépatoprotectrice.....	16
III.3.2. L'activité antioxydante.....	16
III.3.3. Autres propriétés.....	17

Etude expérimentale

Matériel et méthodes

I. Matériel.....	19
I.1. Valsartan.....	19
I.2. Cyclophosphamide.....	19
I.3. Propolis.....	19
I.4. Matériel biologique et condition d'élevage.....	19
I.5. Répartition et traitement des animaux.....	19
I.6. Sacrifice et prélèvement des organes.....	20
II. Méthodes.....	21
II.1. Test de micronoyaux dans le sang périphérique.....	21
II.1.1. Principe.....	21
II.1.2. Mode opératoire.....	21
II.1.3. Lecture.....	22
II.2. Exploration du stress oxydatif tissulaire hépatique.....	22
II.2.1. Dosage du MDA cytosolique.....	22
II.2.2. Mesure de l'activité des antioxydants.....	22
II.2.2.1. Mesure de l'activité des antioxydants enzymatiques.....	22
II.2.2.1.1. Préparation de la fraction cytosolique.....	22
II.2.2.1.2. Mesure de l'activité de la catalase (CAT).....	23
II.2.2.1.3. Mesure de l'activité du superoxyde dismutase (SOD).....	23
II.2.2.2. Dosage de l'antioxydant non enzymatique (le glutathion GSH).....	23
II.2.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	24
II.3. Etude histologique.....	24
II.4. Evaluation statistique.....	24

Résultats et discussion

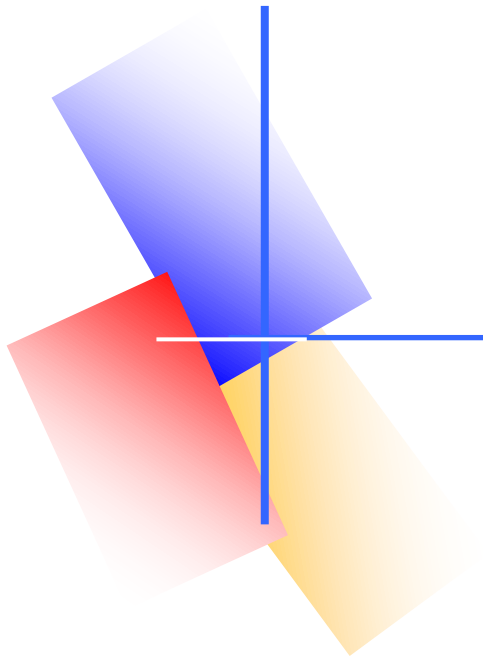
I. Effet des traitements sur le taux de mortalité.....	25
II. Effet des traitements sur l'étude macroscopique.....	25
III. Effet des traitements sur le taux de micronoyaux.....	27
IV. Effet des traitements sur le stress oxydatif tissulaire hépatique.....	30
IV.1. Effet des traitements sur l'MDA.....	30
IV.2. Effet des traitements sur le GSH.....	33
IV.3. Effet des traitements sur les enzymes antioxydantes (CAT et SOD).....	35
IV.3.1. Sur l'activité enzymatique de la CAT.....	35
IV.3.2. Sur l'activité enzymatique de la SOD.....	36
V. Effet des traitements sur l'histologie hépatique.....	38
Conclusion.....	40
Références bibliographiques.....	41
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes liaisons premières qui touchent l'ADN.....	05
Figure 2 : Schéma représente une insertion chromosomique et une délétion chromosomique.	05
Figure 3 : Représentation schématique d'une inversion chromosomique et translocation réciproque.....	06
Figure 4 : Exemples d'observation des noyaux par le test des comètes.....	07
Figure 5 : Schéma représente la formation des micronoyaux.....	09
Figure 6 : La formule chimique de valsartan.....	10
Figure 7 : métabolisation de valsartan en valeryl-4-hydroxy VAL.....	12
Figure 8 : Représente le mécanisme d'action de valsartan.....	13
Figure 9 : Photographie représente certains exemplaire des frottis réaliser pour le test de micronoyaux.....	28
Figure 10 : Variation des taux cytosolique du MDA hépatique des souris intoxiquées par le valsartan et le cyclophosphamide et prétraitées par l'EEP.....	32
Figure 11 : Evaluation de l'activité cytosolique de la GSH dans les tissus hépatiques des souris intoxiquées par le valsartan et le cyclophosphamide et prétraitées par l'EEP.....	34
Figure 12 : Variation des taux cytosolique du CAT hépatique des souris intoxiquées par le valsartan et le cyclophosphamide et prétraitées par l'EEP.....	36
Figure 13 : Variation des taux cytosolique du SOD hépatique des souris intoxiquées par le valsartan et le cyclophosphamide et prétraitées par la propolis.....	37
Figure 14 : Coupes histologiques du foie des lots témoin positif (photos A), traité par valsartan (photos B ₁ , B ₂ , B ₃ et B ₄), traité par propolis + valsartan (photo C) et traité par propolis + cyclophosphamide après coloration à le H&E (GR : × 40).....	39

Tableau 1 : Représente les propriétés physico-chimiques de valsartan.....	11
Tableau 2 : Représente les résultats de test de la toxicité aigue.....	14
Tableau 3 : Représente les résultats de test de a toxicité chronique.....	14
Tableau 4 : Composition chimique de la propolis brute.....	15
Tableau 5 : Représente le taux de mortalité des souris de différents lots pendant la période de traitement (exprimé en pourcentage %)......	25
Tableau 6 : Représente le taux des Micronoyaux chez les souris de différents lots de l'expérience, exprimée en moyenne \pm écart type.....	27

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
BBC	Bleu Brillant de Coomassie
BSA	Bovin Sérum Albumine
CAT	Catalase
CD-4	Cluster de différenciation 4
CD-8	Cluster de différenciation 8
CP	CycloPhosphamide
CRD	Centre de Recherche et de Développement
CYP450	Cytochrome P 450
DSEIO	Dose sans effet indésirable observable
DSEO	Dose sans effet observable
DTNB	Acide 5,5'-DiThio-bis-2-NitroBenzoïque
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EEP	Extrait Ethanolique de la Propolis
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
MDA	Malondialdéhyde
MGG	May –Grünwald Giemsa
MN	Micronoyaux
NDMA	N-nitrosodiméthylamine
SCE	Sister Chromatid Exchange
SOD	SuperOxyde Dismutase
TBA	ThioBarbituric Acid
TCA	TriChloroacetic Acid
TNF	Tumor Necrosis Factor



Introduction

générale

Les antagonistes du récepteur de type 1 de l'angiotensine II ont été largement utilisés dans le traitement de maladies telles que l'hypertension, l'insuffisance cardiaque, l'infarctus du myocarde et la néphropathie diabétique. Leurs effets bénéfiques sont liés à l'inhibition de l'angiotensine II par le blocage du récepteur AT1. Le valsartan est un antagoniste compétitif puissant et sélectif des récepteurs AT1 de l'angiotensine II, indiqué pour le traitement de l'hypertension artérielle. En bloquant les récepteurs sur lequel l'angiotensine II se fixe normalement, le valsartan met fin à l'action de cette hormone, ce qui permet aux vaisseaux sanguins de s'élargir et entraîne une diminution de la pression artérielle (Mehtap et Sevgi, 2017).

Ce médicament a été développé pour la première fois par Novartis et couvre un vaste marché dans les pays développés et les pays en développement. Le valsartan est considéré comme une très bonne cible pour les industries génériques (Deka et Bhattachaarjee, 2018).

En juillet 2018, la United Stat Food and Drug Administration (USFDA) et l'Agence Européenne des Médicaments (EMA) annoncent un défaut de qualité affectant certaines spécialités à base de valsartan. Il s'agit d'une impureté dénommée la N-Nitrosodiméthylamine (NDMA) appartenant à la classe des nitrosamines, apparue au cours de la fabrication de la substance active (Deka et Bhattachaarjee, 2018 ; Naseem *et al.*, 2019 ; Parr et Joseph, 2019).

L'alerte a vite été relayée par plusieurs pays du monde, entraînant le retrait des médicaments fabriqués à base du principe actif : le valsartan.

Comme le valsartan est largement prescrit en Algérie vu la prévalence de l'hypertension, de l'insuffisance cardiaque, des maladies coronariennes et de diabète, et à l'instar de ce qui se fait à l'échelle mondiale, le ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière a annoncé, dans un communiqué (Courier n°35, MSPRH/DPP/SDPPP. 7Juillet 2018) par précaution, le retrait des lots de 16 spécialités pharmaceutiques à base de valsartan.

La NDMA est classée comme un cancérigène probable pour l'homme (CIRC, 1978 ; Fournier *et al.*, 2006).

Il est aussi largement admis que la NDMA induit une fibrose hépatique et une cirrhose (Haggerty et Holsapple, 1990).

La NDMA est une molécule fortement génotoxique même à faible dose (ATSDR et EPA, 1989), la toxicité est provoquée par des métabolites intermédiaires produits lors du métabolisme de la NDMA plutôt que par le composé d'origine lui-même. La génération élevée de radicaux libres par la NDMA contribue à l'augmentation du stress oxydatif (Areeba *et al.*, 2011).

Par ailleurs le risque du stress oxydatif est largement accepté comme étant un composant critique de la plupart des voies pathologiques (Mostafalou et Abdollah, 2013).

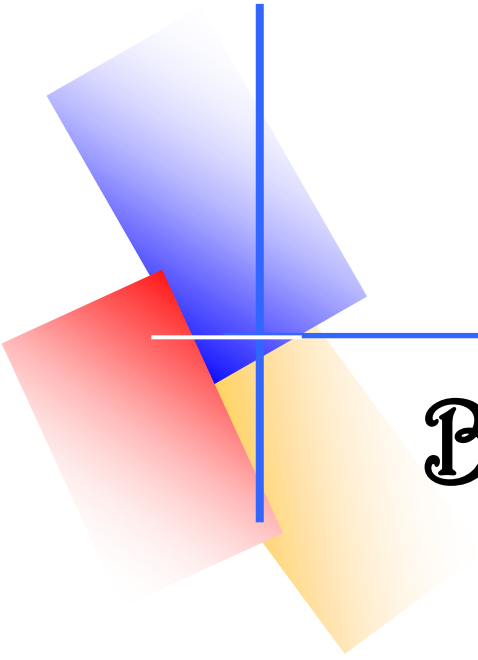
Récemment, beaucoup d'attention a été accordé à l'utilisation de nouvelles substances à activité antioxydante. La propolis ; substance résineuse, gommeuse et balsamique, recueillie par les abeilles sur certaines parties des végétaux, acquiert un intérêt particulier dans les recherches contemporaines grâce à ses propriétés biologiques résultant de sa richesse en composé phénoliques, notamment, les flavonoïdes et les acides phénolique (José et Sforcin, 2016).

Une littérature abondante et encore en pleine expansion s'exerce pour confirmer l'effet protecteur de la propolis contre le stress oxydatif induit beaucoup plus par les médicaments utilisés en chimiothérapie.

Lahouel *et al.* (2004) ont démontré que l'extrait de la propolis algérienne a un effet protecteur contre le stress hépatique et rénal induit par le cyclophosphamide ; cette même propolis a prouvé son efficacité dans la protection des reins contre la toxicité de la doxorubicine (Lahouel *et al.*, 2010). D'autres études ont montré sa capacité anti-mutagéniques (Benguedouar *et al.*, 2016).

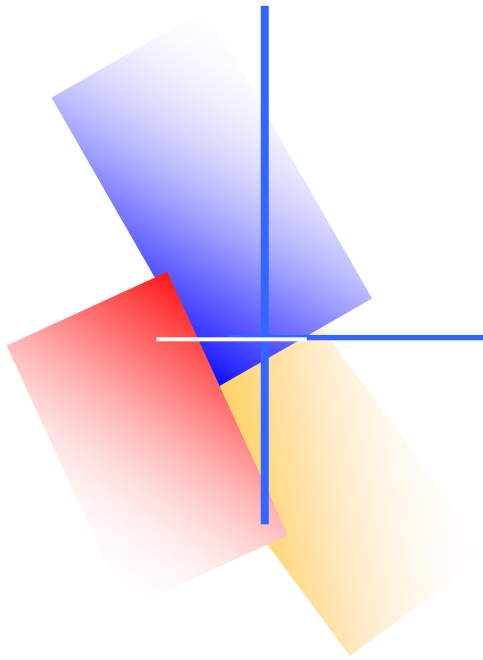
Comme l'effet protecteur de la propolis contre la génotoxicité et le stress oxydatif du valsartan n'a jamais été abordé dans la littérature, nous nous sommes alors intéressées de contribuer à ce sujet d'actualité.

L'objectif de notre étude est d'abord, d'évaluer la génotoxicité du valsartan dans le sang périphérique par le test de micronoyaux en prenant le cyclophosphamide comme témoin positif, ce dernier est un anticancéreux de la famille des immunosuppresseurs connu par sa génotoxicité (Rehman *et al.*, 2012), évaluer le stress oxydatif ainsi que l'histopathologie au niveau hépatique ; et d'autre part étudier l'effet protecteur de la propolis contre cette toxicité.



Synthèse

Bibliographique



Chapitre I

La génotoxicité

I.1. Définition

La définition de la génotoxicité selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 1993) inclut à la fois des effets directs et indirects sur l'ADN. La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, se définit comme la capacité de certains agents physiques, chimiques ou biologiques dits « génotoxiques » à induire des dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations géniques ou chromosomiques (Dégrement et Cachot, 2009). Les modifications du matériel génétique causées par ces dommages, dans le cas où ils ne sont pas ou sont mal réparés, pourront alors avoir des conséquences délétères sur l'organisme (Graillot, 2012).

Pour que les dommages conduisent à des mutations, ils doivent persister dans l'ADN après un cycle de réplication. Une mutation peut impliquer des réarrangements importants ou n'affecte qu'une ou quelques paires de bases (Elespuru et Sankaranarayanan, 2007). Les effets seront différents en fonction de la localisation de la mutation : si elle touche les cellules germinales, elle peut occasionner un défaut génétique héréditaire, alors que si elle affecte les cellules somatiques, elle peut être à l'origine de l'initiation d'un processus de cancérogenèse (Erickson, 2010).

I.2. Agents génotoxiques

Les agents génotoxiques participent à l'initiation du cancer en introduisant dans l'ADN des lésions, transmissibles au génome des cellules filles lors de la division cellulaire. Ils peuvent également participer à la phase de progression de la tumeur. De plus, l'accumulation de dommages à l'ADN dans les cellules somatiques peut jouer un rôle dans le processus de vieillissement accéléré, le dysfonctionnement de l'immunité, des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Flora et Izzotti, 2007 ; Hoeijmakers, 2009 ; Slatter et Gennery, 2010).

I.2.1. Agents chimiques

Ce sont des mutagènes électrophiles qui établissent une liaison covalente avec un site nucléophile d'une base d'ADN. Parmi les sites nucléophiles, les azotes aromatiques, les groupements hydroxyles et carbonyles de bases constitutives d'ADN qui constituent les cibles privilégiées des agents chimiques génotoxiques (Goff *et al.*, 2006). On en distingue :

➤ Les analogues d'acide nucléique

Sont des substances présentes dans la nature et qui ont une structure similaire à celle de l'acide nucléique (Jean *et al.*, 2000).

➤ Les agents intercalaires

Sont des molécules capables de s'inclure réversiblement entre deux nucléotides d'ADN.

Exemple : acridine, proflavine qui induisent une délétion ou insertion d'un nucléotide sur le brin opposé après leur intercalation au cours de la réplication (Rogers *et al.*, 1982).

➤ Les modificateurs de bases

❖ Les agents alkylants

Sont des électrophiles qui transfèrent par covalence des groupes alkyle sur les bases d'ADN, Il existe plusieurs groupes différents d'agents alkylants, tel que : les moutardes à l'azote, et les composés triazines (Benhacine et Sahil, 2016 ; Lucy *et al.*, 2014).

I.2.2. Agents physiques

Les agents physiques sont principalement les radiations ionisantes hautement énergétiques telles que les rayons X ou gamma et les radiations non ionisantes comme la lumière ultraviolette. Ces agents peuvent induire des mutations variables (Dégremont et Cachot, 2009).

I.2.3. Agents biologiques

Les mutagènes biologiques sont des virus tels que les rétrovirus (sida), les filoviridae (virus d'Ebola). Leur génotoxicité peut aboutir à la cancérogenèse (Dégremont et Cachot, 2009).

I.3. Mécanisme de la génotoxicité

Il apparaît que l'accessibilité des sites nucléophiles de l'ADN aux attaques électrophiles des agents génotoxiques n'est pas la même. Par ailleurs, il existe une très grande variété des degrés d'altération de l'ADN. Il est en effet classique de distinguer les lésions primaires à l'ADN, les mutations géniques et chromosomiques (Orsière *et al.*, 2005).

I.3.1. Les lésions primaires

En raison de la grande variété de structures et de modes d'action des substances génotoxiques, il existe un grand nombre de dommages à l'ADN possibles (figure 1). Ces altérations structurales de l'ADN appelées lésions primaires concernent principalement des modifications des bases constitutives de l'ADN ou des cassures affectant un seul ou les deux brins de l'ADN (Dégremont et Cachot, 2009).

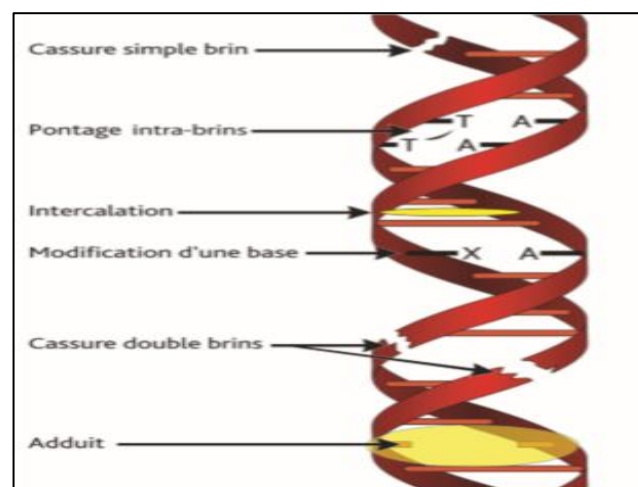


Figure1 : Les différentes lésions primaires qui touchent l'ADN (Dégremont et Cachot, 2009).

Les produits chimiques peuvent produire des altérations directement en tant qu'adduits ou indirectement par intercalation d'un agent chimique entre les paires de bases (par exemple, 9-aminoacridine) (Gupta, 2016).

I.3.2. Les mutations géniques

On distingue les mutations frame-shift et les mutations de substitution d'une ou plusieurs paires de bases. Les mutations frame-shift décalent le cadre de lecture par addition ou délétion d'une base, de 2 bases ou d'un nombre non-multiple de 3 (Vincent, 1993).

I.3.3. Les mutations chromosomiques

Est un ensemble des événements de réarrangements de génome au cours duquel un génome voit son organisation générale modifiée par les aberrations du nombre de chromosomes (aneuploïdie) et les aberrations de structure (délétion ou l'addition de fragments chromosomiques (figure 2), ou par l'échange des fragments entre chromosomes non homologues et à la duplication ou à l'inversion d'un segment chromosomique (figure 3)) (Sobreira *et al.*, 2011).

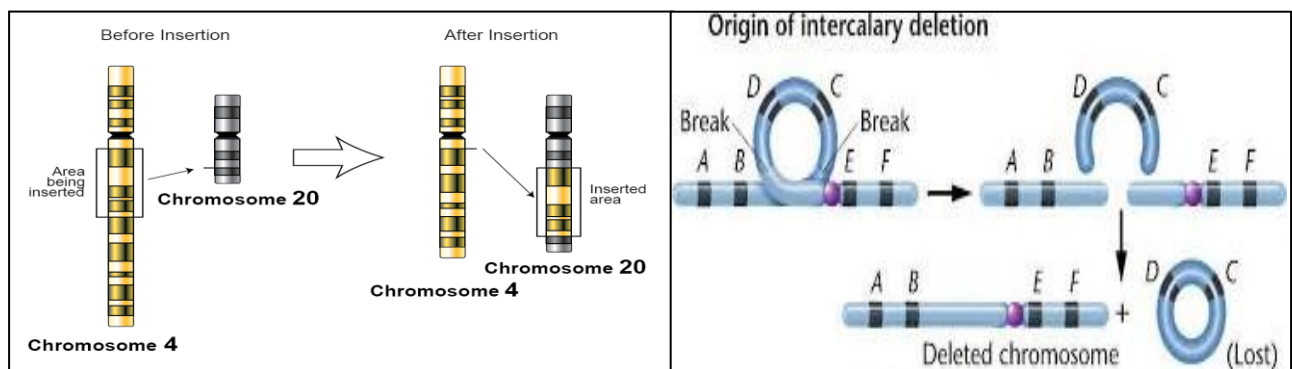


Figure 2 : Schéma représentant une insertion chromosomique – à gauche - et Délétion chromosomique – à droite - (Iengar, 2012).

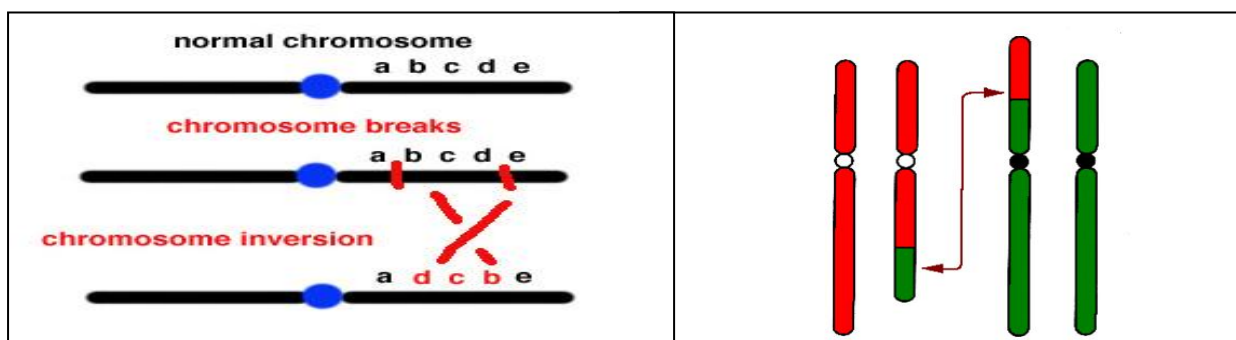


Figure 3 : Représentation schématique d'une Inversion chromosomique – à gauche- et translocation réciproque – à droite- (Benhacine et Sahil, 2016).

I.4. Exploration de la génotoxicité

Plusieurs tests de génotoxicité ont été développés pour effectuer un criblage rapide du potentiel génotoxique des xénobiotiques, lors de l'évaluation des risques de substances génotoxiques, il est recommandé d'utiliser une batterie de tests *in vitro* et *in vivo*, qui comprennent les principales altérations de l'ADN, tels que des tests de mutation génique, des tests d'aberration chromosomique ainsi que des tests observant des lésions primaires de l'ADN (Eastmond *et al.*, 2009 ; EFSA, 2011 ; Kirkland *et al.*, 2007 ; Thybaud *et al.*, 2007).

Les lésions primaires de l'ADN peuvent être évaluées par le test des comètes, ou par la détection de différents types d'adduits ; les mutations géniques par le test d'Ames et le « Mouse lymphoma assay », les lésions chromosomiques clastogènes et aneugènes par le test des aberrations chromosomiques ou le test des micronoyaux (Ricou-Berthelot, 2014).

I.4.1. Test de comète

Le test des comètes également appelé électrophorèse sur micro gel d'agarose, a été développé par Singh *et al.*, (1988) est un test court, rapide, sensible et également simple de génotoxicité, peut être applicable *in vivo* et *in vitro* à tous types cellulaires, pour étudier les lésions primaires de l'ADN (Ostling et Johanson, 1984).

Ce test est basé sur le principe de la charge négative portée par l'ADN qui, sous influence du courant de migration, se déplace vers l'anode.

La présence de cassures permet à l'ADN de migrer et le noyau prend donc la forme d'une comète en présence de marqueur acridine orange. On distingue une partie contenant de l'ADN non endommagé, appelée tête de la comète et une partie plus allongée, contenant l'ADN fragmenté ayant migré, constituant la queue de la comète (figure 4) (Michel, 2011).

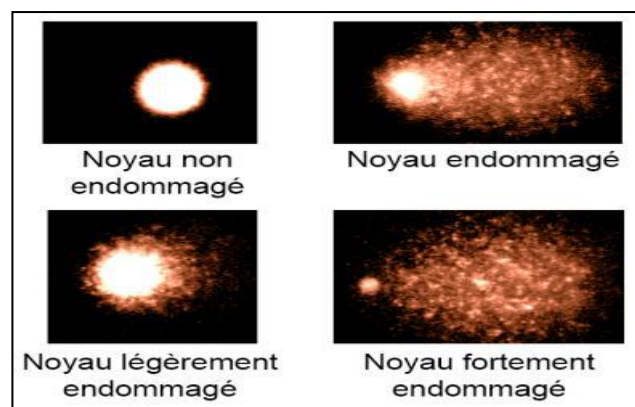


Figure 4 : Exemples d'observation des noyaux par le test des comètes (Lemière, 2014).

I.4.2. Test d'Ames

Appelé aussi le mutatest, il s'agit d'un des premiers tests *in vitro*, mis au point par le Pr. Bruce Ames (1973), utilisant des cellules procaryotes mutantes (*Salmonella thyphimurium*), pour le but d'évaluer la mutagénèse et la cancérogenèse de tel substances chimiques. Le principe de ce test est basé sur l'effet que la souche bactérienne utilisé porte une mutation dans l'opéron gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. En présence d'agent mutagène, cette mutation peut réserver vers la capacité à synthétiser à nouveau l'histidine. Ainsi le test consiste à quantifier ces réversions en étudiant des relations dose-réponse (Viala et Botta, 2009).

I.4.3. Test de micronoyaux

I.4.3.1. Historique

Le micronoyau (MN), également appelé en hématologie corps de Howell – Jolly, a été introduit en 1951 en rapport avec des petits fragments acentriques expulsés du noyau principal aux derniers stades de l'anaphase dans les érythrocytes. Depuis 1959, les MN ont été proposés comme indicateurs de génotoxicité. Cependant, l'analyse de fréquence des MN comme test de cytogénétique n'a été proposée qu'en 1970 par Boller et Schmid (Araldi *et al.*, 2015).

I.4.3.2. Définition

Un micronoyau est défini dans le « Glossary of Genetics and Cytogenetics » de Rieger (1968) comme « un petit noyau surnuméraire séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la télophase mitotique ou méiotique et constitué de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales des chromosomes » (Rieger *et al.*, 1968).

L'évaluation de la fréquence du micronoyau *in vivo* est le test principal d'une batterie de tests de génotoxicité et est recommandée par les organismes de réglementation du monde entier dans le cadre de l'évaluation de la sécurité des produits (Paulo *et al.*, 2015).

I.4.3.3. Principe et but du test

Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte immature (parfois désigné sous le terme d'érythrocyte polychromatique, ou de réticulocyte), le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection des micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique (OCDE, 2016).

Le test du micronoyau *in vivo* est pratiqué chez des mammifères en vue de détecter des lésions des chromosomes ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes résultant de l'action d'une substance d'essai.

Il évalue la formation de micronoyaux dans des érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs (OCDE, 2014). Les érythrocytes micronucléés nouvellement formés sont identifiés et dénombrés, une fois colorés, par examen visuel au microscope ou par analyse automatique. L'utilisation d'une plateforme d'analyse automatique facilite considérablement le dénombrement d'un nombre suffisant d'érythrocytes immatures dans le sang périphérique ou la moelle osseuse des animaux adultes.

I.4.3.4 Mécanisme de formation de micronoyaux :

Les micronoyaux sont de petites entités nucléaires qui peuvent être constituées :

- De chromosomes entiers, perdus au cours de la mitose précédente (figure 5). Ils représentent alors la conséquence d'une altération des structures cellulaires impliquées dans la disjonction, la ségrégation et la migration des chromosomes. Les divers systèmes protéiques impliqués sont représentés par l'appareil mitotique, constitué de diverses catégories de microtubules gérant l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique puis la migration des chromosomes à l'anaphase, les centrosomes, à partir desquels se structure l'ensemble des microtubules, et les kinétochores (Fenech *et al.*, 2005). La formation de ces micronoyaux est consécutive à l'action des agents aneugènes.
- De fragments chromosomiques acentriques (figure 5). Ils représentent alors la conséquence d'une cassure double brin non réparée de la molécule d'ADN, l'extrémité du bras chromosomique cassé n'étant plus rattachable au fuseau mitotique, faute de centromère. Les cassures double brin qui résultent de ces modifications représentent des lésions primaires de l'ADN particulièrement sévères car difficilement réparables. La non réparation d'une cassure double brin peut mener à un réarrangement asymétrique des chromosomes donnant un chromosome dicentrique et un fragment acentrique (Mateuca *et al.*, 2006). Les centromères des chromosomes dicentriques sont tirés aux pôles opposés de la cellule en anaphase formant un pont nucléoplasmique (PNP) entre les deux cellules filles et un fragment acentrique qui formera un MN (Thomas *et al.*, 2003 ; Fenech, 2005). Ces MN peuvent être directement induits par des agents génotoxiques dits clastogènes, les plus connus d'entre eux étant les rayonnements ionisants et les composés chimiques.

Ces deux types de contenu correspondent à des mécanismes de formation fondamentalement différents. En conséquence, les micronoyaux témoignent de la survenue des événements aneugènes et/ou clastogènes.

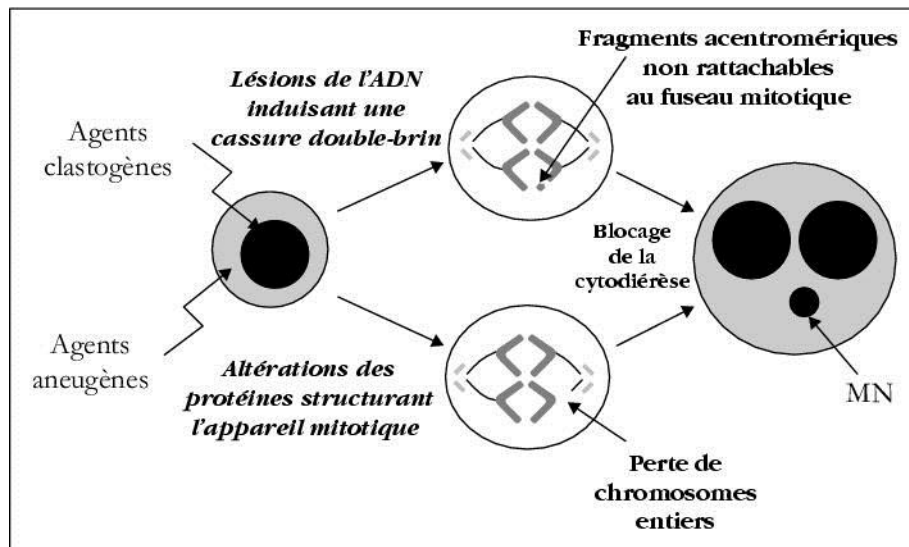
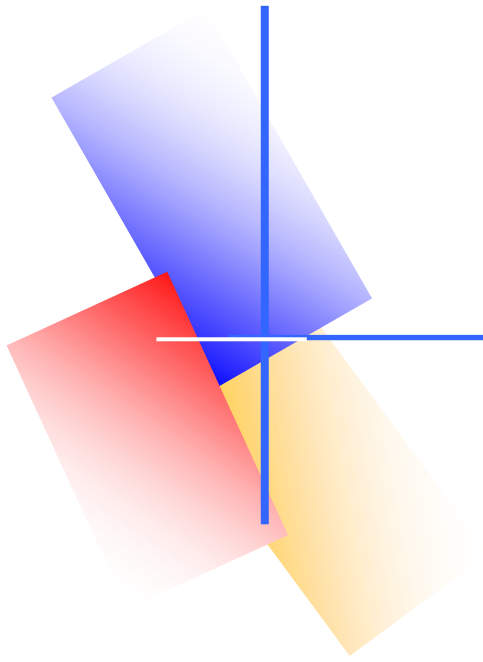


Figure 5 : Formation d'un micronoyau (Iarmarcovai et al., 2007).

I.4.3.5. Les avantages et les inconvénients

Le test de micronoyaux est simple à réaliser, en plus d'être rapide, ses plus grands avantages sont la fiabilité et le coût peu élevé de la technique. Ce test est largement utilisé en épidémiologie moléculaire et en cytogénétique pour évaluer la présence et l'étendue des dommages chromosomiques dans la population exposée à des agents génotoxiques ou pour étudier un profil génétique (Fenech *et al.*, 1999).

Une des limites de cette technique est qu'elle ne permet pas de détecter toutes les aberrations structurales (Volders *et al.*, 2002). De plus, le nombre de micronoyaux (MN) n'est pas entièrement proportionnel aux dommages à l'ADN.



Chapitre II

Le valsartan

II.1. Généralités

Le valsartan est une substance non peptidique, actif par voie orale et bloqueur des récepteurs de l'angiotensine II spécifiques agissant sur les récepteurs AT1, présent dans de nombreux tissus tels que le muscle lisse vasculaire et la glande surrénale (Hasin *et al.*, 2017).

Le valsartan est chimiquement décrit comme [(S)-N-Valéryl-N-{[2-(1H-tétrazole-5-yl)-biphényl-4-yl]-méthyl}-valine] (figure 6). Sa formule brute est C₂₄H₂₉N₅O₃, et son poids moléculaire est de 435,519 gr/mol (Ashok et SHakya, 2016 ; Sung, 2012).

Il peut être utilisé pour traiter divers troubles cardiaques, notamment l'hypertension, la néphropathie diabétique et l'insuffisance cardiaque, il bloque l'action de l'angiotensine II, notamment la constriction des vaisseaux sanguins et l'activation de l'aldostérone, afin de réduire la pression artérielle (Zaid *et al.*, 2011).

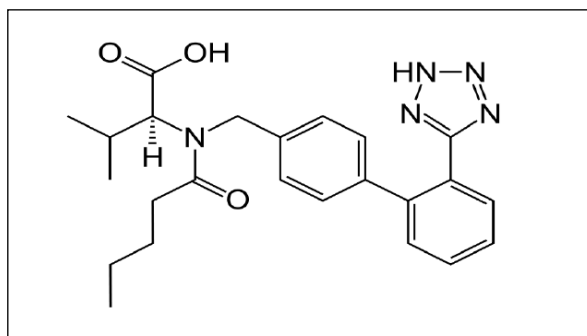


Figure 6 : La formule chimique du valsartan (Shirkhedkar *et al.*, 2017).

II.2. Les propriétés physico-chimiques de valsartan

Les critères les plus souvent évoqués sont la solubilité, la densité, ou encore le temps de demi-vie qui déterminent la mobilité et le devenir d'une molécule dans l'organisme.

Tableau 1 : Représente les propriétés physico-chimiques du valsartan.

Nom commun	Valsartan
Nom chimique	[(S)-N-valeryl-N-{{2-(1H-tertrazol-5-yl) biphenyl-4-yl}- metyl} valine](Kadam et Bari, 2007).
Classe chimique	Enantiomère (S) dérivé de la L-Valine Non hétérocyclique (Gosse et al., 1999).
Formule brute	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃ (kjeldsen et al.2005).
masse moléculaire (g /mol)	435,5(kjeldsen et al., 2005).
Etat physique	se présente sous forme de poudre cristalline blanche, solide (Siddiqui et al., 2011).
Densité (g/cm ³)	1.2 g/cm ³ . (Siddiqui et al., 2011).
Durée de demi-vie	Inhibe de manière sélective le récepteur AT1avec une demi-vie allant de 6 à 9h (Saydam et al., 2007).
Température de fusion	105-110°C (Saydam et al., 2007).
Solubilité	Soluble dans l'éthanol, méthanol et insoluble dans l'eau (Siddiqui et al., 2011).

II.3. Pharmacocinétique

Les concentrations plasmatiques maximales de valsartan sont atteintes dans les 2 à 4 heures qui suivent l'administration orale du médicament en monothérapie. La biodisponibilité absolue moyenne du valsartan est d'environ 23 %, mais elle varie largement (Monographie de produit, 2019).

Le valsartan se lie aux protéines sériques, principalement à l'albumine, dans des proportions variant de 94 à 97 %. Après administration intraveineuse, le volume de distribution du valsartan à l'état d'équilibre est d'environ 17 L, ce qui veut dire que la répartition du valsartan dans les tissus n'est pas très étendue (Monographie de produit, 2019).

Le valsartan ne subit pas de biotransformation importante : seulement environ 20 % de la dose est récupérée sous forme de métabolites. Un métabolite de type hydroxy a été détecté dans le plasma à de faibles concentrations (figure 7) (moins de 10 % de la valeur de l'ASC du valsartan). Ce métabolite est considéré comme inactif sur le plan pharmacologique.

Le système du cytochrome P450 semble intervenir dans la biotransformation du valsartan. (Monographie de produit, 2019).

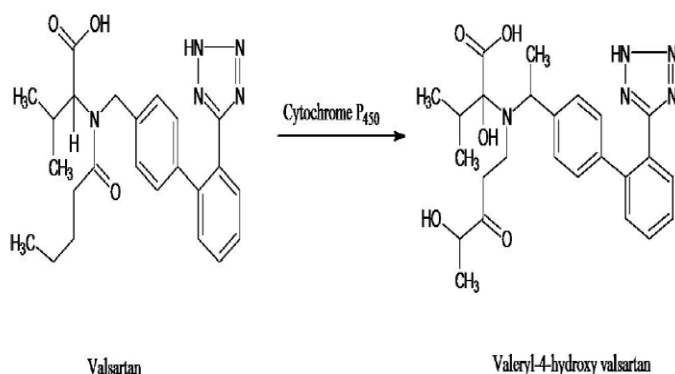


Figure 7 : Métabolisation de valsartan en valeryl-4-hydroxy VAL (Shirkhedkar *et al.*, 2017).

Le valsartan est principalement éliminé dans les fèces (environ 70 % de la dose) et dans les urines (environ 13 % de la dose), essentiellement sous forme inchangée. La demi-vie plasmatique apparente est de 6 à 9 heures (Gosse *et al.*, 1999).

II.4. Pharmacodynamique

Le valsartan est un antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II (figure 8), ce qui signifie qu'il bloque l'action d'une hormone appelée angiotensine II (Amah, Thuillez, 2007).

L'angiotensine II est un vasoconstricteur puissant (une substance qui diminue le diamètre des vaisseaux sanguins). En bloquant les récepteurs sur lequel l'angiotensine II se fixe normalement, le valsartan met fin à l'action de l'hormone, ce qui permet aux vaisseaux sanguins de s'élargir et entraîne une diminution de la pression artérielle (Olivier et Pascale, 2005).

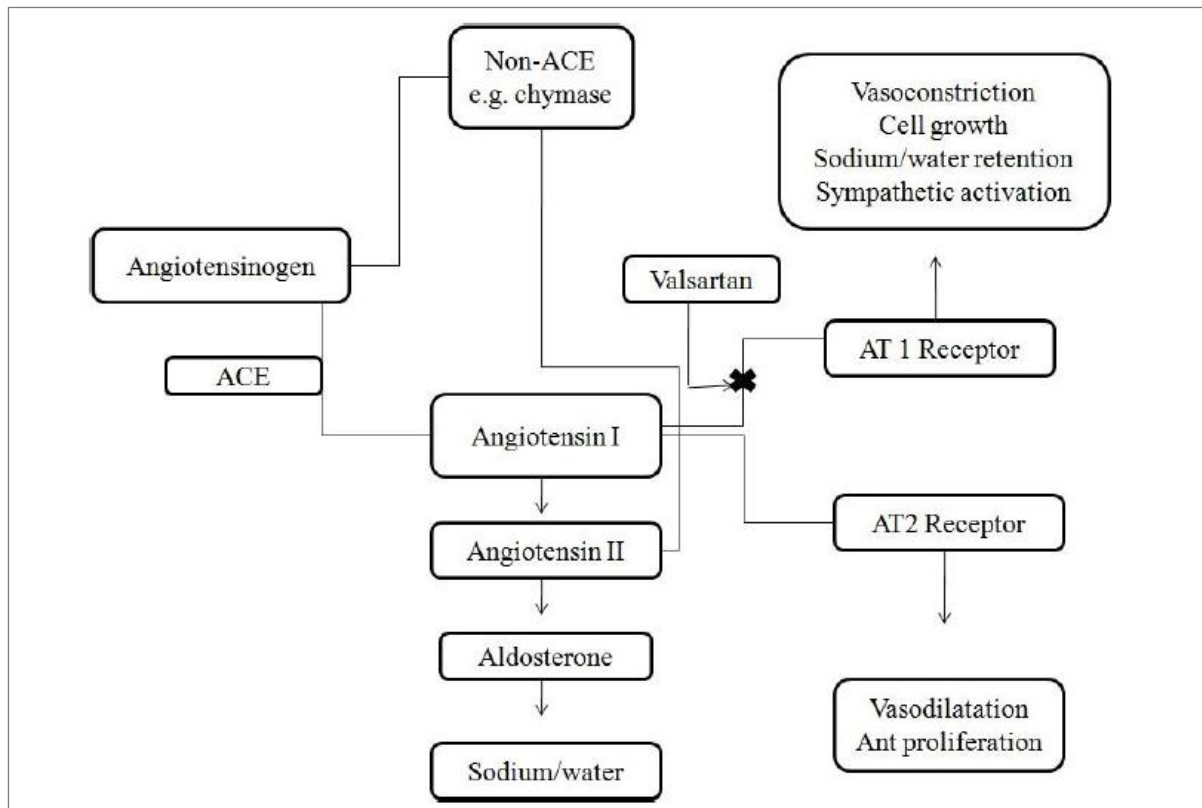


Figure 8 : Représente le mécanisme d'action de valsartan (Shirkhedkar *et al.*, 2017).

II.5. Effets indésirables

Lors des études cliniques, le valsartan est utilisé à des doses de 20 à 320 mg/jour et donne un taux d'effets indésirables sans différence significative par rapport au placebo. Les effets indésirables rencontrés sont des céphalées, des vertiges, des infections virales, des infections des voies respiratoires supérieures et de la toux (Gosse *et al.*, 1999).

Les plus fréquents sont l'hyperkaliémie, les hypotensions orthostatiques, les hypotensions brutales en cas de déplétion hydrosodée préalable, et les réactions d'angioedème (Vidal, 2012).

II.6. La toxicité aiguë et chronique

Dans le cadre d'études précliniques visant à évaluer l'innocuité du valsartan, des tests de toxicité aiguë en administrant une dose forte unique (de 100mg/kg ou 2000mg/kg), et des tests de toxicité chronique en administrant chez des rats des fortes doses du médicament (de 200 à 600 mg/kg de poids corporel) pendant une longue durée.

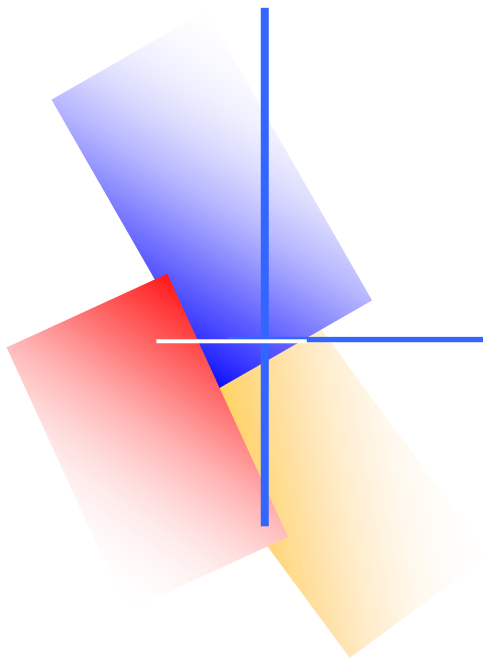
Les résultats des deux tests sont présentés dans les tableaux suivants :

Tableau 02 : Représente les résultats du test de la toxicité aiguë (Monographie de produit, 2019).

Voie d'administration	Dose (mg/kg)	Observations principales
Gavage	100	Aucun effet indésirable observé.
Gavage	1000, 2000	2000 mg/kg : diarrhée, présence d'une substance blanche (Similaire à la substance utilisée dans le cadre de l'épreuve) dans les fèces. DL50 approximative > 2000 mg/kg.

Tableau 3 : Représente les résultats du test de la toxicité chronique (Monographie de produit, 2019).

Dure de traitement	Voie d'administration	Dose (mg/kg)	Observations principales
Gavage	14 jours	60, 200, 600	Groupes ayant reçu les doses moyenne ou élevée : ↑ de l'urée. DSEO = 60 mg/kg.
Gavage	91 jours	60, 200, 600	Groupes ayant reçu les doses moyenne ou élevée : ↑ de l'urée. Groupe ayant reçu la dose élevée : hyperplasie des tubes rénaux, hypertrophie de l'artériole glomérulaire ; anémie avec réponse régénératrice. DSEO = 60 mg/kg.
Gavage	12 mois	20, 60, 200	Groupe ayant reçu la dose moyenne : ↑ de l'urée à 60 mg/kg. Groupe ayant reçu la dose élevée : anémie et hypertrophie de l'artériole glomérulaire. DSEIO = 20 mg/kg.



Chapitre III

La propolis

III.1. Origine et composition chimique de la propolis

La propolis est un mélange de substances résineuses, gommeuses et balsamiques, de consistance visqueuse, recueillies par les abeilles de nombreuses sources végétales, substances qu'elles rapportent à la ruche et qu'elles modifient vraisemblablement en parti par l'apport de certaines de leurs propres sécrétions (El Housseini, 2013). La propolis a été longtemps utilisé en médecine traditionnelle en raison de leur large spectre d'activités biologiques en anticancéreux, antioxydant, anti-inflammatoire, antibiotique et antifongique (Bankova *et al.*, 2014).

La propolis contient de très nombreux éléments comme de la vitamine A, les vitamines du groupe B, des acides aminés, des polyphénols, des flavonoïdes (acides phénoliques et leurs esters), des acides gras, des aldéhydes aromatiques tels que de la vanilline et isovanilline, et des oligoéléments comme du fer, du magnésium, du sélénium, du cuivre... (Fournier, 2009).

Tableau 4 : Composition chimique de la propolis brute (Ghedira *et al.*, 2009).

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

III.2. Les propriétés physico-chimiques

III.2.1. Propriétés physiques

La propolis est une substance naturelle de consistance variable suivant la température : à 15°C elle est dure et friable, à 30°C elle est molle et malléable, entre 30 et 60°C, elle devient collante ou gluante, jusqu'à fondre en moyenne vers 60-70°C ou plus. Ce produit naturel a une couleur très variable suivant sa provenance, allant du jaune clair au brun très foncé, presque noir, en passant par toute la gamme de bruns. Elle est souvent âcre et parfois amère. Généralement l'arôme de la propolis est agréable et douceâtre, mélangé à celui du miel, de la cire et d'autre produits (cannelle, vanille, etc.). Lorsqu'on la brûle, elle dégage une odeur très délicate et très recherchée du fait des résines aromatiques qu'elle contient (El Housseini, 2013).

II.2.2. Les propriétés chimiques

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

III.3. Les propriétés thérapeutiques

III.3.1 L'activité hépatoprotectrice

La propolis a été longtemps utilisée dans la médecine populaire. En raison de ses différents composants et de son large éventail d'activités biologiques, il est considéré comme un agent promoteur pour la santé humaine et un candidat idéal pour posséder une capacité hépatoprotectrice (Santillán *et al.*, 2014).

Plusieurs études ont été examinées les effets hépatoprotecteur de la propolis. Ils ont trouvé que l'administration de la propolis engendrer une diminution au niveau des fuites de lactate déshydrogénase (LDH), une diminution du taux de peroxydation lipidique (MDA), et la maintenance de la teneur réduite en glutathion cellulaire (GSH) (Lotfy, 2006).

Lin *et al.* (1997) ont été observé que l'utilisation d'un extrait éthanolique de la propolis à une dose orale de 10 mg / kg inhibé significativement l'élévation des taux sériques de la TGO, TGP et TGs dans un modèle des dommages hépatique induite par l'alcool. Dans une autre étude Gomaa *et al.* (2011) ont évalué l'effet protecteur de la propolis contre les dommages hépatiques provoqués par la cyperméthrine, ils ont trouvé que l'administration combinée de propolis avec la cyperméthrine entraîne une diminution significative des niveaux des enzymes hépatiques (TGP, TGO, phosphatase alcaline), MDA, ainsi qu'une augmentation des enzymes antioxydantes, des protéines totales, et de TG par rapport au groupe traité par cyperméthrine.

III.3.2. Activité antioxydante

La propolis est une substance constituée de nombreux composés antioxydants : vitamines E et C et des polyphénols. Les études ont montré que l'activité antioxydante de la propolis était positivement corrélée avec son contenu en polyphénols (Cardinault *et al.*, 2012).

Son action antioxydante est aussi dose-dépendante. A dose faible, elle est antioxydante mais à dose forte, elle semblerait devenir pro-oxydante. Il faut donc établir une dose efficace pour optimiser son utilisation (Apimondia, 2001).

In vivo, la propolis réduit significativement la lipoperoxydation dans différents organes (foie, rein, poumon, cerveau) et module l'expression des enzymes antioxydantes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase) (Cardinault *et al.*, 2012).

III.3.3. Autres propriétés

- Activité antimicrobienne

Les différentes études mécanistiques suggèrent que la propolis pourrait inhiber la croissance bactérienne par blocage de la division cellulaire, par une désorganisation du cytoplasme, par une inhibition de la synthèse protéique ou par une inhibition du processus d'adhésion. Certaines études ont montré que la propolis, lorsqu'elle est prise en association avec certains antibiotiques, augmente leur efficacité (streptomycine, ampicilline, gentamycine, cloxacilline...) (Cardinault *et al.*, 2012).

- Activité anti-inflammatoire

La propolis exerce un effet anti-inflammatoire significatif (Ramos et Miranda, 2007). Plusieurs mécanismes d'actions ont été proposés telle que : l'inhibition de l'activation d'IL-6 et l'inhibition de certaines enzymes impliquées dans la voie métabolique de l'inflammation (cyclo-oxygénase, lipo-oxygénase, myéloperoxidase, NADPH-oxydase) (Khayyal *et al.*, 1993).

- Activité antiangiogénique

La propolis réduit l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* via une limitation de la néovascularisation, une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaires, et ce, de manière dose-dépendante. Il semble que ces effets passent par une modulation de l'expression de certains facteurs tels que VEGF, TNF ou TGF (Cardinault *et al.*, 2012).

- Activité immunomodulatrice

La propolis possède une action immunomodulatrice *in vitro* et *in vivo* sur l'ensemble des cellules immunitaires impliquées dans la réponse innée ou acquise. Elle stimule le pouvoir de présentation et l'activité lytique des macrophages et des naturels killers contre les cellules tumorales. Elle augmente la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8), renforce la coopération entre les lymphocytes CD4 et CD8 et stimule la production d'anticorps par les plasmocytes (Sforcin, 2007 ; Cardinault *et al.*, 2012).

- Activité antitumorale

Nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont montré l'effet antiprolifératif de la propolis vis-à-vis un très grand nombre de lignées tumorales. Dans la grande majorité des cas cet effet résulte d'une restauration du signal d'apoptose. Les différentes molécules de la propolis vont pouvoir agir à différents endroits pour induire l'apoptose soit par la voie intrinsèque ou extrinsèque. L'effet antiprolifératif peut également résulter d'un arrêt du cycle cellulaire par inhibition des cyclines ou par blocage des récepteurs hormonaux (Chen *et al.*, 2007 ; Sforcin, 2007 ; Cardinault *et al.*, 2012).

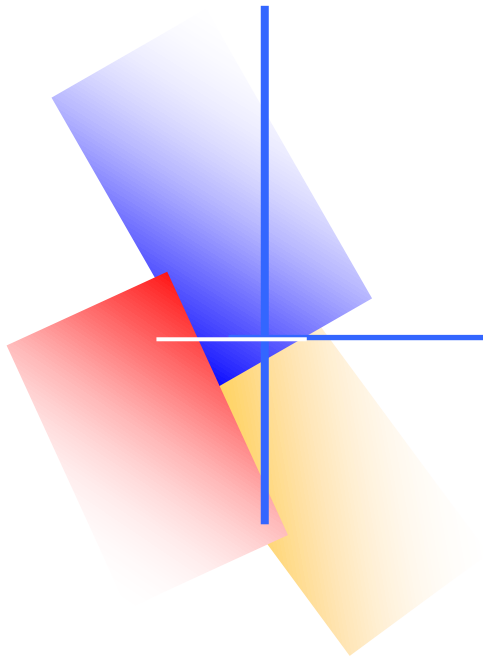
- Activité cardioprotectrice

Plusieurs auteurs ont postulé que les polyphénols réduisent le risque des troubles cardiovasculaires et prévenir le développement de plaques athéromateuses (Norata *et al.*, 2007 ; Gorinstein *et al.*, 2011). Ainsi, en tant qu'une source riche de polyphénols, la propolis représente une stratégie alternative potentielle pour la prévention des maladies cardiovasculaires.



Etude

Expérimentale



Matériel et

Méthodes

Le présent travail est effectué au niveau de Laboratoire de Toxicologie Moléculaire (LTM), Université Mohammed Seddik Ben-Yahia, Jijel, Algérie. Ce travail s'intéresse à l'étude de l'effet préventif de l'extrait éthanolique de la propolis (EEP) contre le stress oxydant et la génotoxicité induits par le Valsartan chez les souris Swiss nmri.

I. Matériel

I.1. Valsartan

Le Valsartan, matière première N° de lot 16Bp 101, nous a été fourni par le LTM sous forme d'une poudre très fine d'une couleur blanche, Il est dissous ou mis en suspension dans un véhicule approprié (éthanol/eau).

I.2. Cyclophosphamide

Il s'agit du cyclophosphamide monohydrate ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$), CSA :6055-19-2. Lot SLBG4216V, SIGMA qui nous a été fourni par le LTM sous forme de poudre blanche très fine dissoute dans l'eau distillée

I.3. Propolis

La propolis utilisée dans cette étude est sous forme d'un extrait éthanolique dissoute dans un mélange (éthanol/eau) et nous a été fourni par le LTM.

I.4. Matériel biologique et condition d'élevage

Les expériences sont réalisées sur 26 souris mâles Swiss nmri, fournis par l'institut Pasteur d'Alger, pesant entre 20,8g et 37,7g. Les animaux sont maintenus dans des cages en polypropylène, avec libre accès à la nourriture et à l'eau. L'animalerie est soumise à une température entre 20 et 27°C et une photopériode de 12/24 h.

I.5. Répartition et traitement des animaux

Les animaux sont répartis en cinq groupes.

- 📄 **Le 1^{er} groupe (T⁻)** : Témoin négatif, reçoit 0,2ml de véhicule (éthanol/eau) par gavage
- 📄 **Le 2^{ème} groupe (T⁺)** : Témoin positif, traité par 0,2ml de Cyclophosphamide (dose unique 40mg/kg), par voie intra péritonéale.
- 📄 **Le 3^{ème} groupe (FD)** : reçoit 0,2ml de Valsartan par gavage à la dose 2600mg/Kg une fois par jour pendant deux jours.
- 📄 **Le 4^{ème} groupe (EEP+Val)** : prétraité par 0,2ml de l'EEP (25 mg/kg) pendant 5jours, le 6^{ème} jour, reçoit 0,2ml de forte dose Valsartan par gavage à la dose 2600mg/kg une fois par jour pendant deux jours.
- 📄 **Le 5^{ème} groupe (EEP+CP)** : prétraité par 0,2ml de l'EEP (25 mg/kg) pendant 5jours, le 6^{ème} jour reçoit une dose unique (40mg/Kg) de Cyclophosphamide par voie intra péritonéale.

Le choix des doses de valsartan et de cyclophosphamide est adapté selon le protocole expérimental décrit dans la ligne directrice de l'OCDE (OCDE, 2019).

I.6. Sacrifice et prélèvement des organes

Vingt-huit à 24h après le dernier traitement les souris sont décapitées, le sang recueilli dans des tubes héparinés, afin de réaliser le test de micronoyaux.

La paroi abdominale est ouverte le foie de toutes les souris est soigneusement prélevé, plongé et lavé dans l'eau physiologique (0,9%) pour éliminer le sang, des fractions destinées aux dosages des paramètres du stress oxydatif sont maintenues à (-20 °C), et une fraction destinée à l'étude histologique est conservée dans une solution de formol tamponné 10%.

II. Méthodes

II. 1. Test de micronoyaux dans le sang périphérique

II.1.1. Principe

Lorsqu'un érythroblaste de moelle osseuse se transforme en érythrocyte immature (parfois désigné sous le terme d'érythrocyte polychromatique, ou de réticulocyte), le noyau principal est expulsé et les éventuels micronoyaux qui se sont formés peuvent subsister dans le cytoplasme. La visualisation ou la détection des micronoyaux dans ces cellules est facilitée par l'absence de noyau principal. Un accroissement de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est le signe d'une lésion chromosomique (OCDE, 2016).

La préparation et la coloration des cellules du sang périphérique pour le test de micronoyaux sont traitées selon le même procédé que celui utilisé pour les échantillons de moelle osseuse selon une procédure normalisée basée sur celle de Shmid (1975) et Mavournin *et al* (1990).

La visualisation ou la détection des micronoyaux est facilitée dans ces cellules car elles ne possèdent pas de noyau principal. Une augmentation de la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés chez les animaux traités est une indication de la présence l'aberration chromosomique structurelle ou numérique induite (OCDE, 2016).

II.1.2. Mode opératoire

Toutes les lames et échantillons, y compris ceux des témoins positifs et négatifs, doivent être codés individuellement avant tous types d'analyse.

L'étalement du sang est réalisé selon la technique classique du frottis sanguin. Une goutte de sang est déposée à une extrémité d'une lame de verre propre et dégraissée. Nous utilisons ensuite une autre lame ou une lamelle, qu'on approche juste devant la goutte, en respectant un angle d'inclinaison de 30 degrés avec la première lame. La goutte va alors se répandre le long de la jonction entre les deux lames, nous étalons la goutte de sang vers l'autre extrémité de la lame support.

Le frottis doit être ensuite rapidement séché à l'air pendant une demi-heure au moins. Il existe de nombreuses techniques de coloration, dont la plus connue est la coloration de May-Grünwald-Giemsa (Mirtuka *et al.*, 1977).

Nous avons utilisé le KIT RAL 555 (Ref. 361550) ; une Variante rapide de la coloration de May-Grünwald Giemsa. La sensibilité, la lecture et l'interprétation de la coloration du kit RAL 555 sont identiques à celles des colorations classiques (Bracia, 2007).

II.1.3 Lecture

Le micronoyau apparaît dans les érythrocytes dans le sang circulant ou dans les érythroblastes dans la moelle osseuse comme une petite masse colorée en violet (après coloration MGG). Il témoigne de la génotoxicité du médicament.

Les lames sont observées au microscope optique (objectif à immersion, grossissement x 1000). Pour chaque animal, on détermine la proportion d'érythrocytes immatures dans le nombre total d'érythrocytes (immatures + matures) en comptant au moins 500 érythrocytes dans le cas de la moelle osseuse et 2 000 érythrocytes dans le cas du sang périphérique (Gollapudi et McFadden, 1995).

II.2. Exploration du stress oxydatif tissulaire hépatique

II.2.1. Dosage du MDA cytosolique

La quantité du MDA hépatique est évaluée selon la méthode (Ohkawa *et al.* 1979). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) d'un pigment coloré en rose entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA), absorbant à 530 nm et extractible par les solvants organiques comme le butanol.

Pour réaliser ce dosage, nous avons broyé 1g du foie avec 3ml de la solution KCl (1,15 %) à l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE. A 0,5 ml de l'homogénat nous avons ajouté 0,5ml de TCA (20%) et 1ml de TBA (0,67 %). Ensuite nous avons chauffé le mélange à 100°C pendant 15 min, refroidis puis additionné 4 ml de n-butanol. Après centrifugation de 15 minutes à 3000 rpm, la densité optique est déterminée sur le surnageant au spectrophotomètre à 530 nm.

Nous avons calculé la concentration de MDA selon la loi de Beer Lambert en utilisant le coefficient d'extinction molaire, du complexe MDA-TBA $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Buege et Aust, 1978). Le taux de MDA cytosolique est exprimé en nM de MDA libéré par g de tissu.

II.2.2. Mesure de l'activité des antioxydants

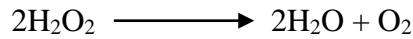
II.2.2.1. Mesure de l'activité des antioxydants enzymatiques

II.2.2.1.1. Préparation de la fraction cytosolique

Nous avons préparé la fraction cytosolique selon la méthode décrite par Iqbal *et al.* (2003). Pour cela 1g du foie est homogénéisé par un homogénéiseur de DOUNCE avec 3 volumes d'une solution tampon phosphate (KH_2PO_4 , 0,1M, pH 7,4) contenant KCL (1,17%). L'homogénat obtenu est centrifugé pendant 15 minutes, à 2000 rpm et à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse pour séparer les débris cellulaires, le surnageant obtenu est centrifugé pendant 30 minutes, à 9600 rpm et à 4°C. Le surnageant final est utilisé comme source des enzymes cytosoliques.

II.2.2.1.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

Nous avons déterminé l'activité de la catalase cytosolique selon la méthode de Clairborne (1985), cette méthode est basée sur la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution H₂O₂ à 240 nm. Cette diminution résulte de la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase selon la réaction suivante :



Dans la cuve de mesure nous avons mis : 1 ml du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0,1 M, PH 7,2), 0,95 ml de peroxyde d'hydrogène (0,019 M) et 0,025 ml de la fraction cytosolique. La lecture de la DO est effectuée à 240 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique de la catalase est exprimée en UI / mg de protéine selon la relation suivante :

$$\text{CAT (UI / mg de protéine)} = (2,3033/T \cdot \text{Log } A1/A2) / \text{mg}$$

Sachant que : **A1** : Absorbance au temps 0 mn et **A2** : Absorbance après 1 mn.

II.2.2.1.3. Mesure de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD)

Nous avons déterminé l'activité du superoxyde dismutase cytosolique selon la méthode décrite par Marklund et Marklund (1974). La mesure de l'activité de cet enzyme est basée sur la capacité du SOD à inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol.

Dans la cuve de mesure mettre : 850 µl du tampon tris HCl (50 mM, PH=8,2), 20 µl de la fraction cytosolique, 100 µl de l'EDTA (10 mM) et 50 µl de pyrogallol (2,5 mM dans HCl 10 mM). La lecture de la DO est effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes.

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

$$\text{Inhibition total (\%)} = \frac{\text{moyenne DO Blanc} - \text{moyenne DO Echantillon}}{\text{moyenne DO Blanc}} \times 100$$

$$\text{U de SOD/mg de protéines} = \frac{\text{Inhibition total}}{n \times 50}$$

Où : n est la quantité de protéines (en milligramme) présente dans le volume de l'échantillon utilisé.

II.2.2.2. Dosage de l'antioxydant non enzymatique (le glutathion GSH)

Le taux du glutathion réduit (GSH) est mesuré selon la méthode d'Ellman (1959), cette dernière est basée sur la mesure de l'absorbance à 412 de l'acide 2-nitro-5-mercapturique qui résulte de la coupure de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le GSH.

Pour cela, nous avons coupé et homogénéisé 1g du foie avec trois volumes de TCA (5%) à l'aide d'un homogénéiseur de DOUNCE et centrifugé à 2000 rpm. Ensuite nous avons dilué 50 µl du

surnageant dans 10 ml de tampon phosphate (0,1 M et pH 8). À 3 ml du mélange de dilution, nous avons additionné 20 µl DTNB (0,1 M), incubé pendant 5 minutes, puis lu la densité optique à 412. Le taux de GSH cytosolique est déduit à partir d'une gamme étalon préparée avec le glutathion (0,5, 0,25, 0,125, 0,062, 0,031 mM) (Figure 2. Annexe 1). Les résultats sont exprimés en mmole de glutathion /g de tissu.

I.2.3. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

La concentration des protéines est déterminée selon la méthode décrite par Bradford (1976). Cette méthode qui utilise le bleu brillant de coomassie (BBC) comme réactif, est basée sur la réaction colorimétrique entre le bleu brillant de coomassie et les acides aminés aromatiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines.

Pour réaliser ce dosage, nous avons diluée 100µl de la fraction cytosolique à 1/5ème avec l'eau distillée et ajouté 4 ml du réactif (BBC). Après agitation au vortex et incubation à température ambiante pendant 5 min, nous avons lu la DO à 595 nm.

La concentration des protéines est déduite à partir d'une gamme étalon préparée avec le BSA (2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062, mg/ml) (Figure 1. Annexe 1).

II.3. Etude histologique

Les foies prélevés sont directement plongés dans le formol tamponné (10%). Avant l'inclusion dans la paraffine, les foies doivent être déshydratés et cela par l'immersion dans des bains d'alcool. Les blocs de paraffine sont ensuite taillés, puis découpés en section de 5µm, déparaffiné, et colorés à l'hématoxyline/ éosine. Les coupes histologiques sont observées au microscope optique (×1000) équipé d'un appareil photographique (Houlot, 1984).

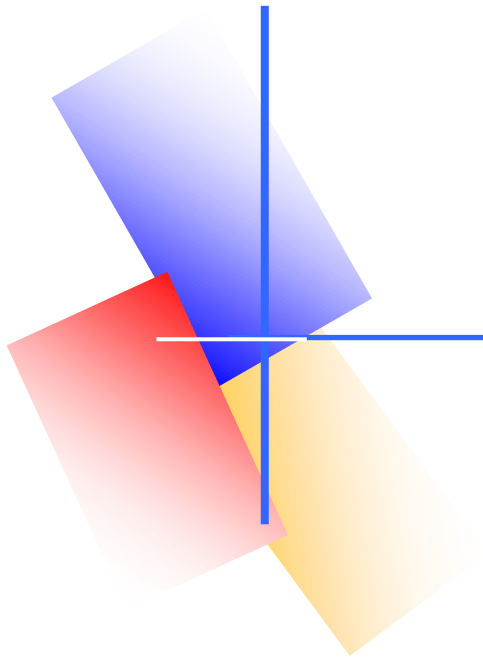
II.4. Evaluation statistique

Les résultats numériques et graphiques sont représentés sous forme de moyenne± écart-types.

L'évaluation statistique est effectuée par le test de Student en utilisant le logiciel MINITAB.18.

Le test est non significatif pour $p > 0,05$.

- Comparaison entre le groupe FD avec témoin négatif : * Significatif $P < 0,05$; ** Hautement significatif $P < 0,01$; *** Très hautement significatif $P < 0,001$
- Comparaison entre le groupe FD avec le témoin positif : # Significatif $P < 0,05$; #[#] Hautement significatif $P < 0,01$; #^{##} Très hautement significatif $P < 0,001$.
- Comparaison entre le groupe EEP+Val avec le FD : ^a Significatif $P < 0,05$; ^b Hautement significatif $P < 0,01$; ^c Très hautement significatif.
- Comparaison entre le groupe l'EEP+CP avec témoin positif : ^x Significatif $P < 0,05$; ^y Hautement significatif $P < 0,01$; ^z très hautement significatif $P < 0,001$.



Résultats et Discussion

I. Effet des traitements sur le taux de mortalité

Les animaux ont été suivis durant toute la période de traitement. Les résultats de taux de mortalité sont représentés dans le tableau (6).

Nous avons enregistré la perte de deux souris dans le lot traité par le valsartan, par ailleurs aucune perte n'a été signalée dans les autres lots de l'expérimentation.

Tableau 5 : Représente le taux de mortalité (exprimé en pourcentage %) des souris de différents lots pendant la période de traitement.

	T-	T+	FD	EEP+Val	EEP+CP
Nbr de souris mortes/lots	0/6	0/5	2/7	0/4	0/4
Pourcentage %	0%	0%	28.57%	0%	0%

T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose ; EEP+Val : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le valsartan à forte dose ; EEP+CP : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le cyclophosphamide.

Cette mortalité peut être expliquée par, l'hypotension orthostatique provoqué par la forte dose de valsartan, laquelle pourrait entraîner un niveau de conscience altéré, un collapsus circulatoire et/ou un état de choc, et/ou la tachycardie qui peuvent être des manifestations létales (Monographie de produit, 2016), ou probablement à cause de (NDMA) qui provoque de graves lésions du foie, comme des nécroses et d'ascites hémorragiques qui peuvent être létales (ATSDR et EPA, 1989).

Il est aussi largement admis que la NDMA induit une fibrose hépatique et une cirrhose qui peut être sévère et défailante (Haggerty et Holsapple, 1990).

D'autres études réalisées pour des fortes doses de valsartan n'ont enregistré aucune mortalité chez les animaux traités, en administrant des doses de 200 à 600mg/kg par gavage, pendant 91 jours (Monographie de produit, 2015).

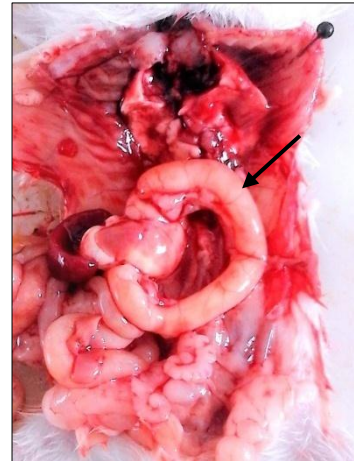
II. Effet des traitements dans l'étude macroscopique

Les principales anomalies enregistrées à la fin du traitement et après dissection des souris sont révélées chez le groupe (FD) et le groupe (T+), aucune manifestation n'a été détectée chez les groupes prétraités par l'extrait éthanolique de la propolis.

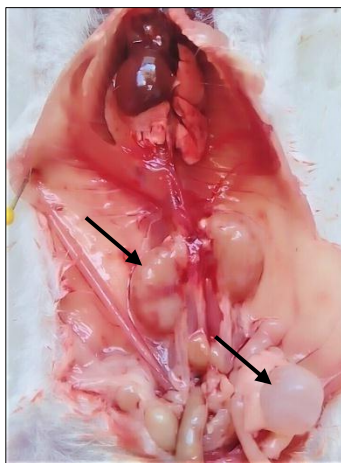
Les anomalies sont illustrées dans les photographies au-dessous :



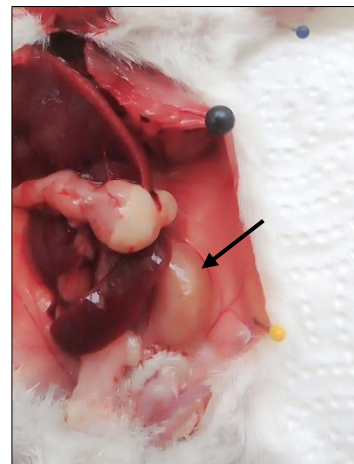
Irritation hépatique, souris traitée par le valsartan.



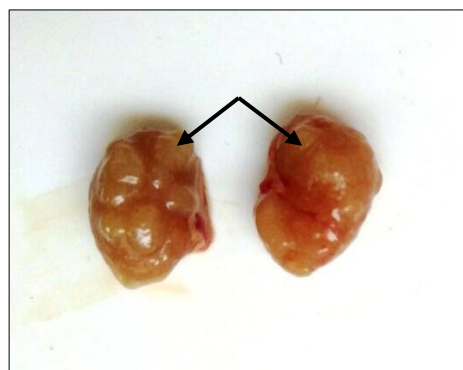
Hypertrophie intestinale, souris traitée par valsartan.



Irritation rénale et hypertrophie gastrique, souris traitée par le valsartan.



Irritation et hypertrophie rénale, souris traitée par le valsartan.



Rien polykystique, souris traitée par le cyclophosphamide.

III. Effet des traitements sur le taux de micronoyaux

Les résultats de dénombrement des micronoyaux dans les différents lots de l'expérimentation sont présentés dans le tableau (6), exprimé en pourcentage ‰.

Nous avons remarqué une augmentation très hautement significative ($p \leq 0,001$) des pourcentages des micronoyaux chez les souris traitées par le valsartan (9,75‰) par rapport au témoin négatif (0,33‰), cependant la comparaison avec le témoin positif (12,42%) est non significative ($p > 0,05$).

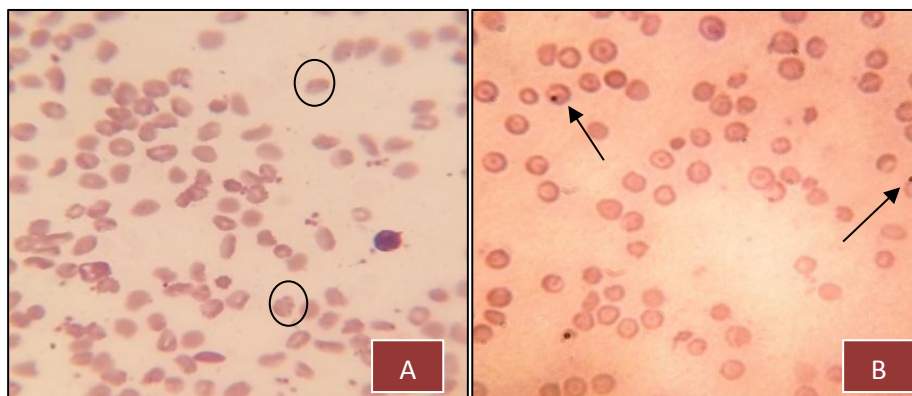
Alors que le taux des micronoyaux est diminué de façon significative ($P < 0.05$) chez les souris prétraitées par EEP+Val (5,625‰) par rapport aux souris traitées par le valsartan seul.

Nous avons remarqué aussi une diminution significative ($P < 0.05$) de taux de micronoyaux chez les souris prétraitées par EEP + CP (4,83‰) par rapport au groupe témoin positif traité par le cyclophosphamide seul.

Tableau 6 : Représente le taux des Micronoyaux chez les souris de différents lots de l'expérience, exprimé en moyenne \pm écart type.

Lots	Moyenne \pm écart type
T(-)	0,33 \pm 0,17
T(+)	12,42 \pm 2,41
FD	9,75 \pm 1,50 ***
EEP+Val	5,625 \pm 0,13
EEP+CP	4,83 \pm 0,76 ^x

*T (-) : témoin négatif ; T (+) : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose ; EEP+Val : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le valsartan à forte dose ; EEP+CP : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le cyclophosphamide. Test de Student : (x) désigne un effet significatif ($P < 0.05$) en comparaison avec T (+), (***) désigne un effet très hautement significatif ($p \leq 0,001$) en comparaison avec T (-).*



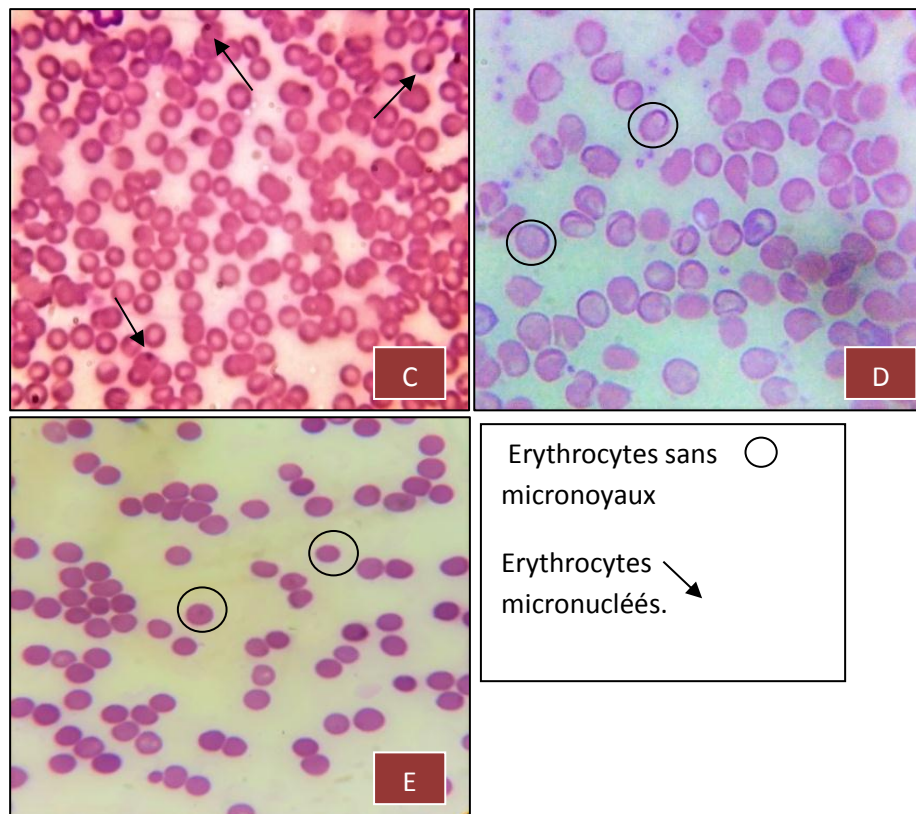


Figure 9 : Photographie montrent certains exemplaires des frottis réalisés pour le test de micronoyaux des souris témoin négatif (photo A), témoin positif (photo B), traité par le valsartan (photo C), prétraité par EEP+Val (photo D) et prétraité par EEP+CP (photo E), après une coloration MGG (GR : $\times 100$).

Le micronoyau apparaît dans les érythrocytes dans le sang circulant ou dans les érythroblastes dans la moelle osseuse comme une petite masse colorée en violet (après coloration MGG). Il témoigne de la génotoxicité du médicament.

Les micronoyaux sont constitués de chromosomes entiers perdus au cours de la mitose précédente (phénomène aneugène) ou de fragments chromosomiques acentriques exclus du noyau de la cellule fille pendant la division cellulaire (phénomène clastogènes) (Eslava, 2004).

Nos résultats montrent une augmentation de taux des micronoyaux des érythrocytes dans le sang périphérique après un traitement par le cyclophosphamide, ce qui confirme sa capacité à induire des dommages chromosomiques (Tripathi et Jena, 2009), due à son activation après métabolisme au

niveau hépatique par le cytochrome P 450 (CYP 450), en générant des métabolites possédant un ou plusieurs groupements alkyles qui peuvent agir directement au niveau de l'ADN, par création des liaisons covalentes avec des groupements électro-négatifs des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN (Pette *et al.*, 1995).

Il a été rapporté que le cyclophosphamide et ses métabolites ont la capacité à induire des mutations létales dominantes, des dommages à l'ADN et la génération de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) *in vivo*. En raison de leur forte réactivité chimique, les radicaux libres induisent des dommages cellulaires de nombreuses manières (Arif *et al.*, 2009). Les effets les plus néfastes des radicaux libres du cyclophosphamide *in vivo* ont été les activités génotoxiques, y compris les dommages à l'ADN, les aberrations chromosomiques, les échanges de chromatides sœurs et les mutations géniques, pouvant conduire à un certain nombre d'affections pathologiques, notamment le cancer (Abdella, 2012).

D'autres études ont montré que l'administration intrapéritonéale de cyclophosphamide pouvait entraîner une augmentation des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs (SCE) (Barton *et al.*, 2003 ; Murata *et al.*, 2004).

Rehman et ces collaborateurs (2012) ont confirmé également la génotoxicité de cyclophosphamide après administration d'une injection unique de médicament par voie intrapéritonéale (ip) à 50 mg/kg de poids corporel chez des souris albinos suisses.

Le traitement par le valsartan à forte dose (2600 mg/kg) a également donné un résultat positif pour le test de micronoyaux (un taux élevé de micronoyaux dans les érythrocytes).

A ce jour, aucun travail n'a montré la génotoxicité de valsartan qui est connu pour être excrété en grande partie sous forme de composé inchangé et est métabolisé de manière minimale dans les microsomes du foie par l'intermédiaire de cytochrome P2C9 (CYP2C9), qui est la seule forme responsable de la 4-hydroxylation du valsartan, en donnant un seul métabolite inactif, le 4-hydroxyvaléryle (4-OH valsartan) (Nakashima *et al.*, 2005).

D'ailleurs il existe une abondance de preuves démontrant le pouvoir mutagène et clastogène de la NDMA (CIRC, 1978 ; ATSDR, 1989), l'impureté découverte dans la matière première du valsartan. Bien que nous ne disposons d'aucune référence pour pouvoir expliquer ce taux élevé de micronoyaux, néanmoins nous pouvons l'expliquer probablement par, la capacité de N-Nitrosodiméthylamine à méthyler les sites nucléophiles de macromolécules cellulaires telles que l'ADN en provoquant des effets clastogène (Fournier, 1990).

La génotoxicité de la NDMA a été constamment démontrée dans de nombreuses études *in vitro* sur des systèmes non humains. Des études *in vivo* ont montré que la NDMA méthyle l'ADN, provoque

la fragmentation de l'ADN et induit la synthèse et la réparation de l'ADN dans le foie et d'autres tissus d'espèces variées. La NDMA induit des aberrations chromosomiques, des échanges de chromatides sœurs et des micronoyaux. Ces effets génotoxiques sont survenus après une inhalation, une administration orale ou intrapéritonéale de NDMA (Ikeuchi et Sasaki, 1981 ; Abe et Sasaki, 1982 ; Bermudez *et al.*, 1982 ; Bamborschke *et al.*, 1983).

Un traitement préalable à l'EEP a réduit la fréquence des ruptures chromosomiques et de la formation de micronoyaux dans les érythrocytes du sang périphérique, ce qui confirme l'effet bénéfique de la propolis dans la réduction des taux des dommages chromosomiques.

D'autres auteurs ont été démontré la capacité de la propolis a diminué les effets génotoxiques de certains agents tels que la doxorubicine (Valadares *et al.*, 2008) et l'irinotécan (Orsolice *et al.*, 2009). Ce mécanisme de protection n'est pas très clair, mais il peut être lié au renforcement du système de défense antioxydant tissulaire en réduisant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et en augmentant les activités enzymatiques antioxydantes principales telles que le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion S-transférase (GST) et la glutathion peroxydase (GSH-Px) (Türkez et Yousef, 2010).

IV. Effet des traitements sur le stress oxydatif tissulaire hépatique

IV.1 Effet des traitements sur l'MDA

Les espèces réactives oxygénées (ERO) peuvent générer des atteintes importantes dans la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuse cible tel que : protéines, lipides et acide nucléiques (Cadenas et Davidies, 2000).

Il est clairement démontré aujourd'hui que les radicaux libres sont responsables de processus toxiques (Lahouel *et al.*, 2004).

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona *et al.*, 2000). Parmi les marqueurs d'évaluation de la peroxydation lipidique, le dialdéhyde malonique (MDA) qui est sans doute le plus connu et le plus utilisé (Guichardant *et al.*, 2006). La quantification de ce dernier est généralement considérée comme un indicateur du stress oxydatif résultant d'une superproduction des ROS et de la diminution des défenses antioxydantes (Servais., 2004).

Les variations des concentrations de MDA cytosolique hépatique, après différents traitements par le valsartan, l'EEP+Val, et l'EEP+CP par rapport au groupe témoin négatif et groupe témoin positif sont présentés dans la figure (10).

Nous constatons une élévation significative ($p < 0,05$) du taux de MDA chez les souris traitées par le valsartan ($2,066 \pm 0,10$ nmol/g de tissu) par rapport aux taux des souris témoins négatifs ($1,129 \pm 0,15$ nmol/g de tissu).

Une variation non significative ($p > 0,05$) du taux de MDA entre le groupe témoin positif ($1,79 \pm 0,31$) et le groupe traité par le valsartan.

Une décroissance non significative ($p > 0,05$) du MDA hépatique a été observée chez les souris prétraitées par l'EEP+Val ($1,443 \pm 0,46$ nmol/g tissu) par rapport à celle des souris traitées seulement par le valsartan.

Une diminution significative ($p < 0,05$) du taux de MDA chez le groupe prétraité par l'EEP+CP ($0,474 \pm 0,019$ nmol/g de tissu) par rapport au groupe témoin positif qui a reçu seulement le cyclophosphamide.

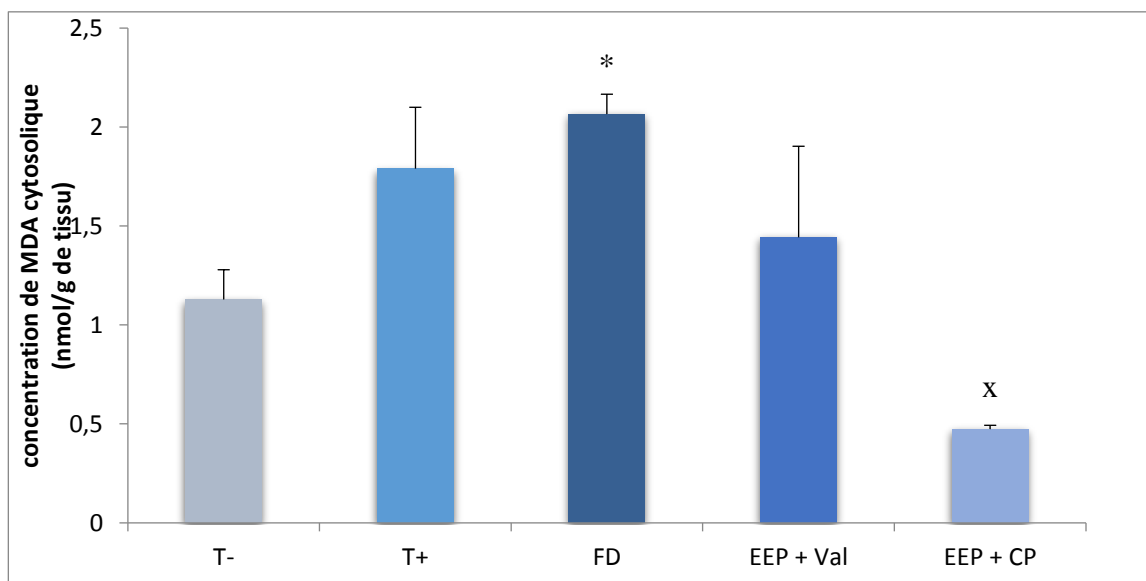


Figure 10 : Variation des taux cytosolique du MDA hépatique des souris traitées par le valsartan et le cyclophosphamide et prétraitées par l'extrait éthanolique de la propolis. T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose ; EEP+Val : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le valsartan à forte dose ; EEP+CP : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le cyclophosphamide. Test de Student :(*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$) en comparaison avec T (-), (X) désigne un effet significatif ($p < 0,05$) en comparaison avec T (+).

L'augmentation de taux cytosolique en MDA après un traitement par le cyclophosphamide peut être expliquée par une forte induction d'une peroxydation lipidique par les radicaux libres dans le tissu hépatique (Stankiewicz et Skrzydlewska, 2003).

Durant le métabolisme du cyclophosphamide et la dégradation de ses métabolites par les enzymes hépatiques, notamment les cytochromes CYP3A4, CYP2C9 et la CYP2B6 (De Jonge *et al.*, 2005), il y aura une production excessive de radicaux libres oxygénés (ROS). Ces ROS peuvent réagir avec différents composants de la cellule. Parmi les dommages qui résultent de cette interaction : la peroxydation lipidique. En effet, le principal métabolite de cyclophosphamide, le 4-hydroxy cyclophosphamide (4-OHCP) induit la peroxydation lipidique dans différents tissus y compris le foie (Stankiewicz et Skrzydlewska, 2003).

Nos résultats montrent que l'administration de valsartan provoque une peroxydation lipidique accrue expliquée par le taux élevé du MDA cytosolique trouvé chez les souris traitées par une forte dose de 2600mg/kg,

Le valsartan est métabolisé dans les microsomes du foie par l'intermédiaire de cytochrome P2C9 (CYP2C9), et donnant un seul métabolite inactif, le 4-hydroxyvaléryle (4-OH valsartan) (Nakashima *et al.*, 2005). Néanmoins le NDMA (l'impureté de valsartan) est métabolisé soit par l'alpha-hydroxylation par, soit la dénitrosation de la nitrosamine. On considère que les deux voies passent par un radical intermédiaire commun $[CH_3(CH_2)NBN=O]$ généré par l'action du système oxydase à fonction mixte dépendant du cytochrome 2E1 (Haggerty et Holsapple, 1990 ; Lee *et al.*, 2006) est probablement induit une peroxydation lipidique au niveau de foie.

Ces résultats diffèrent par rapport à ceux rapportés par d'autres auteurs (Liu *et al.*, 2018) qui ont trouvés que le valsartan a un effet bénéfique sur le stress oxydatif et la diminution de taux de MDA cytosolique. Il faut noter que ces auteurs ont utilisé des doses thérapeutiques (10 à 20 mg/kg) pendant 30 jours.

La diminution de la quantité des produits de peroxydation lipidique observée chez les groupes prétraités par l'EEP (25mg/kg) montre son rôle important dans la réduction du stress oxydative ainsi que sa capacité à protéger le foie contre l'action des ROS. Cette réduction peut être expliquée par la présence des polyphénols et surtout des flavonoïdes qui sont considérés comme des antioxydants puissants. L'effet protecteur des flavonoïdes peut être due à leur capacité à réagir avec les radicaux peroxyde des acides gras polyinsaturés ; inhibant ainsi de ce fait la peroxydation lipidique (Tag, 2015 ; Wang *et al.*, 2016). Cet effet vis-à-vis de la peroxydation lipidique des membranes est bien établi, et dépend de la structure moléculaire et de la capacité d'interagir et de pénétrer dans la bicouche lipidique (Santos *et al.*, 1998 ; Patricia *et al.*, 2005).

IV.2 Effet des traitements sur le GSH

Une autre indication en faveur du processus oxydatif est représentée par le réserve cellulaire en antioxydants en particulier le glutathion. Ce dernier est l'agent antioxydant non-enzymatique intracellulaire principal qui joue un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques (Chakraborty *et al.*, 2009).

Les résultats de variations des concentrations de GSH cytosolique hépatique, après différents traitements par le valsartan, EEP+Val, et EEP+CP par rapport au groupe témoin négatif et groupe témoin positif sont présentés dans la figure (11).

Nous avons enregistré une diminution non significative ($p > 0,05$) des taux de GSH hépatique chez les souris traitées par le valsartan ($0,0331 \pm 0,0136$ mmol/g de tissu) par rapport à celle observée chez le groupe témoin négatif ($0,0558 \pm 0,0202$ mmol/g de tissu).

Une variation non significative ($p > 0,05$) du taux de GSH entre le groupe témoin positif ($0,0313 \pm 0,0062$ mmol/g de tissu) et le groupe traité par le valsartan.

Une élévation non significative du taux de GSH ($p > 0,05$) chez les souris prétraitées par l'EEP+Val ($0,0551 \pm 0,015$ mmol/g de tissu) par rapport aux souris traitées par le valsartan seul.

Nous avons marqué également une augmentation significative ($p < 0,05$) du taux de GSH chez les souris prétraitées par l'EEP+CP ($0,05452 \pm 0,00389$) par rapport au groupe témoin positif traité par le cyclophosphamide seul.

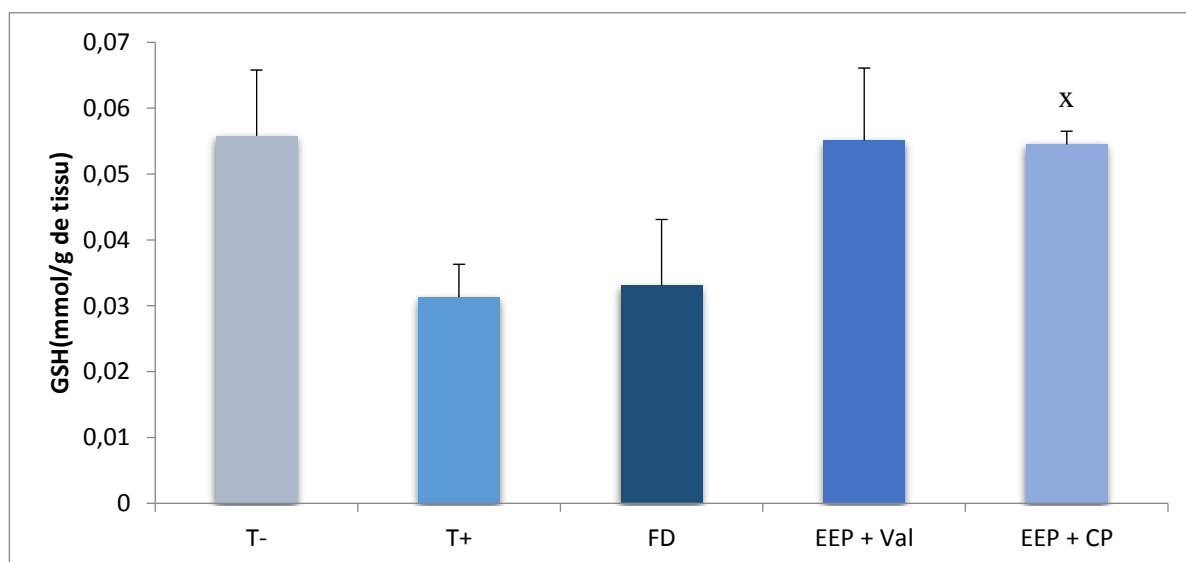


Figure 11 : Variation de l'activité cytosolique de GSH hépatiques des souris traitées par le valsartan et le cyclophosphamide et prétraitées par l'extrait éthanolique de la propolis. T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose ; EEP+Val : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le valsartan à forte dose ; EEP+CP : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le cyclophosphamide. Test de Student : (x) désigne un effet significatif ($p < 0,05$) en comparaison avec T (+).

Le cyclophosphamide induit une déplétion du GSH qui peut être due à son oxydation par les ROS ou par la formation des liaisons avec ces métabolites. Les liaisons entre l'acroléine (métabolite du CP) et le GSH ont un effet toxique (Singh *et al.*, 2014). L'acroléine peut exercer son effet cytotoxique sur les hépatocytes par la réduction du GSH intracellulaire en inhibant le glutathion-S-transférase hépatique ainsi qu'à la diminution des capacités antioxydantes de la cellule conduisant à l'accumulation de l'acroléine dans le foie (De Jonge *et al.*, 2005).

Le traitement par le valsartan montre une diminution significative ($p < 0,05$) de taux de GSH. Cette diminution peut être due à l'effet toxique des métabolites réactifs des impuretés qu'il contient (NDMA), qui peuvent être fixés et neutralisés par le système de détoxification, entraînant une diminution des concentrations de GSH, ou une dégradation du GSH par les ROS produite au cours de métabolisme du NDMA.

Le prétraitement par l'EEP provoque l'amélioration intracellulaire des taux cytosolique de GSH. Cela montre que l'EEP avait un effet positif. On peut expliquer cette augmentation soit par l'action des flavonoïdes au niveau génétique pour induire la synthèse de cette protéine ou sur l'une des étapes de sa biosynthèse soit par l'effet scavenger des flavonoïdes c'est-à-dire au lieu que les métabolites réactifs toxiques se fixent et consomment le glutathion ils vont être captés par les flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Madiha *et al.*, 2012 ; Dalaklioglu, 2013) qui ont constaté que cette déplétion pourrait être due à une stimulation de la synthèse de cet antioxydant et/ou à sa régénération par les polyphénols et les flavonoïdes.

IV.3 Effet des traitements sur les enzymes antioxydantes (CAT et SOD)

Les enzymes antioxydantes (SOD et CAT) limitent les effets des molécules oxydantes dans les tissus et jouent un rôle dans la défense contre les dommages oxydatifs cellulaires étant piègeurs de radicaux libres (Gutteridge, 1995).

IV.3.1 Sur l'activité enzymatique de la CAT

Les résultats de variations des concentrations de CAT cytosolique hépatique, après différents traitements par le valsartan, EEP+Val, et EEP+CP par rapport au groupe témoin négatif et groupe témoin positif sont présentés dans la figure (12).

Nous avons observé une déplétion non significative ($p > 0,05$) de l'activité enzymatique de la CAT chez les souris traitées par le valsartan ($2,07 \pm 1,1$ UI/mg de protéines) par rapport au souris témoins négatifs ($3,75 \pm 0,63$ UI/mg de protéines).

Une variation non significative ($p > 0,05$) de l'activité de la CAT entre le groupe témoin positif ($1,96 \pm 0,35$ UI/mg de protéines) et le groupe traité par le valsartan.

L'activité enzymatique de la CAT chez les souris prétraitées par EEP+Val ($5,29 \pm 1,5$) a montré une augmentation non significative ($p > 0,05$) par rapport aux souris traitées par le valsartan seul.

Nous avons enregistré également une augmentation non significative ($p > 0,05$) de l'activité de la CAT chez le groupe prétraité par EEP+CP ($2,58 \pm 0,55$ UI/mg de protéines) par rapport au groupe témoin positif qui a traité par la cyclophosphamide seul.

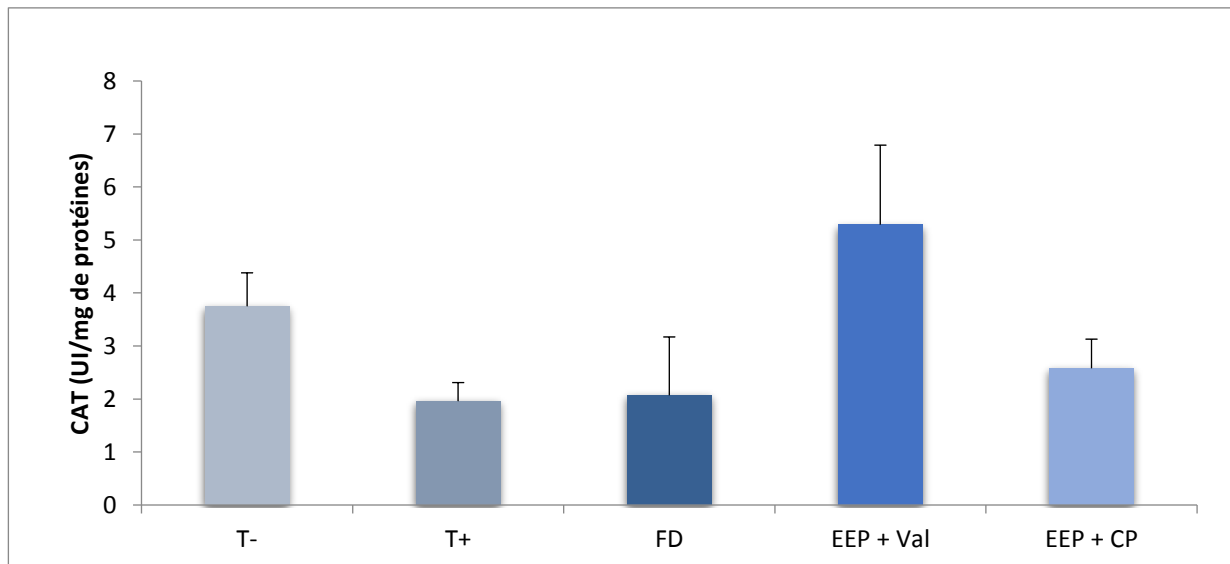


Figure 12 : Variation des taux cytosolique du CAT hépatique des souris traitées par le valsartan et le cyclophosphamide et prétraitées par l'extrait éthanolique de la propolis. *T-* : témoin négatif ; *T+* : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; *FD* : groupe traité par le valsartan à forte dose ; *EEP+Val* : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le valsartan à forte dose ; *EEP+ CP* : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le cyclophosphamide.

IV.3.2 Sur l'activité enzymatique de la SOD

Les résultats de variations des concentrations de SOD cytosolique hépatique, après différents traitements par le valsartan, propolis-valsartan, et propolis-cyclophosphamide par rapport au groupe témoin négatif et groupe témoin positif sont présentés dans la figure (13).

Le traitement par valsartan ($8,05 \pm 1,6$ UI/mg de protéines) provoque une déplétion non significative ($p > 0,05$) de l'activité enzymatique de la SOD hépatique par rapport au groupe témoin négatif ($11,20 \pm 1,4$ UI/mg de protéines).

Une variation non significative ($p > 0,05$) de l'activité de la SOD entre le groupe témoin positif ($9,69 \pm 0,92$ UI/mg de protéines) et le groupe traité par le valsartan.

La propolis a augmenté la SOD hépatique des souris prétraitées par EEP+Val ($10,56 \pm 2,8$ UI/mg de protéines) de manière non significative ($p > 0,05$) par rapport aux souris traitées par le valsartan seul.

La SOD hépatique du groupe prétraité par EEP+CP ($18,65 \pm 1,7$ UI/mg de protéines) a été augmenté de façon hautement significative ($p < 0,01$) par rapport au groupe témoin positif qui a traité par le cyclophosphamide seulement.

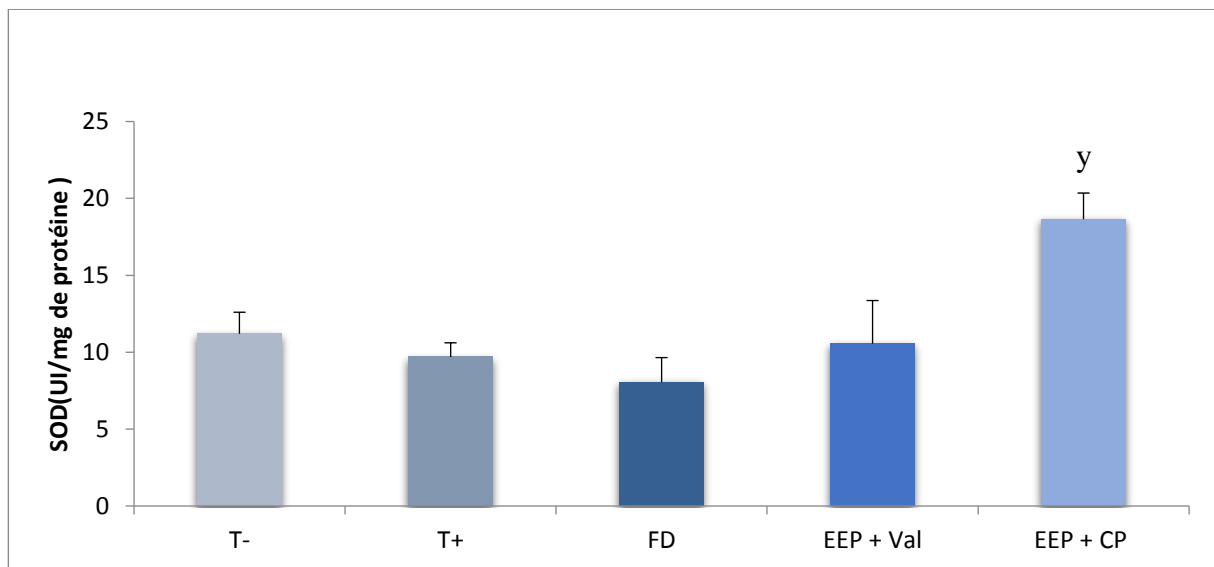


Figure 13. Variation des taux cytosolique du SOD hépatique des souris traitées par le valsartan et le cyclophosphamide et prétraitées par l'extrait éthanolique de la propolis. T- : témoin négatif ; T+ : témoin positif traité par le cyclophosphamide ; FD : groupe traité par le valsartan à forte dose ; EEP+Val : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le valsartan à forte dose ; EEP+ CP : groupe prétraité par L'extrait éthanolique de la propolis et le cyclophosphamide. Test de Student : (y) désigne un effet hautement significatif en comparaison avec T (+).

L'injection de cyclophosphamide aux souris entraîne une diminution de la concentration de la SOD et la CAT, expliqué par l'inhibition de la synthèse enzymatique par le CP ou son métabolite et / ou à l'effet indirect du peroxyde d'hydrogène (Tripathi et Jena, 2009). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par plusieurs auteurs (Stankiewicz et Skrzydlewska, 2003 ; Abraham *et al.*, 2009 ; Valko *et al.*, 2006).

Le traitement par le valsartan montre une diminution de l'activité enzymatique de la CAT et de la SOD hépatique. Cette diminution est due probablement à une saturation des enzymes par les ROS, son inhibition, la destruction de ces enzymes suite au stress cellulaire induit par les métabolites toxiques de NDMA ou encore suite à son oxydation par les ERO.

Un prétraitement par la propolis augmenté le taux de la SOD et de la CAT dans le foie. L'explication probable de cet effet est l'induction de l'activation de ces enzymes ce qui prouve l'effet préventif

de la propolis. Ce si confirme le rôle antioxydant des flavonoïdes qui ont la capacité de capturer et désactiver les radicaux libres (Miguel *et al.*, 2014).

Des études ont montré que la propolis renforce le système antioxydant par la réduction des ROS et l'augmentation de l'activité de la SOD et de la CAT (Kebsa *et al.*, 2014 ; Singla *et al.*, 2014).

V. Effet des traitements sur l'histologie hépatique

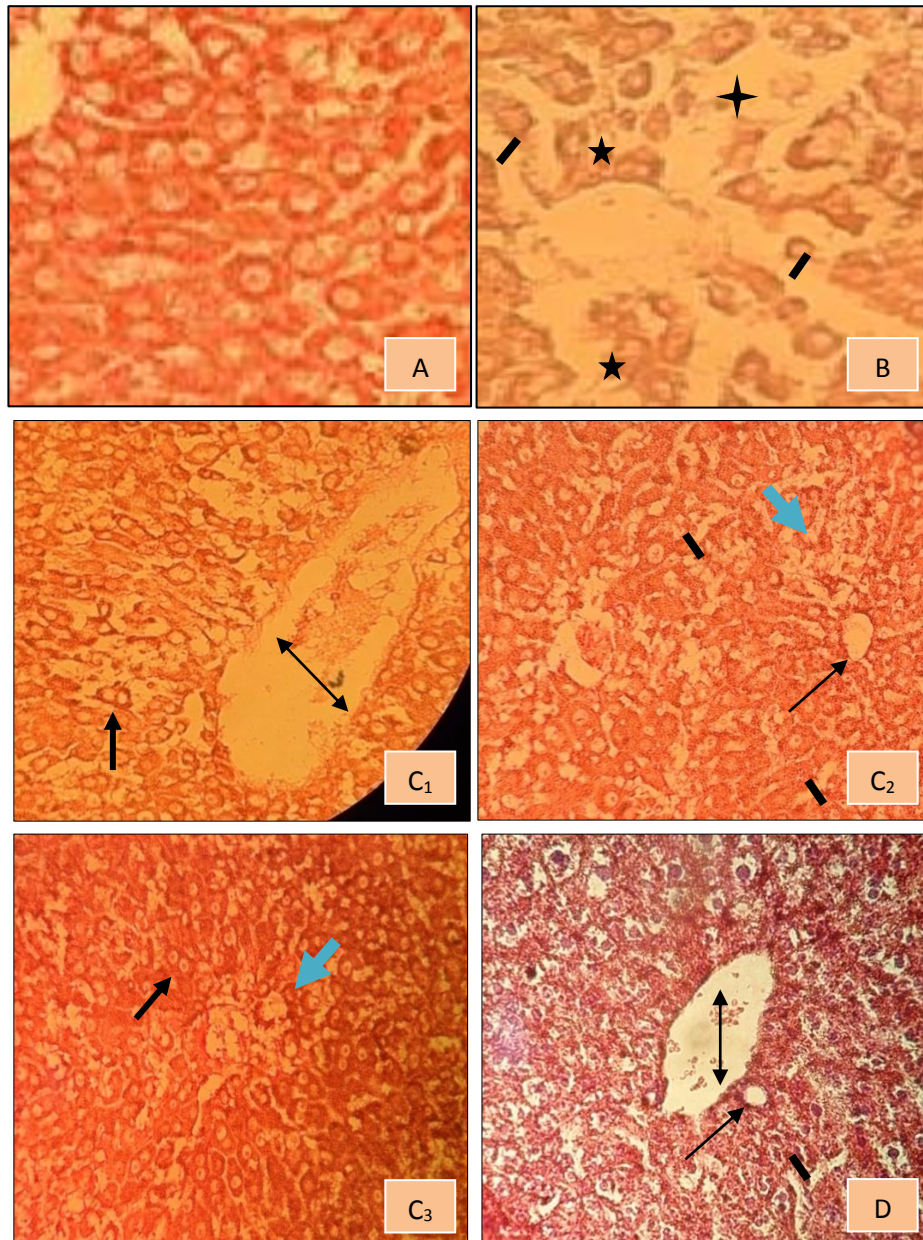
Le stress oxydatif hépatique enregistré dans cette étude est confirmés par une étude histologique des tissus hépatique.

Des coupes histologiques au niveau des foies des souris témoin négatif, témoin positif, groupes traités par le valsartan, groupes traités par l'EEP+Val et le groupe traités par l'EEP+CP, ont été réalisés pour observer les changements tissulaires qui peuvent être apparaitre suite aux différents traitements. Les résultats sont illustrés dans la figure 14.

Le foie du témoin négatif est de structure normale (figure14, A). Une désorganisation sévère des lames hépatocellulaire et dégénérescence des hépatocytes ainsi que la dilatation des sinusoides dans le foie du groupe témoin positif (figure14, B).

Le foie des souris traitées par le valsartan montre une dilatation de veines centro-lobulaires (figure 14, C₁), une hémorragie légère avec vacuolisation (figure14, C₂, C₃), ainsi qu'une dilatation des sinusoides (figure 14, C₂) et l'apparition des double noyaux (figure 14, C₁, C₃).

Chez les groupes prétraités par l'EEP (figure 14, D, E) le foie présente une amélioration minime avec vacuolisation moindre mais persistance de dilatation des sinusoides.



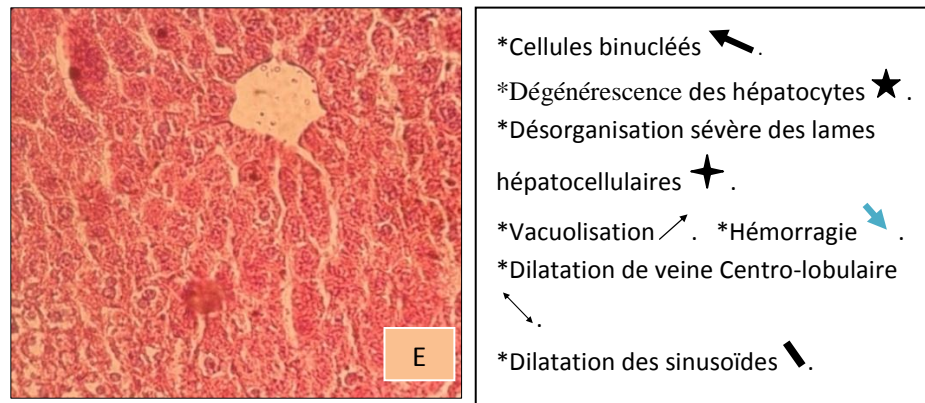
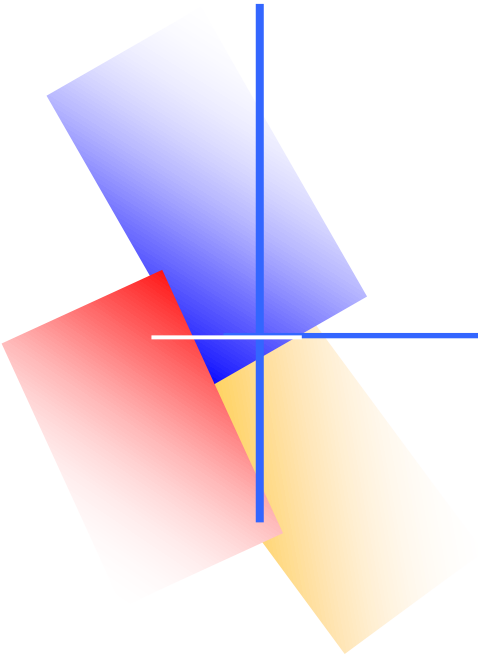


Figure 14 : Coupes histologiques du foie des lots témoin négatif (photos A), témoin positif (photo B), traité par valsartan (photos C₁, C₂, et C₃), traité par EEP+Val (photo D) et traité par EEP+CP (photo E) après coloration à le H&E (GR : × 40).



Conclusion

Nos résultats montrent que l'administration de valsartan et de cyclophosphamide chez les souris, provoque :

- Une augmentation de la fréquence des érythrocytes micronucléés chez les souris, explorée par le test de micronoyaux.
- Une destruction des membranes cellulaires par les radicaux libres, aboutissant à une augmentation de la peroxydation lipidique au niveau hépatique.
- Un déséquilibre du statut antioxydant enzymatique et non enzymatique cellulaire, marqué par la déplétion de l'activité de CAT, SOD et GSH.

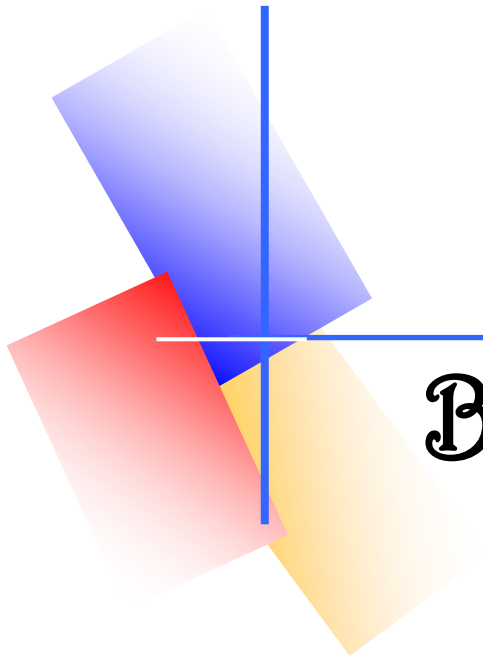
Le prétraitement par la propolis provoque :

- Une diminution de taux des globules rouges micronucléés.
- Une réduction de la peroxydation lipidique hépatique.
- Une amélioration de l'activité des antioxydants enzymatiques (CAT et SOD) et non enzymatique (GSH) au niveau hépatique.

A travers ces résultats, nous ne pouvons ni confirmer ni exclure les dommages chromosomiques provoqués par le valsartan, en raison du suivi limité, l'évaluation des effets à long terme n'était pas possible, et le faible nombre d'effectif rend difficile l'interprétation des résultats.

D'ailleurs, l'effet protecteur de la propolis contre la génotoxicité et le stress oxydant des médicaments a été confirmé.

Il n'y a aucune preuve ou étude qui montre que le valsartan provoque une génotoxicité et un stress oxydatif. Par conséquent, des études complémentaires sont nécessaires pour élucider pleinement les effets sur la santé des produits à base de valsartan contaminés par la NDMA.



Références

Bibliographiques

A

Abe S, Sasaki M. Induction of sister-chromatid exchanges by indirect mutagens/carcinogens in cultured rat hepatoma and oesophageal tumor cells and in Chinese hamster Don cells co-cultivated with rat cells. *Mutat Res*, 1982; 93:409-418.

Abraham P, Rabi S. Nitrosative stress, protein tyrosine nitration, PARP activation and NAD depletion in the kidneys of rats after single dose of cyclophosphamide. *Clin. Exp. Nephro*, 2009; 13:281-287.

Apimondia. Standing commission of apitherapy *Traité d'apithérapie, La médecine par les abeilles [cédérom]* v.1.01 PC-Mac Produit par Api-Ar International SA R Brussels, 2001 ISBN : 2-9600270-0-0.

Araldi RP, Melo TC, Mendes TB, Carvalho RF, Souza EB, Stocco RC. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed. & Pharmaco-ther.*, 2015; 72: 74-82.

Arif K, Ejaj A, Maroof A, Azmat AK, Arun C, Fatima N, et al. Protective effect of liposomal formulation of tuftsin (a naturally occurring tetrapeptide) against cyclophosphamide-induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Ind. J. of Biochem. and Biophy.*, 2009; 46(1): 45-52.

Ashok k. Hakya S. Development and Validation of a Stability-Indicating Liquid Chromatographic Method for Determination of Valsartan and Hydrochlorthiazide Using Quality by Design, 2016; 32(2):777-788.

ATSDR et EPA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry and Environmental Protection Agency. Toxicological profil for N-nitrosodiméthylamine, 1989.

B

Bamborschke S, O'Connor PJ, Margison GP, Maru GB, Kleihues P. DNA methylation by dimethylnitrosamine in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): Implications for a non-inducible hepatic repair system for O⁶ methylguanine. *Cancer Res*, 1983; 43:1306-1311.

Bankova V, Popova M, Trusheva B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem. Cent J*, 2014; 8: 28-35.

Barcia, Juan J. The Giemsa stain: its history and applications. *Int. J Surg Pathol*, 2007; 15(3):292-6.

Barton TS, Wyrobek AJ, Hill FS, Robaire B, Hales BF. Numerical chromosomal abnormalities in rat epididymal spermatozoa following chronic cyclophosphamide exposure. *Biol. Reprod.*, 2003; 69(4): 1150-7.

Benguedouar L, Lahouel M, Gangloff SC, Durlach A, Grange F, Bernard P et Antonicelli F. Ethanolic extract of Algerian Propolis and galangin decreased murine melanoma tumor progression. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016.

Benhacine L et Sahil N. Etude de la génotoxicité des extraits de Pistacia lentiscus par le test d'Ames. *Génétique Appliquée*. Université A. MIRA – Bejaia, 2016 ; 46.

Bermudez E, Mirsalis JC, Eales HC. Detection of DNA damage in primary cultures of rat hepatocytes following in vivo and in vitro exposure to genotoxic agents. *Environ Mutagen*, 1982; 4:667-679.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation in biomembrane (part C: biological oxidation). *Methods in enzymology*, Fleisher S. Fand Packer L (EDS). London Academic Press, 1978; 52: 302-309.

6

Cardinault N, Cayeux MO, Percie SP. La propolis : origine composition et propriétés. *Phytothérapie*, 2012 ; 10 : 298–304.

Chakraborty P, Hossain SK, Murmu N, Kumar JD, Pal S et Bhattachary S. Modulation of cyclophosphamide-induced cellular toxicity by Diphenylmethylselenocyanate In vivo, an Enzymatic study. *Cancer. Mol.*, 2009; 6:183-189.

Chen CN, Wu CL, Lin JK. Apoptosis of human melanoma cells induced by the novel compounds propolin A and propolin B from Taiwanese propolis. *Cancer. Lett.*, 2007; 245: 218-31.

CIRC. Some N-nitroso Compounds: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. *Internat. Agen. for Res. on Can.*, Lyon France, 1978.

Claiborne A. Catalase activity. In CRC, Handbook of Methods for Oxygen Radical Research (Ed. RA Greenwald). CRC Press Boca Raton FL, 1985: 283-284.

D

Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. Hum Exp. Toxicol, 2013 ; 32 : 662-671.

De Jonge ME, Huitema DR, Rodenhuis A, Beijnen SJ. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. Clin. pharmaco. kinet, 2005; 44 (11): 1135-1164.

Dégremont C, Cachot J. La Génotoxicité, quel risque pour les espèces aquatiques. Fascicules Seine-Aval, 2009.

Deka S et Bhattacharjee A. Safety of a drug beyond molecule: what we have learned from recall of valsartan. International Journal of current medical and Pharmaceutical Research, 2018; 4(11):3884-3887.

Dictionary Vidal. Version, 2012.

E

Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, Douglas GR, Nohmi T, Phillips DH, Vickers C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. Mutagenesis, 2009; 24(4):341-9.

EFSA. Scientific Committee. Draft Scientific Opinion on Genotoxicity Testing Strategies applicable in food and feed safety assessment. Euro. Food Safe. Author., 2011.

El Housseini N. Intérêts et applications cliniques de la propolis en médecine bucco-dentaire. Th. Doct. Université de Nantes. France, 2013; 110.

Elespuru RK, Sankaranarayanan K. New approaches to assessing the effects of mutagenic agents on the integrity of the human genome. Mutat Res, 2007; 616(1-2):83-9.

Ellman GL. Plasma antioxidants. Arch. Biochem. Biophys., 1959; 82:70-77.

Erickson RP. Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update. Mutat Res, 2010; 705(2):96-106.

Eslava et Ortega MI. Genotoxicity tests: Usefulness in occupational health Difficulties encountered in their application to the workers medical survey. Arch. Public Health, 2004; 62: 71-81.

F

Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. Mutagenesis, 1999; 14(6):605-612.

Fenech M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. Methods Mol. Med., 2005; 111:3-32.

Flora De S, Izzotti A. Mutagenesis and cardiovascular diseases: Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. Mut. Res./Fund. and Mol. Mechan. of Mutag., 2007; 621(1-2):5-17.

Fournier D, Hawari J, Sheryl HS, Kevin MC, Paul B. Biotransformation of N-Nitrosodimethylamine by Pseudomonas mendocina KR1. App. A Envir. Microbio., 2006 : 6693-6698.

Fournier P. Biotransformation of dimethylnitrosamine. J. de Toxicol. Clin. et Expérim., 1990; 10(5): 283-296.

Fournier R. ABC de l'apithérapie. Paris. Editions Grancher, 2009 ; 140.

G

Goff R, Walburger D K, Fairbairn J. Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells Discriminating apoptosis from necrosis. Scanning, 2006; 20: 407- 455.

Gollapudi BB, McFadden LG. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the micronucleus test. Mut. Res., 1995; 347(2): 97-99.

Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M. Influence of two cultivars of persimmon on atherosclerosis indices in rats fed cholesterol-containing diets: Investigation in vitro and in vivo. Nutrition, 2011 ; 27 (7-8) : 838-884.

Gosse P. Dossier du Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament CNHIM, Revue d'évaluation sur le médicament « Évaluation thérapeutique : SARTANS : antagonistes de l'angiotensine » Publication bimestrielle, 1999.

Graillet V. Appréciation quantitative de l'exposition alimentaire à des mélanges de pesticides et mécanismes de génotoxicité. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2012.

Gupta PK. Fundamentals of Toxicology Essential Concepts and Applications, Elsevier Science Publishing. Co. In., USA., 2016.

Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem., 1995; 41: 1819-1828.

H

Haggerty HG, Holsapple MP. Role of metabolism in dimethylnitrosamine induced immunosuppression: a review. Toxicol., 1990; 63:1–23.

Hasin F, Noon S, Al Hasan H, Nasrin S. Comparative bioequivalence study of different brands of valsartan tablets marketed in Bangladesh by dissolution modeling and quality control tests World. J. of pharma. and pharmaceu. Sci., 2017; 6 (7): 112-121.

Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. N Engl. J. Med., 2009 ; 361(15) : 1475-85.

Houlot R. Techniques d'histopathologie et de cytopathologie. Maloine, 1984; 19(21): 225-227.

I

Iengar V. Characterization of complex chromosomal rearrangement. Mut. Res., 2012; 92: 3-7.

Ikeuchi T, Sasaki M. Differential inducibility of chromosome aberrations and sister-chromatid exchanges by indirect mutagens in various mammalian cell lines. Mut. Res., 1981; 90:149-161.

Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Jujisawa M, Okada S. Dietary supplementation of curcumin enhanced antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: Possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicocyt. Pharmacol. Toxicol., 2003; 92: 33-38.

L

Jean JM et Hall KB. 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: role of base stacking. *Proce. of the Natio. Acad. of Sci.*, 2000; 98(1):37-41.

José M and Sforcin JM. Biological properties and therapeutic Applications of Propolis. *Phytother. Res.*, 2016; 30: 894-905.

K

Kadam B R and Bari S B. Quantitative analysis of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by high performance thin-layer chromatography with ultraviolet absorption densitometry. *Acta chromatographica*, 2007; 18.

Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M and others. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mut. Res.*, 2007; 628(1):31-55.

Kjeldsen SE, Brunner HR, Gordon TM, Stolt P. Valsartan in the treatment of hypertension, 2005.

L

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

Lahouel M, Boukour S, Segueni N, Fillastre JP. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Pathol. Biol.*, 2004; 52:314-322.

Lee VM, Keefer LK, Archer MC. An evaluation of the roles of metabolic denitrosation and α -hydroxylation in the hepatotoxicity of N-nitrosodimethylamine. *Chem. Res. Toxicol*, 2006; 9:1319-1324.

Lemière S. Intérêt du test des Comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale (Doctoral dissertation), Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 2004.

Lin SC, Lin YH, Chen CF, Chung CY, Hsu SH. The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *Am J Chin Med*, 1997; 25: 325-332.

Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 2006; 7: 22-31.

Lucy H, Swift L H, Golsteyn RM. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. *Interna. J. of Mol. Sci.*, 2014; 15(3):3403-3431.



M Abdella E. Short-Term Comparative Study of the Cyclophosphamide Genotoxicity Administered Free and Liposome-Encapsulated in Mice. *Iran J. Cancer Prev.*, 2012; 2:51-60.

Madiha AH, AbdEllah F, Ebtesam MG. The Possible Ameliorative Effect of Propolis in Rat's Liver Treated with Monosodium Glutamate (MSG). *Nat. and Sci.*, 2012; 10(12).

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 1974; 47: 469-474.

Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 1974; 47: 469-474.

Mateuca R, Lombaert N, Aka P V, Decordier I, Volders KM. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 2006; 88(11): 1515-1531.

Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut. Res*, 1990 ; 239 :29-80.

Mehtap S et Sevgi T. Bioavailability file : Valsartan. *Fabad J. Pharm. Sci*, 2007 ; 32 :185-196.

Michel C. Biomarqueurs de génotoxicité chez *Dreissenapolyomorpha* : indicateurs de la pression chimique urbaine et variabilité naturelle des lésions de l'ADN, *Ecotoxicologie*, Université Pierre et Marie Curie, 2011.

Mirtuka BM et Rawnsley HM. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals-New-York: Masson pub. USA, 1977: 23-24, 41-57, 71-75.

MONOGRAPHIE DE PRODUIT. PrTEVA-VALSARTAN/HCTZ (comprimés de valsartan et d'hydrochlorothiazide) Teva Canada Limitée 30. Numéro de contrôle de la présentation : 188658, Date de révision : Le 06 novembre 2015.

MONOGRAPHIE DE PRODUIT.[®]DIOVAN-HCT^{MD} (comprimés de valsartan et d'hydrochlorothiazide) Novartis pharma. Canada inc. Numéro de contrôle de la présentation : 221691, Date de révision : 13 février2019.

Mostafalou S and Abdollah M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. and App. Pharma.*, 2013; 268: 157–177.

Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Rad. Biol. and Med.*, 2004; 37(6): 793-802.



Nakashima HA, Kawashita N, Masuda C, Saxer M, Nina Y, Nagae et Kiwasaki. Identification of cytochrome P450 forms involved in the 4-hydroxylation of valsartan, a potent and specific angiotensin II receptor antagonist, in human liver microsomes. *Xenobiotica*, 2005; 35(6): 589-602.

Naseem AC, Areeg AA, Shailesh KB, et Ziyaur R. Lesson Learnt from Recall of Valsartan and Other Angiotensin II Receptor Blocker Drugs Containing NDMA and NDEA Impurities. *AAPS Pharm. Sci. Tech*, 2019; 20:166.

Norata GD, Marchesi P, Passamonti S, Pirillo A, Violi F, Catapano AL. Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis*, 2007; 191 (2): 265-271.



Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 1979 ; 95(2) : 351-358.

Olivie A, Pascale B, Marie A. DALMASSO : « pharmacie galénique B.P », 2ème édition, groupe Liaison SA, 2005.

Orsière, Thierry, et al. De la génotoxicologie à la biosurveillance, Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, Annales, 2005 ; 28 : 25-28.

Orsolic N, Benkovic V, Lisicic D, Dikic D, Erhardt J, Knezevic HA. Protective Effects of Propolis and Related Polyphenolic/Flavonoid Compounds Against Toxicity Induced by Irinotecan. *Med. Oncol.* in press., 2009.

Ostling O and Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984 ; 123 : 291-298.



Parr MK et Joseph JF. NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *J. Pharm. Biomed Anal.* 2019; 5(164): 536-549.

Paulo SL, Souza IF, Wandekoken KG. Micronucleus test in peripheral blood of rats treated with hyperbaric oxygen after subtotal splenectomy preserving the lower pole. *Acta. Cirúr. Bras.*, 2015; 30 (4): 1678-2674.

Pette M, Gold R, Pette DF, Hartung HP, Toyka KV. Mafosfamide induces DNA fragmentation and apoptosis in human T-lymphocytes. A possible mechanism of its immunosuppressive action. *Immun. pharma.*, 1995; 30: 59-69.

Poštulka J, Slavicek P, Fedor J, Farnik M, Kocisek J. Energy Transfer in Microhydrated Uracil, 5-Fluorouracil, and 5-Bromouracil. *J. of Phys. Chem.*, 2017 ; 121(38) : 8965-8974.



Ramos AFN et Miranda JL. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins. incl.*, 2007; 13: 697-710.

Reeba A, Ravish F, Veena M, Riaz A. Effect of N'-nitrosodimethylamine on red blood cell rheology and proteomic profiles of brain in male albino rats. *A. Interdisci. Toxicol.*, 2011 ; 4(3) : 125–131.

Rehman MU, Tahir M, Ali F et al. Cyclophosphamide –induced nephrotoxicity and damage in kidney genomic DNA of swiss albino mice the protection effect of Ellagic acid. *Mol. and cell. Biochem.*, 2012 ; 365: 199-127.

Ricou-Berthelot A. Risque genotoxique et ovocytes. Etude sur modèle souris de la génotoxicité des cryoprotecteurs et des protocoles de vitrification ovocytaire. Th. de Doc. Université d'Aix-Marseille, 2014.

Rieger R, Michaelis A, Green MM. A glossary of genetics and cytogenetics, class. and mol. 3rd ed. New York, Springer, 1968.

Rogers A M, Back K C. Comparative mutagenicity of 4 DNA-intercalating agents in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mut. Res. /Gen. Toxicol.*, 1982; 102(4):447-455.



Santillán ME, Bujaidar EM, González IÁ, Martínez MT, Salinas GJ, Bautista M, González MÁ, Rubio GM, Faisal JL, Morales-González JA. Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J. Gastro. Enterol.*, 2014; 20 (40): 14787-14804.

Santos AC, Uyemura SA, Lopes LC, Bazon JN, Mingatto FE, Curti C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Rad. Biol. Med*, 1998; 24:1455-1461.

Saydam M, takka S. Bioavailaity file: valsartan. *Fabad. J. Pharm. Sci.*, 2007; 32:185-196.

Schmid W. The micronucleus test. *Mut. Res.*, 1975; 31: 9-15.

Sforcin JM. Propolis and the immune system: à review. *J. Ethno. pharmacol.*, 2007; 113: 1–14.

Shirkhedkar AA, Suraj RC, Amod SP, Sanjay J. A Concise Review on Analytical Profile of Valsartan. *Eura. J. of Anal. Chem.*, 2017; 12(4):337-364.

Siddiqui N, Asif H, Chaudhry L, Shamsheer MA, Mitra M, Parminder S. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Valsartan: A Review. *J. of App. Pharma. Sci.*, 2011; 01 (04): 12-19.

Singla S, Kumar NR, Kaur J. In vivo studies on the protective Effect of propolis on Doxorubicin Induced Toxicity in liver of Male Rats. *Toxicol. Int.*, 2014; 21:191-195.

Slatter MA, Gennery AR. Primary immuno-deficiencies associated with DNA-repair disorders. *Expert Rev Mol Med*, 2010; 12:9.

Sobreira NL, Gnanakkan V, Walsh M, Marosy B, Wohler E, Thomas G, Valle D. Characterization of complex chromosomal rearrangements by targeted capture and next-generation sequencing. *Gen. Res.*, 2011; 21(10):1720-1727.

Stankiewicz A, Skrzydlewska E. Protection Against cyclophosphamide-induced renal oxidative stress by Amifostine: The Role of Antioxidative Mechanisms. *Toxico. Mech. Meth.*, 2003; 13:301-308.

Sung JH, Kim KK, Kim DW, Kim JO, Lee BJ, Yong CS, Choi HG. Novel valsartan-loaded solid dispersion with enhanced bioavailability and no crystalline changes, *Int. J. Pharm.*, 2012; 422:202-210.

T

Tag HM. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. *Comp. and Alt. Med.*, 2015; 15:252.

Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagen.*, 2003; 18: 187-194.

Thuillez C, Amah G. Mécanismes d'action de l'association amlodipine-valsartan. 2007 ; 21: 4.

Thybaud V, Aardema M, Clements J, Dearfield K, Galloway S, Hayashi M, Kram D J, Kirkland D, MacGregor JT, Marzin D and others. Strategy for genotoxicity testing: Hazard identification and risk assessment in relation to in vitro testing. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2007; 627(1):41-58.

Tripathi DN, Jen GB. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: A study in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 2009; 180: 398–406.

Türkeza H et Ibrahim Y. The Effect of Propolis on Aluminum-Induced Genotoxicity in Human Lymphocytes, 2009.

T^o

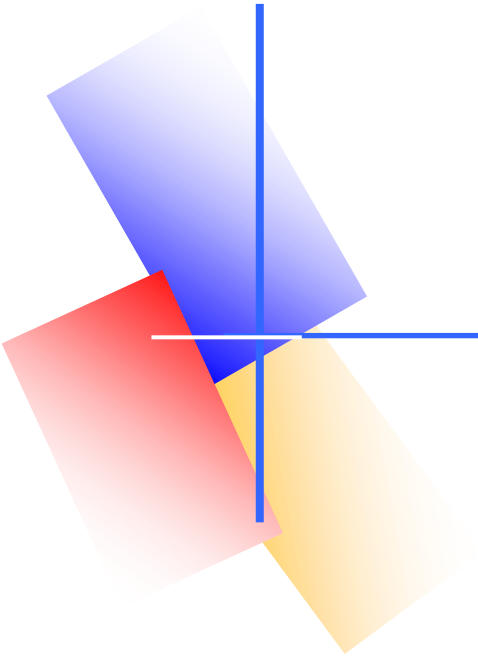
Valadares BL, Graf U, Spano MA. Inhibitory Effects of Water Extract of Propolis on Doxorubicin-Induced Somatic Mutation and Recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem. Toxicol.*, 2008; 46 : 1103-1110.

Viala A, Botta A. Toxicologie. 2^{ème} édition. Ed : Lavoisier, 2009 :03-10,20-21.

Vincent F. Rapport relatif au projet d'étude en génotoxicité de l'environnement marin, 1993.

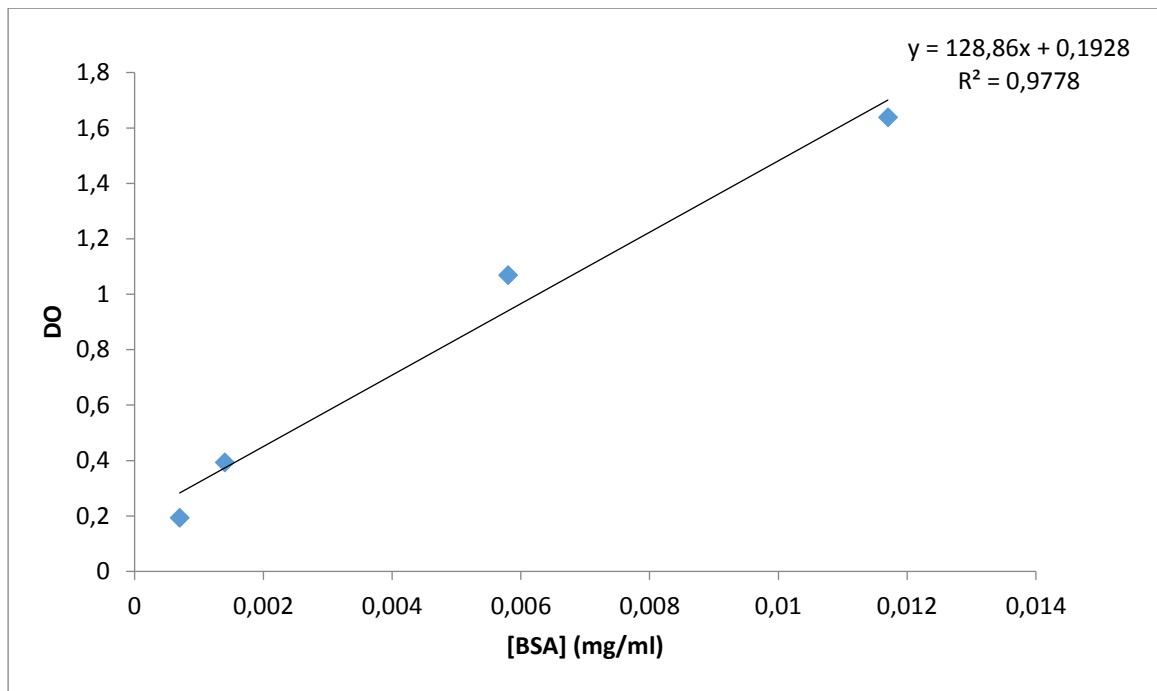
Z

Zaid AN, Cortesi R, Qaddomi A, Khammash S. Formulation et bioéquivalence de deux comprimés de valsartan après une administration orale unique .Sci Pharm., 2011; 79 (1): 123-135.



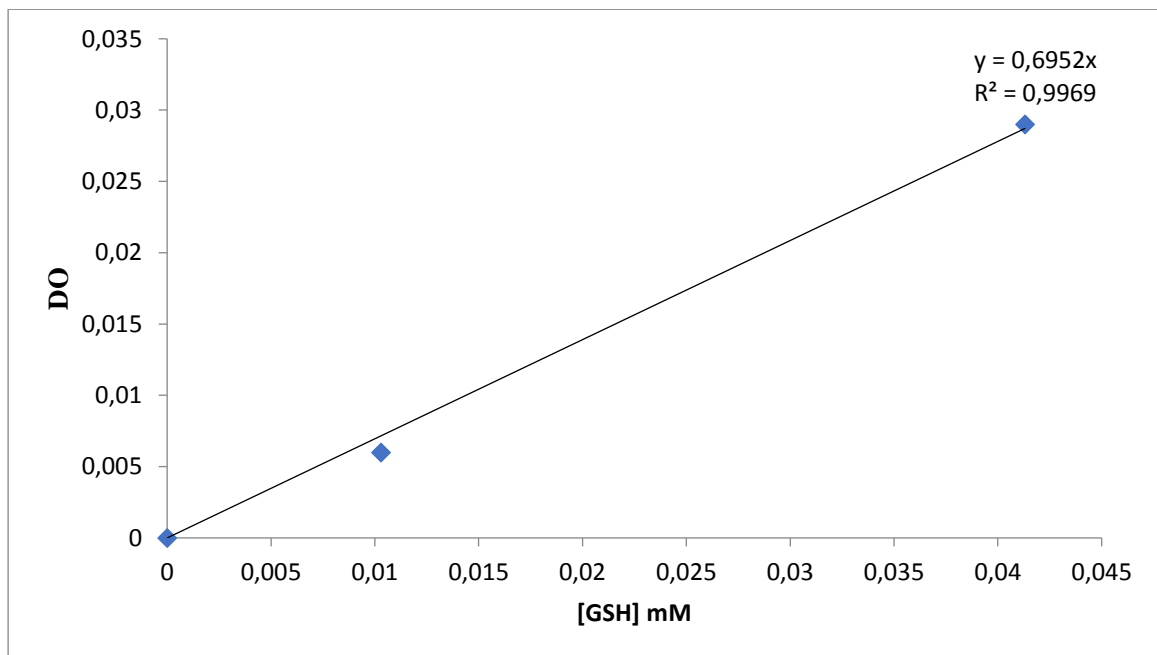
Annexes

Annexe 1 :



Courbe d'étalonnage des protéines (BSA)

Annexe 2 :



Courbe d'étalonnage du GSH

Annexe 3 :

Paramètres Groupes	[GSH] Mm/g de tissu	[MDA](nM/g de tissu)	[CAT] UI/mg de protéine	[SOD] UI/mg de protéine
Témoin (-)	0,0558±0,0202	1,129±0,15	3,75±0,63	11,20±1,4
Témoin (+)	0,0313±0,0062	1,79±0,31	1,96±0,35	9,69±0,92
Forte dose (valsartan)	0,0331±0,0136	2,066±0,10	2,07±1,1	8,05±1,6
EEP+Val	0,0551±0,015	1,443±0,46	5,29±1,5	10,56±2,8
EEP+PC	0,05452±0,00389	0,474±0,019	2,58±0,55	18,65±1,7

Présenté par : Bouzok Fatma Bouhekara Ratiba Boutebakh Yassamine	Encadré par : Dr. Bouhafs Leila
	Date de soutenance : 23/07/2019
Thème : Etude de l'effet de l'extrait éthanolique de la propolis sur la génotoxicité et le stress oxydatif hépatique induit par le valsartan, un antagoniste de l'angiotensine II	
Master Académique en Biologie : option Biochimie et santé	

Résumé : Le valsartan est un antagoniste de récepteur AT1 de l'angiotensine II, il est préconisé pour traiter l'hypertension. La NDMA est une impureté trouvée lors de la fabrication de la matière première du valsartan, cette dernière est fortement génotoxique. La présente étude vise à évaluer l'effet de la propolis contre l'hépatotoxicité et la génotoxicité suite au traitement par une forte dose de valsartan (2600mg/Kg/2jours) en comparaison avec contrôle négatif et la cyclophosphamide comme contrôle positif. En effet en comparaison avec le témoin négatif. Chez les souris traitées par le valsartan et le cyclophosphamide, les érythrocytes micronucléés sont augmentés, le niveau de peroxydation lipidique (MDA) est élevé, les paramètres antioxydants (catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD), et glutathion (GSH)) sont réduits. Le prétraitement par l'extrait éthanolique de la propolis à 25mg/Kg/j pendant 5 jours a amélioré favorablement tous ces paramètres. Nos résultats suggèrent que probablement le valsartan induit une génotoxicité et un stress oxydatif hépatique et que la propolis possède des effets préventifs.

Mots clés : Valsartan, cyclophosphamide, génotoxicité, stress oxydatif, NDMA

Abstract: Valsartan is an angiotensin II AT1 receptor antagonist, it is recommended for hypertension's treatment. NDMA is a highly genotoxic impurity found while manufacturing the raw material of valsartan. The purpose of this study is to evaluate the effect of propolis against hepatotoxicity and genotoxicity following the treatment with a high dose of valsartan (2600mg/Kg/2 days) in comparison with negative control and cyclophosphamide as positive control. Indeed, in comparing this negative control with mice treated with valsartan and cyclophosphamide, micronucleated erythrocytes are increased, antioxidant parameters (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathion (GSH)) are reduced. Pre-treatment with propolis at 25mg/Kg/day for 5 days positively improved all these parameters.

Our results suggest that probably valsartan induces genotoxicity and oxidative stress in the liver and that propolis has preventive effects.

Key words: Valsartan, cyclophosphamide, genotoxicity, oxydatif stress, NDMA.

المخلص:

فالسارتان مضاد لمستقبلات AT1 لـ الانجيوتنسين II يوصى به لعلاج ارتفاع ضغط الدم. وتعتبر NDMA من الشوائب التي تم العثور عليها أثناء تصنيع المادة الأولية للفالسارتان، والتي تعتبر مادة سامة للغاية. تهدف هذه الدراسة تقييم تأثير هذه المادة على السمية الكبدية والسمية الجينية بعد العلاج بجرعات عالية من الفالسارتان (2600 مغ / كغ / لمدة يومين) بالمقارنة مع شواهد سلبية والسيكلوفوسفاميد كشاهد ايجابي. وبالفعل، ومقارنة مع الشواهد السلبية لدى الفئران المعالجة بالفالسارتان و المعالجة بالسيكلوفوسفاميد ارتفاع في كريات الدم الحمراء ذات النواة الصغيرة و مستوى البيروكسيد MDA، بالإضافة إلى انخفاض في معايير مضادات لوحظ السائل

الأكسدة، الكاتالاز CAT، سيبارأوكسيد ديسموتاز SOD والجلوتاثيون GSH. ويؤدي العلاج المسبق بالذنج (البروبوليس) بمعدل 25 مغ/كغ/ يومياً لمدة خمسة أيام إلى تحسين جميع هذه المعايير بشكل ايجابي. تقترح نتائجنا أنه من المحتمل أن يحدث الفالسارتان سمية جينية وإجهاد تأكسدي على مستوى الكبد، وأن الذنج أو البروبوليس له تأثير وقائي ضد هذه الاضطرابات.

الكلمات المفتاحية: فالسارتان، سيكلوفوسفاميد، السمية الوراثية، إجهاد التأكسدي، NDMA