



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : biologie animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Immunologie moléculaire et cellulaire ; Oncologie*

Intitulé :

Etude de l'effet du venin de l'abeille *apis mellifera* sur quelque marqueur d'inflammation, de lésions hépatiques et du stress oxydatif

Présenté et soutenu par : *MOKHTARI Mohamed Badreddine*

Le : 23/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : *NAIMI Dalila* (Prof – ENSB Constantine),

Rapporteur : *EL OUAR Ibtissem* (MCA - UFM Constantine),

Examineur : *AGGOUN Cherifa* (MCB - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

REMERCIEMENTS

*En préambule à ce mémoire, louange à **Allah** le tout miséricordieux pour son guide, son aide dans un parcours acharné envers le savoir scientifique et qui nous a permis de mener à bien ce modeste travail, Merci DIEU.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mon cher encadreur Mlle **EL OUAR** J, De m'avoir encadré et formé techniquement comme scientifiquement. De m'avoir laissé suffisamment d'indépendance pour me permettre de développer mes projets, tout en les cadrant intelligemment. Et plus simplement de m'avoir supporté dans tous les sens du terme. Merci pour votre confiance, compréhension, gentillesse et de ton aide sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*J'exprime mes remerciements également aux membres de jury chapotés par Mme **NAIM** D, Mme **AGGOUN** C qui me fait l'honneur de faire partie du jury.*

Mes vifs remerciements s'adressent à m'a famille, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir toujours soutenus moralement, physiquement et financièrement.

*Je remercie Mr **Madassi** pour son aide, ces services, sa gentillesse et son soutien inestimable.*

*Je tiens a remercier mon premier maitre dans l'apiculture Mr **Beloucif A. M.** et le club scientifique Acti-Vet, à mon deuxième maitre Mr **Diabi M.** de m'avoir aidé et enseigné les abc de l'apiculture, sans ce travail n'aurait pas pu être fait.*

*Je remercie aussi Mr **Belbekri. N** de m'avoir accepté et autorisé à utilisé les ruches, pour sa gentillesse et ses conseils.*

Mes remerciements vont aussi à Mme **Bouabi K.**, docteur vétérinaire, qui m'a aidé et assisté à l'animalerie.
Sans oublier Mr **Akni N.**, Melle **Zetal H.** et Melle **Latreche A.** pour leurs aides, services et leurs conseils.

Je tiens à remercier Mr **Haman D.** de m'offrir un stage ouvert à son laboratoire **Ibn Sina** pour sa gentillesse, aide et générosité. Je remercie aussi toute l'équipe d'**Ibn Sina** : **Yassin, Badreddine, Abdellkader, Ilyes, Bilele, Imed, Ines ...** pour leurs modesties, leurs aides et leurs gentillesse.

Je remercie aussi Mme **Rahmoune** et Melle **Bahi** pour leurs aides, leurs conseils.

Mes vifs remerciements vont aussi à Mr **CHEBEL Brahim El Khalil** le responsable de labo d'immuno pour son aide, sa collaboration et surtout sa gentillesse. Je tiens à remercier aussi à Mr **Bennouar F.**, à Mr **Laraba D.**, à Mr **Boufrioua A.**, à Mr **Nabil B.**, Mr **Boumella H.** et Mme **Zerrougui L.** pour leurs aides et leurs services.

Mes vifs remerciements vont aussi à toute l'équipe de formation d'immunologie : Mr **Bensouyad**, Mme **Zidoun**, Mme **Nessib**, Mme **Rahmoune**, Melle **Benlêtreche**, Mme **Sedrati**, Mme **Madoui**, Melle **Mechati**, Mr **Messaoudi**, Mr **Kaabouche**, Mr **Othmani**, Mme **Benchriete**, Mr **Kehili ...**

Je remercie aussi mon ami et mon binôme Mr **Kahoul F.** qui m'a beaucoup aidé dans la réalisation notre mémoire à l'**UFC**.

Je tiens à remercier Mr **ABDELSALAM**, le menuisier de notre cité, qui m'a offert la sciure de bois pendant plus de quatre mois.

Sans oublier mes deux frères et amis **Fengour Mouloud** et **Mahmoud Ali Ismail** qui ont été tout le temps présent avec moi, ils ont travaillé avec moi comme si on est un trinôme, **MERCI**, **MERCI** et un autre grand **MERCI**.

Dédicace

Je dédie ce travail à ma mère, mon père, mes sœurs, à Khalti Fouzia, à tous mes oncles et tentes pour leurs encouragements, leurs sacrifices et leurs aides.

Je dédie ce travail à mes grands parents qui m'ont toujours poussé et encouragé à étudier, vos mots et vos encouragements, vous resterez toujours dans mon cœur.

Je dédie ce travail à toute personne qui m'a enseigné et contribué à ma formation pendant toute ma carrière.

Je dédie ce travail aussi à tous mes amis et mes collègues que j'ai connu au cours de mon parcours.

SOMMAIRE

Liste des figures et tableau

Liste des abréviations

Introduction 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INFLAMMATION

1. Définition 3

2. Types d'inflammation 3

3. Mécanisme 4

II. Le stress oxydant

1. Définition du stress oxydatif 7

2. Les Radicaux libres 7

3. Mécanismes Pro-oxydant 8

4. Mécanismes antioxydant 9

5. Les dommages cellulaires 11

5.1. Peroxydation des lipides 11

5.2. Oxydations des protéines 12

5.3. Oxydation de l'ADN 12

III. La carcinogénèse

1. Définition 14

2. Etiologie 14

3. Les mécanismes génétiques de la progression tumorale 16

4. Les étapes de la cancérogenèse 17

IV. la glande mammaire

1. Présentation de la glande mammaire 19

2. La Mammogenèse 20

PARTIE PRATIQUE

I. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matériels biologiques

2. Traitement 23

3. Prélèvement et dissection 24

4. Analyse quantitative et qualitative des protéines sériques 24

4.1. Electrophorèse des protéines sériques 24

4.2. Dosage des protéines totales	24
5. Effet de différents traitements sur les lésions hépatiques	25
5.1. Dosage de l'activité de l'alanine-amino transférase	25
5.2. Dosage de l'activité de l'aspartame-aminotransférase	26
6. Dosage de l'activité de lactate-déshydrogénase sérique	27
7. Dosage du monoxyde d'azote	27
8. Préparation de l'homogénat	28
9. Dosage des Protéines totaux du foie	28
10. Dosage du catalase	29
11. Analyse statistique :	30
II. RESULTATS	
1. Etude macroscopique des effets des différents traitements sur la morphologie des glandes mammaires	31
2. Effet des différents traitements sur le poids des animaux	33
3. Effet de différents traitements sur les lésions hépatiques	34
3.1. Effet du traitement sur l'activité de l'enzyme TGP	34
3.2. Effet du traitement sur l'activité de l'enzyme TGO	35
4. Effet du traitement sur l'activité du LDH	36
5. Analyse qualitative et quantitative des protéines sériques	37
5.1. Effet du traitement sur les protéines totales	38
5.2. Effet du traitement sur le taux de l'albumine	38
5.3. Effet du traitement sur le taux des protéines alpha 1	39
5.4. Effet du traitement sur le taux des protéines alpha 2	40
5.5. Effet du traitement sur le taux des protéines beta 1	40
5.6. Effet du traitement sur le taux des protéines beta 2	41
5.7. Effet du traitement sur le taux des gamma globulines	42
6. Effet du traitement sur le taux du monoxyde d'azote	43
7. Effet du traitement sur l'activité de la catalase:	43
III. DISCUSSION	44
IV. CONCLUSION	50
V. REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE	51

LISTE DES FIGURES ET TABLEAU:

Figure 1: Les composants cellulaires et moléculaires qui réagissent lors de l'inflammation et la résolution	6
Figure 2: Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les radicaux libres et les antioxydants endogènes	7
Figure 3 : Schéma représentant les réactions de génération des ROS.	9
Figure 4: La synthèse de l'oxyde de nitrique et peroxy-nitrite ; NOS cellulaire- cNOS	9
Figure 5: Les différents types d'antioxydants exogènes et endogènes	10
Figure 6 : L'implication du NO dans le stress oxydatif.	11
Figure 7 : Sources et piègeurs des ROS ; rôle dans le contrôle de l'homéostasie redox dans les cellules normales et cancéreuses	13
Figure 8: Caractéristiques des cellules tumorales	14
Figure 9 : Facteurs endogènes et exogènes favorisant le développement tumoral	16
Figure 10: localisation des glandes mammaires chez le rat	19
Figure 11: Mise en place des crêtes mammaires et croissance des bourgeons primaires au sein du mésenchyme chez le rat	21
Figure 12: la morphologie des TEB et du canal galactophore	22
Figure 13: Les différents étapes du développement mammaire à partir du primordium mammaire embryonnaire, suivies par les diverses étapes postnatales développementales, jusqu'à la ménopause	22
Figure 14: Gamme d'étalonnage NO réalisée par le NaNO ₂	28
Figure 15: La courbe de la gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.	29
Figure 16: Les différentes tumeurs avec les différentes localisations	32
Figure 17: Postule former dans le lieu de piquer	32
Figure 18: Effet des différents traitements sur l'évolution du poids des rattes	33
Figure 19: Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique du TGP	34
Figure 20 : Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique du TGO	35
Figure 21 : Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique du TGO	36
Figure 22 : Electrophérogramme des protéines sériques obtenue par électrophorèse capillaire	36

Figure 23 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines totaux sériques	37
Figure 24 : Effet des différents traitements sur le taux de l'albumine	38
Figure 25 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines alpha 1	38
Figure 26 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines alpha 2	39
Figure 27 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines beta 1	40
Figure 28 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines beta 2	41
Figure 29 : Effet des différents traitements sur le taux des gamma globulines	41
Figure 30 : Effet des différents traitements sur le taux du monoxyde d'azote	42
Figure 31 : Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique de la catalase	42

Tableau 1 : Systèmes de classification des gènes impliqués dans cancer	18
---	----

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac	Anticorp
APC	Antigene presenting cell
BLV	Bovine leukimia virus
BSA	Bovine serum albumin
DAMP	Danger / Damage Associated Molecular Pattern
DC	Dendritic cell
EBV	Epstein-Barr virus
IL	Interleukine 1, 2,...
LDH	Lactate-deshydrogenase
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
PAMP	Pathogene Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PRR	Pattern Recognition Receptor
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
TEB	Terminal end bud
TGO	Aspartate-aminotransférase
TGP	Alanine-amino transférase
Th	T helper
TNF	Tumor necrosis factor

INTRODUCTION

Introduction

Les modèles animaux des cancers sont indispensables dans les découvertes des médicaments et dans le processus de développement de nouveaux médicaments contre le cancer (**Ruggeri et al., 2014**). Le rat a été la principale espèce modèle utilisée dans plusieurs domaines biomédicaux, notamment dans le développement de médicament, y compris les tests de cancérogénicité. En ce qui concerne le cancer du sein, les carcinomes de rats et les carcinomes humains montrent des évolutions et des caractéristiques histopathologiques similaires (**Szpirer, 2009**).

L'inflammation est un mécanisme protectif employé par les tissus contre les antigènes exogènes et endogènes. L'inflammation chronique est une condition pathologique prolongée caractérisée par une infiltration des cellules immunitaires mononucléaires (monocytes, macrophages, lymphocytes, plasmocytes), une destruction tissulaire et une fibrose. L'association de la réaction inflammatoire avec presque tous les cancers supporte le concept que l'inflammation est un composant crucial dans la progression tumorale (**Rasic et al., 2016**).

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production des radicaux libres, et son élimination par des antioxydants. Le stress oxydant interagit avec les trois étapes de la cancérogenèse. Durant l'initiation, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produisent des dommages au niveau de l'ADN. Dans la promotion, les ROS contribuent à une expression anormale des gènes résultants à l'augmentation de la prolifération cellulaire et/ou la diminution de l'apoptose dans la population cellulaire initiée. Finalement, le stress oxydant participe à la progression tumorale en ajoutant d'autres altérations génétiques (**Reuter et al., 2010**).

Par ailleurs, l'apithérapie ou « médecine des abeilles » est une méthode qui permet de prévenir et traiter certaines pathologies aiguës ou chroniques par des produits biologiques issus de l'abeille ou transformés par elle : le miel, la cire, la propolis, le pollen, la gelée royale et le venin (**Juglard, 2015**).

Le venin d'abeille est une mixture complexe de substances chimiques pharmacologiquement complexe. Il est largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter multiples troubles inflammatoires, comme : le rhumatisme, l'arthrites et la sclérose en plaque. En plus, plusieurs études ont reporté ses propriétés cytotoxiques contre

divers types de cellules tumorales, tels que : les cellules cancéreuses du poumon, du foie, du rein, du prostate et du sein (AL-Ani et al., 2015).

Il existe peu d'étude ayant étudié l'effet du venin d'abeille sur le processus de carcinogénèse (Jeong et al., 2014; Lee et al., 2015; Zheng et al., 2015). Cependant, l'objectif de notre travail est de tester l'existence d'un éventuel effet anti-tumoral du venin d'abeille sur des tumeurs chimio-induites de glandes mammaires.

Dans un premier temps, nous commençons par le développement d'un modèle de tumeur de glandes mammaires chez le rat, au niveau de laboratoire de biologie et physiologie cellulaire et moléculaire. Sur lequel nous allons tester l'effet protecteur du venin, contre la tumorigénèse mammaire et sur quelques paramètres :

- Le profil électrophorétique des protéines sériques dans le but de dépister l'existence ou non d'un syndrome inflammatoire, une carence martiale, une hémolyse intra-vasculaire, une cirrhose.
- Quelques paramètres de stress oxydatif en dosant l'activité de la catalase et le taux du monoxyde d'azote (NO).
- L'effet sur les lésions hépatiques en dosant les activités enzymatiques de l'alanine aminotransférase et de l'aspartate aminotransférase ainsi que la lactate-déshydrogénase sérique afin d'évaluer le degré de lésions tissulaires induites par les différents traitements.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

I. INFLAMMATION

1. Définition :

Le mot inflammation dérive du latin *inflammare* ou “*inflamao*” qui veut dire enflammer ou mettre en feu (**Palavra et al., 2015 ; Irfan et Debasis, 2014**).

L'inflammation est un processus physiopathologique complexe qui se produit au niveau des tissus vascularisés, en réponse à une agression d'origine exogène (infectieuse ou traumatique) ou endogène (ischémie- reperfusion ou autres) (**Koeberle et Werz, 2014 ; Parag et al.,2015**). Cette réponse implique des cellules circulantes, des cellules résidentes locales et des médiateurs solubles (**Chapel et al., 2014**).

La réponse inflammatoire a pour but de lutter contre une agression, de rétablir l'homéostasie (**Kotas et Medzhitov, 2015**) et de cicatrifier des tissus ou des plaies (**Barnig, 2016 ; He et al., 2015**).

2. Types d'inflammation :

Selon la durée de la réponse, l'inflammation peut être aiguë ou chronique

2.1. L'inflammation aiguë :

L'inflammation aiguë est une réponse du système immunitaire naturel qui assure un isolement rapide de l'agent agresseur (**Voher, 2016**). Elle ne persiste que pour une courte durée allant de quelques heures à quelques jours (**Palavra et al.,2015**).

Ce type d'inflammation est défini par les quatre signes cardinaux du Cornelius Celsus (environ le premier siècle) : **RUBOR, TUMOR, CALORE et DOLORE** qui veulent dire : rougeur, gonflement (tumeur), chaleur et douleur (**Reynolds et Haniffa, 2015**). Récemment, la perte de fonction (*functio laesa*) a été rajouté au anciens signes cardinaux (**Karin et Clevers, 2016 ; Banerjee, 2014 ; Shen et al., 2013**).

2.2. L'inflammation chronique :

L'inflammation chronique est un état pathologique retardé qui persiste pour une période prolongée qui peut durer de quelques mois à plusieurs années (**Parag et al., 2015**). Elle est caractérisée par une inflammation continuellement active et une destruction tissulaire

concomitante à des tentatives de réparation qui se terminent souvent par des fibroses (Palavra et al., 2015). Le foyer inflammatoire dans ce cas est caractérisé par une infiltration des cellules immunitaires mononucléaires (monocytes, macrophages, lymphocytes et plasmocytes) (Buckley et al., 2015).

Ce type d'inflammation est à l'origine de divers maladies chroniques comme : le cancer, le diabète, l'arthrite et l'athérosclérose (Mathew et Unnikrishnan, 2015).

3. Mécanisme :

Quelle que soit le siège et la nature de l'agent déclencheur, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs.

Le processus inflammatoire est initié par les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les mastocytes. Ces cellules résident les tissus et détectent à l'aide des récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor) tout « signal de danger » émit par :

- **PAMPs (Pathogene Associated Molecular Patterns)** qui sont des molécules ou motifs conservés par les micro-organismes pathogènes (virus, bactérie ou champignon).
- **DAMPs (Danger / Damage Associated Molecular Patterns)** ce sont des signaux de danger libérés par les cellules en cas du stress, traumatisme, ischémie ou après une mort cellulaire par nécrose.

Il est important de signaler que certaines études divisent l'inflammation selon la nature de l'agent causant en ; inflammation infectieuse (provoqué par un agent infectieux ou des PAMPs) et inflammation stérile (provoqué par les DAMPs) (Jiménez-Dalmaroni et al., 2016; Volmering et al., 2016; Feldman et al; 2015).

Suite à leur activation par les DAMPs ou les PAMPs, les cellules inflammatoire résidentes secrètent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 (CXCL8), l'IL-12, le TNF α , l'histamine, l'héparine, les leucotriènes et les prostaglandines. Ces derniers vont activer les polynucléaires, les lymphocytes, les plasmocytes et les monocytes (Parag et al., 2015).

La réponse inflammatoire se manifeste sur deux phases : **phase vasculaire** et **phase cellulaire**

3.1. La phase vasculaire :

Les médiateurs pro-inflammatoires agissent sur les cellules endothéliales des vaisseaux. Une fois activées ces dernières expriment des molécules d'adhésion et

initient des changements vasculaires dont les principaux phénomènes sont : vasodilatation avec augmentation du flux sanguin local, augmentation de la perméabilité vasculaire et pénétration des liquides plasmiques dans les tissus (ou œdème inflammatoire) (**Abbas et al., 2015**).

3.2. La phase cellulaire :

Les médiateurs pro-inflammatoires précoces vont également coordonner l'activation et le recrutement des neutrophiles, suivis par les monocytes puis les lymphocytes (**Barnig, 2016**). Les leucocytes sont attirées par chimiotactisme sur un gradient de concentration de cytokines du moins vers le plus concentré. La sortie de ces cellules du sang est assurée par un processus organisé en 4 étapes :

- Etape 1: capture.
- Etape 2: roulement
- Etape 3: marginalisation
- Etape 4 : diapédèse ou extravasation

Pendant cette phase les neutrophiles phagocytent et dégradent les bactéries, les complexes immuns et les débris cellulaires (**Parham, 2015**). Une clairance totale requiert également les composants de la réponse immunitaire adaptative. En générale, la résolution de la réponse inflammatoire aiguë repose sur la capacité de la lymphe à drainer avec succès les liquides, les cellules et les débris aux ganglions lymphatiques avoisinants où ils seront apprêtés et présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (*APC *antigene presenting cell**) au lymphocyte spécifique T et B.

Les lymphocytes B se transforment en plasmocytes qui secrètent des anticorps (Ac) spécifique et les LT se différencient en Th1 (T helper) qui vont renforcer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (**Actor, 2015**).

Une réponse inflammatoire réussie est suivi par une phase de résolution qui rétablit l'homéostasie (**Kotas et Medzhitov, 2015**). Aujourd'hui, il est bien établi que la résolution de l'inflammation est un processus active impliquant des cytokines et autres médiateurs anti-inflammatoires, plutôt que d'être une simple coupure des voies pro-inflammatoires (**Minihane et al., 2015**). Elle comprend plusieurs étapes :

- La limitation ou la cessation de l'infiltration des neutrophiles.

- L'activation de l'apoptose des neutrophiles qui seront éliminés par les macrophages par efferocytose (efferocytosis).
- La transformation des macrophages de l'activation classique (M1) à l'activation alternative (M2), le retour des cellules non phagocytés à la circulation sanguine ou lymphatique et finalement l'initiation du processus de guérison (**Headland et Norling, 2015**).

En cas d'un défaut dans la résolution ou l'élimination de l'agresseur la réponse inflammatoire devient chronique (**Linthout et al., 2014**).

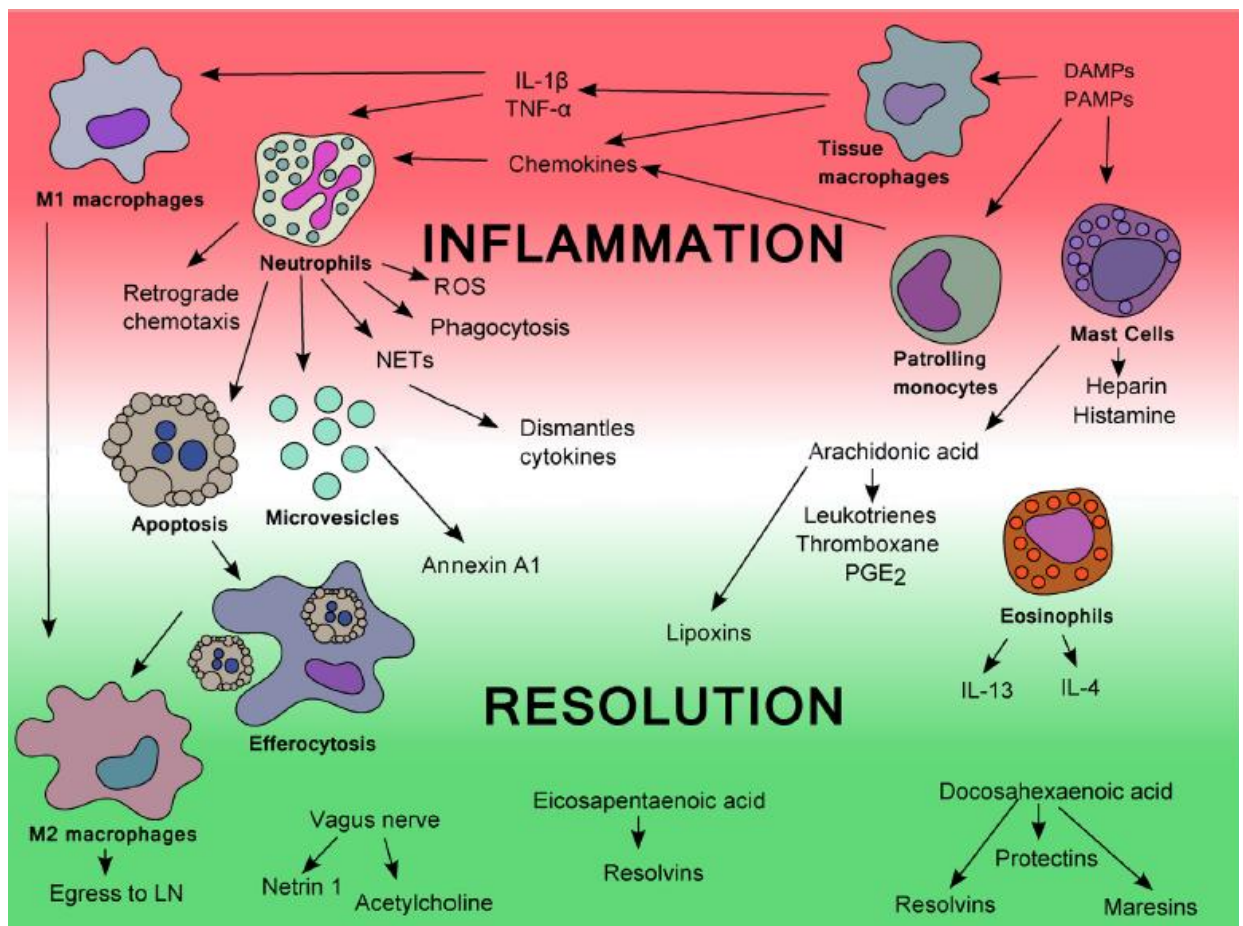


Figure 1: Les composants cellulaires et moléculaires réagissant lors de l'inflammation et la résolution. (D'après **Headland et Norling, 2015**).

II. Le stress oxydant

1. Définition du stress oxydatif :

Le stress oxydant est un phénomène se produisant lors d'un déséquilibre de l'homéostasie redox. Il se traduit par une formation excessive des radicaux libres résultante d'une défaillance de la capacité anti-oxydante ou de la surabondance des radicaux libres. Ce déséquilibre entraîne des dommages au niveau des différents composants cellulaires protéines, lipides et acides nucléiques (**Fig. 2**) (**Fatima et al., 2014**).

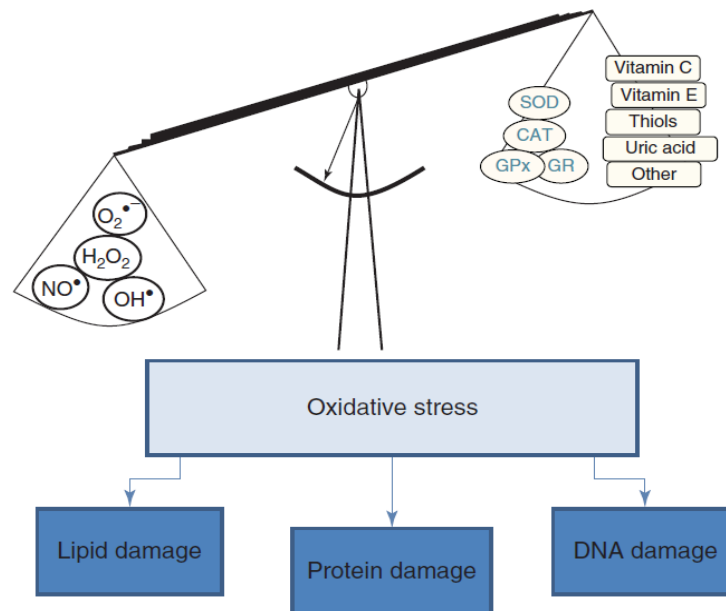


Figure 2: Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre les radicaux libres et les antioxydants endogènes. (Selon **Armstrong et Stratton, 2016**)

2. Les radicaux libres :

En chimie, un atome ou une molécule qui contient un ou plusieurs électrons non appariés dans la couche de valence est considéré comme un radical. L'absence d'un tel appariement des électrons rend les radicaux, dans la plupart des cas, instables, de courtes durées de vie et réactifs avec d'autres molécules car ils cherchent un état énergétique plus stable ; soit par perte ou gain d'un électron (**Lepetsos and Papavassiliou, 2016**). Par conséquent, les radicaux libres ont le potentiel de catalyser diverses réactions cellulaires dont certaines sont bénéfiques et d'autres nuisibles. L'effet bénéfique se produit habituellement de manière contrôlée lorsque le radical est contenu à l'intérieur d'une

enzyme ou d'un substrat locale. Par contre, l'effet nuisible est observé lorsque les radicaux existent sans aucun contrôle chimique ou biologique (**Robert et al., 2015**).

Les dérivés actifs de l'oxygène ou de l'azote sont des molécules simples issues du métabolisme de l'oxygène, produites physiologiquement dans tous les organismes aérobies. Les espèces les plus réactives sont le radical hydroxyle (OH^\bullet), le radical peroxyde (ROO^\bullet), et à un moindre degré l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) devient actif en présence d'ions de métaux de transition comme le cuivre ou fer qui catalyse la réaction de Fenton et génère OH^\bullet . L'oxyde de nitrique (NO) est un dérivé actif de l'azote qui peut réagir avec $\text{O}_2^{\bullet -}$ pour former des ions peroxynitrite (ONOO^\bullet) (**Guerby et al., 2015**).

Les ROS et les espèces réactives de l'azote (RNS reactive nitrogen species) se comportent comme des seconds messagers indispensables dans diverses réponses cellulaires comme la prolifération, la migration et l'angiogenèse. Ils participent aussi aux réactions redox réglementaires et dans divers mécanismes de la réponse immunitaire comme la phagocytose (**Lepetsos and Papavassiliou, 2016**).

3. Mécanismes pro-oxydant :

Les ROS sont générés soit par réduction incomplète de l'oxygène au niveau de la mitochondrie (principalement lors de situation entraînant une sur-activation de la chaîne respiratoire comme dans le cas de l'effort physique) ou par différents systèmes enzymatiques et dans ce cas on parle de ROS primaires dont la molécule principale est l'anion superoxyde. Les principaux complexes enzymatiques impliqués dans la génération des ROS sont la NADPH oxydase membranaire, la xanthine oxydase, les enzymes de la voie de l'acide arachidonique (lipooxygénase, cyclo-oxygénase), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et du peroxysome. Ces systèmes enzymatiques sont activés lors de nombreuses situations comme l'inflammation, les épisodes infectieuses, l'exposition à des toxines environnementaux ou à des xénobiotiques. À partir de ces ROS primaires, toute une série de ROS secondaires (radicaux hydroxyle, peroxyde et alkoxyde) et d'espèces non radicalaires (peroxyde d'hydrogène, ozone. . .) peut être formée (**Fig.3**) (**Durand et al., 2013; Lepetsos et Papavassiliou, 2016**).

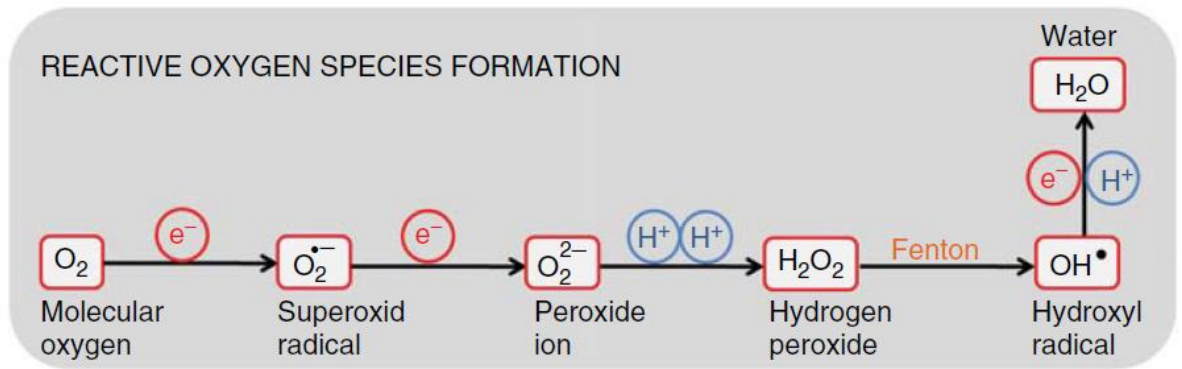


Figure 3 : Schéma représentant les réactions de génération des ROS. (D'après **Battino et al., 2016**)

L'oxyde nitrique participe dans plusieurs processus biologiques, comme : la signalisation et la vasodilatation dans le système respiratoire, nerveux, cardiovasculaire et immunitaire (**Zhang et al., 2016**). Le NO est généré dans un grand nombre de cellules endothéliales, neutrophiles, cellules neuronales et chondrocytes, il est généré continuellement, par l'oxyde nitrique synthase neuronale (NOS nitric oxide synthase) et le NOS endothéliale, en quantités afin d'assurer la fonction de divers processus physiologiques (**Fig. 4**) (**Lundberg et al., 2015**).

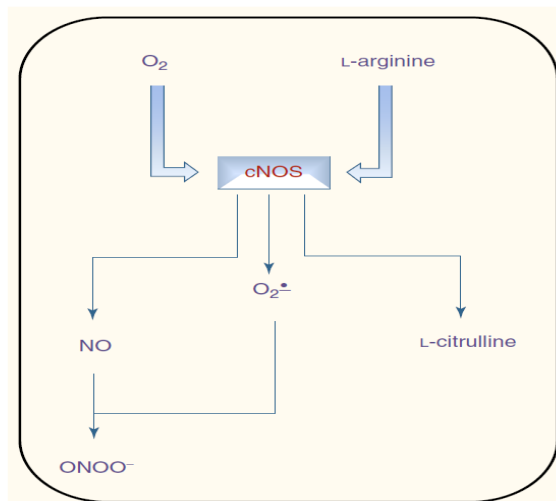


Figure 4: La synthèse de l'oxyde de nitrique et peroxy-nitrite ; NOS cellulaire- cNOS. (**Dietrich-Muszalska, 2016**)

4. Mécanismes antioxydant :

Le terme d'antioxydant désigne, toute molécule capable de retarder, diminuer ou inhiber significativement l'oxydation d'un substrat (**Durand et al., 2013**). Classiquement, on répertorie les antioxydants selon leur origine, les antioxydants endogènes de types

enzymatiques sont plutôt impliqués dans la neutralisation des ROS alors que les antioxydants non enzymatiques et ceux d'origine exogène sont des donneurs de proton ou d'électron (**Portal-Núñez et al., 2016**).

Les antioxydants peuvent également être différenciés selon leur mécanisme d'intervention, mais surtout selon le niveau auquel ils interviennent dans le processus d'oxydation. Ainsi, une première « ligne de défense » est assurée par les antioxydants dits « préventifs » chargés de contrôler la formation des ROS en réduisant par exemple le peroxyde d'hydrogène et les lipoperoxydes ou en séquestrant les ions métalliques comme le fer et le cuivre (**Ceriello et al., 2016**).

Les antioxydants peuvent également intervenir en tant que capteurs (*scavenger*) des espèces réactives formées avant qu'elles n'attaquent les molécules biologiquement essentielles. Cette deuxième ligne de défense peut être assurée par différentes enzymes, comme la glutathion peroxydase, la catalase ou le superoxyde dismutase ou encore par des composés de type phénolique ou aromatique. (**Fig. 5**) (**Lepetsos et Papavassiliou, 2016**).

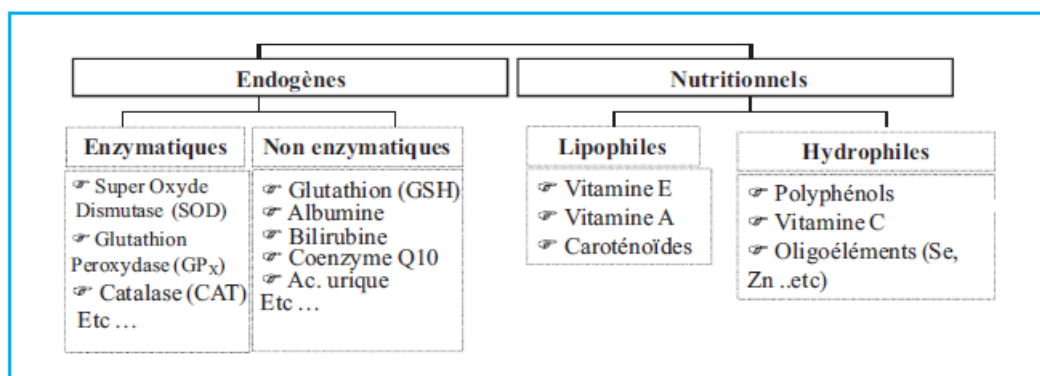


Figure 5: Les différents types d'antioxydants exogènes et endogènes. (D'après **Durand et al., 2013**)

5. Les dommages cellulaires :

Le déséquilibre entre la production des ROS/RNS et les défenses antioxydants, en faveur des pro-oxydants, produit un stress oxydatif. Les macromolécules comprenant l'ADN, les protéines et les lipides, qui représentent le volume de la masse majeur d'une cellule, sont les cibles les plus communes. Mais, même les petites molécules (molécules de signalisations) peuvent être affectés (**Fig.6**) (**Roberts et al., 2015**).

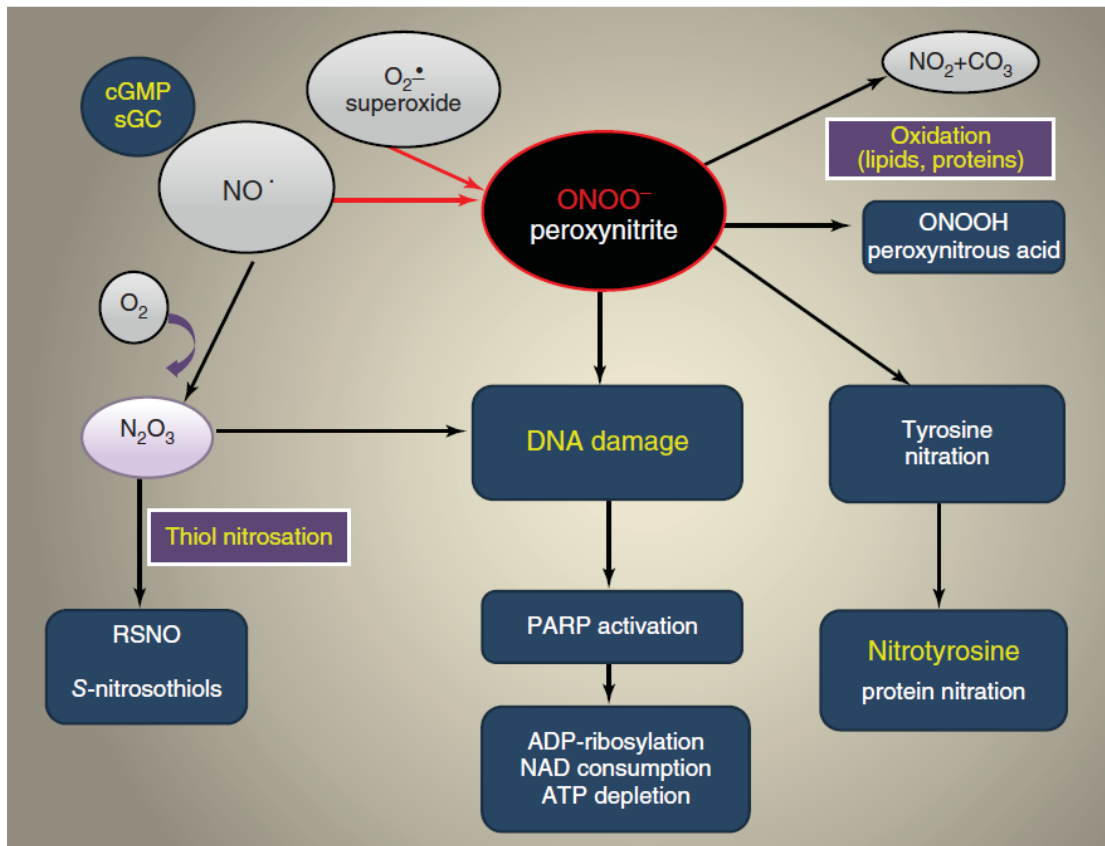


Figure 6 : L'implication du NO dans le stress oxydatif. (Dietrich-Muszalska, 2016)

5.1. Peroxydation des lipides :

Les lipides (les phospholipides membranaires) et plus spécifiquement les acides gras polyinsaturés sont des cibles privilégiées des ROS en raison de leur richesse en hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables. Plus l'acide gras est riche en doubles liaisons, plus il est peroxydable, c'est-à-dire dégradé par un processus oxydant non enzymatique néfaste pour la cellule, parce qu'il cause des dommages à la membrane et modifie ses propriétés biophysiques telles que la fluidité, la perméabilité, plus l'inactivation des enzymes et des récepteurs associés à la membrane.

Il existe plusieurs bio-marqueurs de la peroxydation lipidique comme la malondialdéhyde (MDA), les lipides peroxides, les substances réactives d'acide thiobarbiturique (thiobarbituric acid reactive substances TBARS) (Armstrong et Stratton, 2016).

5.2. Oxydations des protéines :

Les protéines sont également largement impactées par les ROS. Les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine), soufrés (méthionine, cystéine) ou aromatiques (phénylalanine, tryptophane, tyrosine) sont particulièrement sensibles aux oxydations. L'oxydation va conduire à la perte d'acides aminés essentiels, notamment par addition de groupements carbonyles. Ces groupements carbonyles peuvent réagir avec des fonctions amines non oxydées de la lysine pour former des liaisons imines (-HC N-), qui peuvent conduire à l'agrégation des protéines. L'oxydation des cystéines conduit à la formation de ponts disulfures qui participent aussi à l'agrégation des protéines. La phénylalanine et la tyrosine peuvent être oxydées en L-dihydroxyphénylalanine (LDOPA) ou L-trihydroxyphénylalanine (L-TOPA), ces deux produits d'oxydation étant potentiellement des composés mutagènes. L'oxydation de deux tyrosines proches peut aussi conduire à la formation de dityrosine, qui lorsqu'elle se forme à partir de deux chaînes peptidiques différentes représente aussi un facteur d'agrégation des protéines. Enfin, le tryptophane peut être oxydé en hydroxytryptophane, dont les métabolites (hydroxyindole et hydroxykinurénine), formés en milieu très oxydant, présentent une activité mutagénique élevée (**Hardin et al., 2015**).

5.3. Oxydation de l'ADN :

L'ADN est une cible privilégiée pour les ROS. Le radical d'hydroxyle réagit avec les constituants de l'ADN entraînant des dommages aux bases hétérocycliques d'ADN (ou bases azotées, bases nucléiques) et la partie de sucre par une variété de mécanismes. L'addition d'un électron (e^-) et/ou d'un proton (H^+) aux liaisons doubles des bases de l'ADN se produisent souvent et causent des dommages au génome.

La guanine, par exemple, peut réagir avec OH^\cdot pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer (**Fig.7**) (**Durand et al., 2013**).

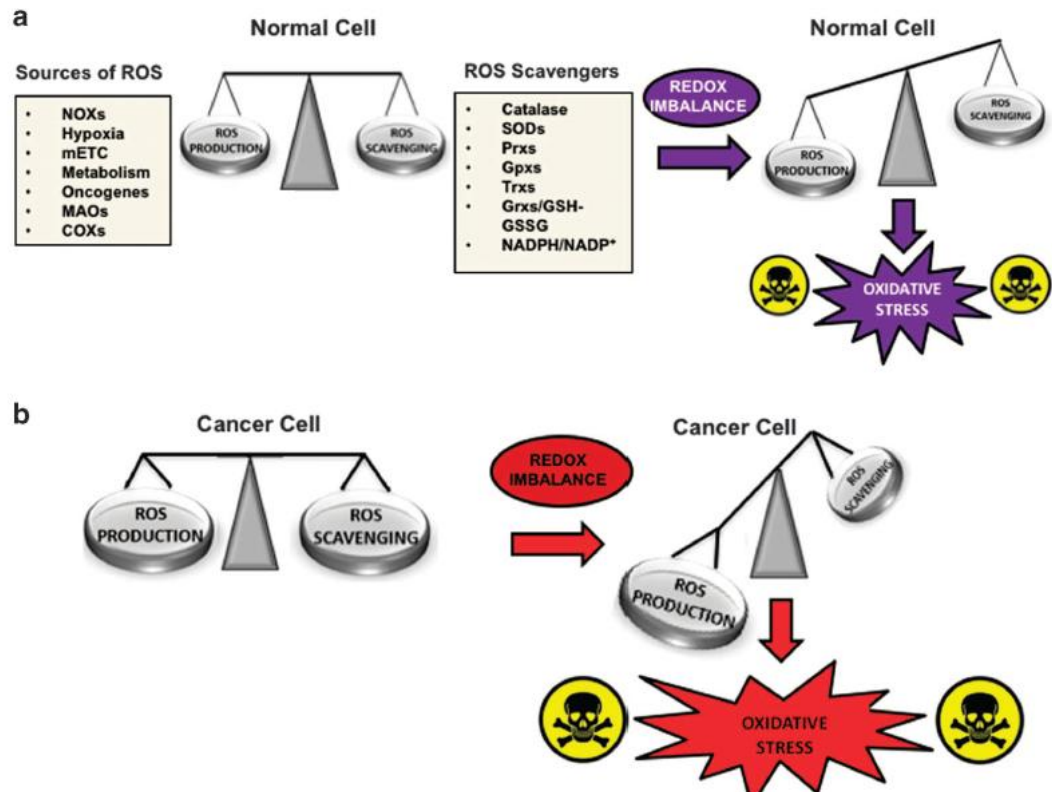


Figure 7 : Sources et piègeurs des ROS ; rôle dans le contrôle de l'homéostasie redox dans les cellules normales et cancéreuses. (Selon Panieri et Santoro, 2016)

III. La carcinogénèse :

1. Définition :

Le cancer est un ensemble de maladies hétérogènes qui résultent de transformations malignes des cellules de l'organisme. Durant ces transformations, les cellules acquièrent certaines propriétés biologiques telle que ; l'activation continue des voies de signalisation responsables de la prolifération cellulaire, l'inactivation des gènes suppresseurs des tumeurs, la résistance à la mort cellulaire, la stimulation de l'angiogénèse, la reprogrammation de l'énergie et le métabolisme cellulaire ainsi que l'échappement au système immunitaire. Les transformations malignes sont aussi favorisées par le micro environnement, l'instabilité du génome et l'inflammation (**Fig.8**) (**Hanahan & Weinberg, 2011**).

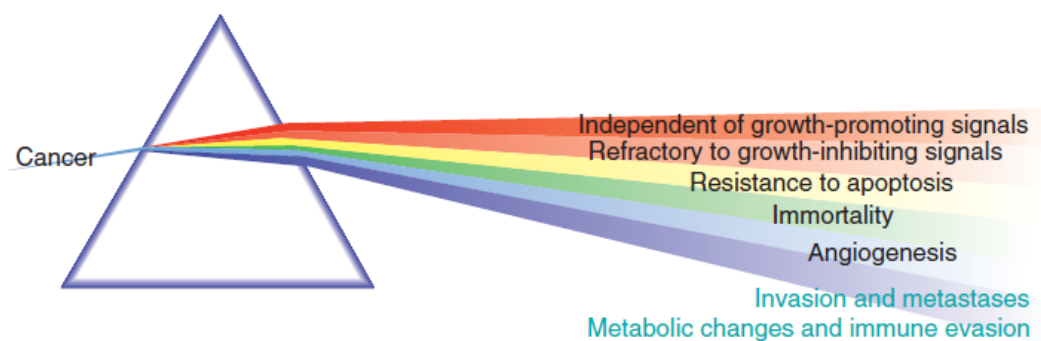


Figure 8: Caractéristiques des cellules tumorales (**Pelengaris and Khan, 2013**).

2. Etiologie :

L'exposition à de nombreux facteurs exogènes ou endogènes (actuellement appelé exposomes) dès la vie embryonnaire peuvent être à l'origine d'une initiation, évolution et progression d'un néoplasie (**Fig.9**) (**Lochhead et al., 2014**). Ces facteurs se résument dans :

- **Le mode de vie** : rassemble tous les habitudes d'un individu telle que :
 - ✓ Le régime alimentaire : les aliments à valeur énergétique élevée riches en sucres et en lipides, ainsi qu'un faible apport en antioxydant peut constituer un facteur de risque (**Mayne et al., 2016**).

- ✓ L'activité physique : entre 21 et 25 % des cancers du sein et du côlon seraient attribuables à la sédentarité (**Desnoyers et al., 2016**)
- ✓ Les heures de sommeil : le manque de sommeil a été supposé comme un facteur augmentant le risque du cancer de sein (**Blask, 2009**)
- ✓ Les heures de travail : une recherche récente suggère que de longues heures de travail augmentent le risque de développer un cancer du sien (**Heikkila et al., 2016**).

D'autres facteurs comme la consommation du tabac, d'alcool, l'exposition au rayon solaire, aux radiations (**Trinh et al., 2015**) et aux produits chimiques (tels que les formaldéhydes, le toluène, le Diaminobenzidine classé par *GSH classification* comme carcinogénicité-catégorie 1A, 1B) (**Garnier et al., 2011; National Center for Biotechnology Information, 2016**).

- **Les infections microbiennes** : plusieurs virus et bactéries peuvent être à l'origine d'un cancer du sein par exemple l'EBV (Epstein–Barr virus) (**Ballard, 2015**) ou le BLV (Bovine Leukemia Virus) (**Buehring et al., 2015**).

3. Les mécanismes génétiques de la progression tumorale :

La transformation tumorale résulte de nombreux altérations génétiques (mutation, translocation, duplication...) et épigénétiques (hyper ou hypo méthylation et/ou acétylation) qui entraîne la dérégulation des gènes responsables de l'homéostasie cellulaire (**Huarte, 2015**).

1- Altérations génétiques des oncogènes et des gènes suppresseurs des tumeurs : des mutations activatrices affectent les proto-oncogènes dominants (gènes régulant la croissance et la différenciation cellulaires) les transforment en oncogène et l'inactivation des gènes suppresseurs des tumeurs (ou anti-oncogènes), régulant négative du cycle cellulaire et activateur de l'apoptose (**Jeggo, Pearl et Carr, 2015**) (**Tab.1**).

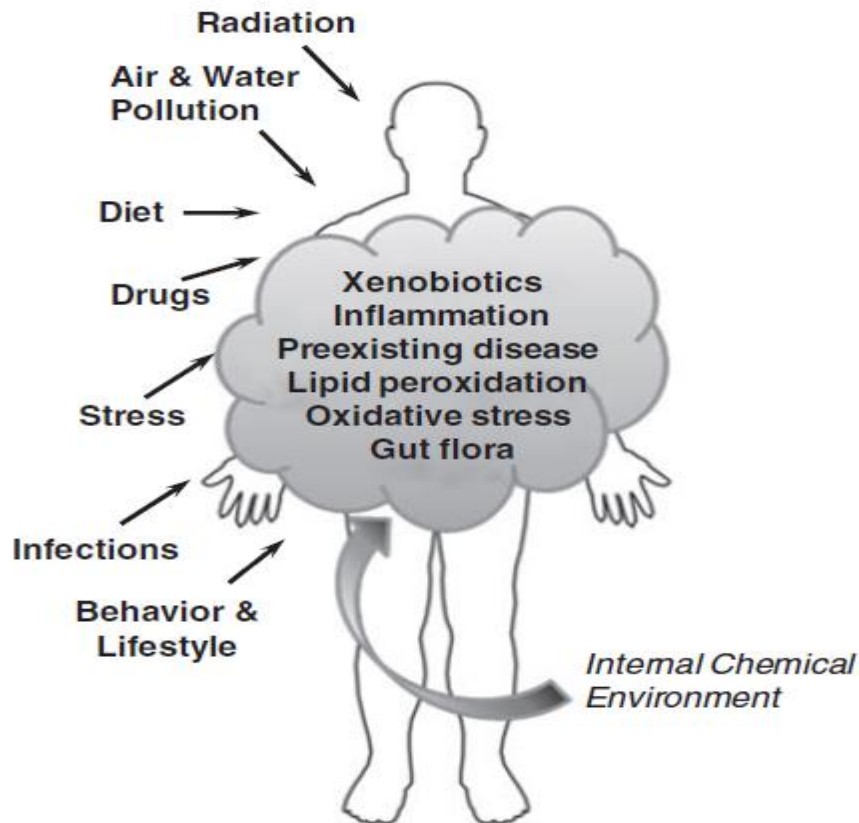


Figure 9 : Facteurs endogènes et exogènes favorisant le développement tumoral
(Selon **Rappaport, 2010**).

2- *Altérations épigénétiques* : le développement tumoral résulte également de certaines altérations épigénétiques, dont les gènes responsables sont divisés en ‘*epigenetic modifiers, mediators and modulators*’ (**Tab.1**).

a. *Epigenetic modifiers* : ce sont des gènes dont leurs produits modifient l’épigénome à travers la méthylation de l’ADN, la modification post-traductionnelle ou l’altération de la structure de la chromatine (**Plass et al., 2013; Suva et al., 2013 ; Feinberg et al., 2016**).

b. *Epigenetic mediators* : appelé gènes pro-géniteurs des tumeurs (tumor progenitor genes) ce sont des gènes impliqués dans la reprogrammation cellulaire et leurs produits sont souvent des cibles pour les *Epigenetic modifiers* (**Brock et al., 2015; Feinberg et al., 2016**).

c. *Epigenetic modulators* : ce terme est introduit pour décrire les facteurs influençant l’activité des *epigenetic modifiers*. Ils servent à transmettre des signaux provenant de l’environnement ; lésions, inflammation, vieillissement et d’autres facteurs de stress

cellulaires vers les gènes *modifieurs* qui vont à leurs tours altérer la structure de la chromatine au niveau des oncogènes et des suppresseurs des tumeurs (**Feinberg et al., 2006; Feinberg et al., 2016**).

4. Les étapes de la cancérogenèse:

L'oncogenèse, tumorigenèse ou carcinogenèse est un phénomène qui se déroule en plusieurs étapes ; initiation, progression, invasion et métastase (**Pelengaris and Khan, 2013**).

Dans la phase d'initiation, la cellule devient immortelle et indépendante aux signaux mitogènes suite à une désactivation des gènes suppresseurs des tumeurs.

La phase de promotion, durant laquelle la cellule présente une dérégulation du cycle cellulaire et une altération des mécanismes de réparation de l'ADN. Ces altérations résultent des mutations affectant des gènes régulateurs du cycle cellulaire (**Jeggo et al., 2015**).

Les cellules transformées vont se multiplier de manière autonome et former des lésions précancéreuses par expansion clonale. Juste après l'étape de progression dans laquelle les lésions précancéreuses s'évaluent en tumeur dite primaire '*in situ*' parce que les cellules tumorales se multiplient et évoluent d'une manière anormale (phénotypiquement et génétiquement) et incontrôlable (**Khan et al., 2015**).

Une tumeur de 1 mm déclenche obligatoirement des mécanismes de néoangiogenèse afin d'assurer une irrigation sanguine et assurer un apport de nutriments et d'oxygène à toute les cellules tumorales (**Melillo, 2014**).

La malignité de haut grade se manifeste au dernier stade, avec l'invasion métastatique qui est le résultat d'un processus complexe. Les cellules de la tumeur primaire acquièrent la capacité d'envahir les tissus adjacents (*cancer invasif*), d'entrer dans les vaisseaux sanguins (voie hématogène) et/ou lymphatique (voie lymphogène), migrer vers des sites distants du corps et former de nouvelles colonies tumorales appelées métastases (**Mendelsohn et al., 2015**).

Tableau 1 : Systèmes de classification des gènes impliqués dans cancer. (Selon Feinberg et al., 2016).

Class	Definition	Examples
<i>Genetic classification</i>		
Oncogene	A gene whose activation by mutation is advantageous to the cancer cell. Acts as dominant	<i>MYC, KRAS, PIK3CA, ABL1, BRAF</i>
Tumour suppressor gene	A gene whose inactivation by mutation is advantageous to the cancer cell. Generally acts as recessive	<i>RB1, TP53, WT1, NF1, NF2, VHL, APC, CDKN2A</i>
<i>Selection classification</i>		
Driver gene	A gene whose mutation or aberrant expression is subject to selection during tumorigenesis	<i>MYC, KRAS, PIK3CA, ABL1, RB1, TP53, WT1</i>
Passenger gene	A gene mutated in cancer that is not a driver	Estimated as 99.9% of all mutational changes in cancer
<i>Epigenetic functional classification</i>		
Epigenetic modulator	A gene, mutated or not, that activates or represses the epigenetic machinery in cancer	<i>IDH1/2, KRAS, APC, TP53, STAT1/3, YAP1, CTCF</i>
Epigenetic modifier	A gene, mutated or not, that modifies DNA methylation or chromatin structure or its interpretation in cancer	<i>SMARCA4, PBRM1, ARID1A, ARID2, ARID1B, DNMT3A, TET2, MLL1/2/3, NSD1/2, SETD2, EZH2, BRD4</i>
Epigenetic mediator	A gene regulated by an epigenetic modifier in cancer (mutations rare or absent) that increases pluripotency or survival	<i>OCT4, NANOG, LIN28, SOX2, KLF4</i>

IV. la glande mammaire

1. Présentation de la glande mammaire :

La glande mammaire est une glande apocrine synthétise et secrète du lait afin de nourrir les nouveaux nées. C'est un organe dynamique qui subit plusieurs changements structurels et fonctionnels associés à la croissance, la reproduction et la régression post-ménopausique. La glande mammaire est l'une des rares organes qui achève la plus grande partie de sa croissance après la naissance (**Pathania et al., 2015 ; Berryhill et al., 2016**).

La femelle du rat de laboratoires a six paires de glandes mammaires numérotées de 1 à 6 dans la direction crânio-caudale. Les glandes thoraciques (**Fig.10: A 1,2 et 3**) sont plus petites par rapport aux glandes abdominales (**Fig.10: A 4 et 5**) et inguinales (**Fig.10: A 6**), mais elles se développent plus tard (**Hvid et al., 2012**).

Chaque glande est formée d'un épithélium mammaire constitué d'alvéoles, tapissés par des cellules épithéliales cuboïdes et entourés de cellules myoépithéliales. Les alvéoles se joignent enfin, pour former les lobules dont chacun possède un canal galactophore drainant vers les ouvertures du mamelon. Les glandes s'enfoncent au sein d'un tissu conjonctif mammaire appelé coussinet adipeux (mammary fat pad) (**Líška et al., 2016 ; Monsefi et al., 2015**).

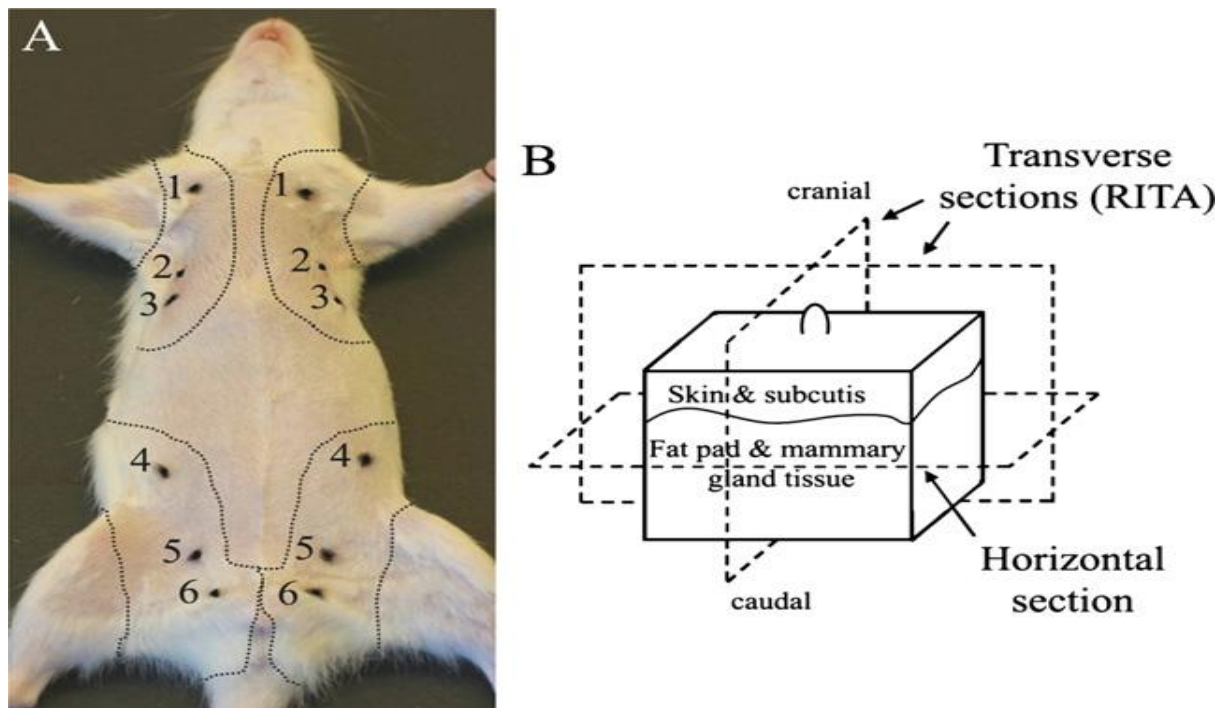


Figure .10: localisation des glandes mammaires chez le rat (selon **Hvid et al., 2011**)

2. La mammogenèse :

L'organogenèse du tissu mammaire débute au cours du développement embryonnaire et se poursuit chez l'animal prépubère et adulte (**Rendl et Atlasi, 2014**). Il est admis que le développement de ces glandes se divise en quatre étapes distinctes :

- Mise en place des crêtes mammaires :

Deux épaissements épidermiques, symétriques, se forment dans la région crânio-ventrale du tronc, autour desquelles s'agrègent des cellules épithéliales formant deux crêtes (ligne de lait bilatéral) à orientation crânio-caudale (**Fig. 11**) (**Rangel et Atlasi, 2016**).

- Mise en place des bourgeons primaires des glandes mammaires :

Cette étape est caractérisée par l'atrophie des crêtes et l'apparition de six paires de placodes (bourgeons primaires) occupant les sites des futurs mamelons (**Rendl et Atlasi, 2014**).

- Position définitive sous-cutanée des glandes mammaires :

À ce niveau, les six paires de glandes mammaires occupent leur position définitive et les mamelons apparaissent à la surface de la peau. Il y en a 12 répartis de part et d'autre de la ligne médiane (**Líška et al., 2016**).

- Mise en place des ramifications du canal galactophore primaire :

L'ébauche du canal galactophore primaire (issu du bourgeon primaire) s'enfonce profondément au sein du mésenchyme jusqu'au futur coussinet adipeux (**Ferrier, 2012**).

De la période post natale jusqu'à la puberté, la croissance des glandes mammaires des rongeurs est lente ; elle est dite isométrique car elle est équivalente à celle du corps.

A l'âge pubertaire, la croissance mammaire est exponentielle (dite allométrique), le coussinet adipeux est rapidement rempli de cellules épithéliales, donnant naissance à de larges structures bulbaires nommées bourgeons terminaux (TEB Terminal End Buds). Ces derniers sont à l'origine des futures canaux galactophores (**Fig. 12**) (**Haschek et al., 2013**).

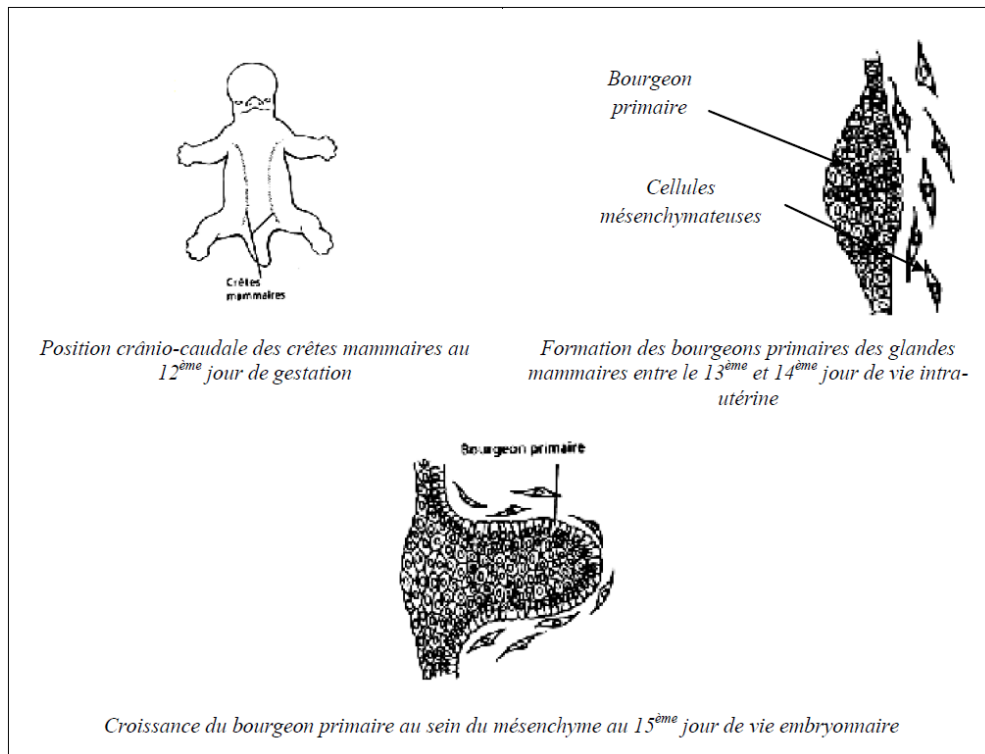


Figure 11: Mise en place des crêtes mammaires et croissance des bourgeons primaires au sein du mésenchyme chez le rat. (selon **Larsen, 2011**)

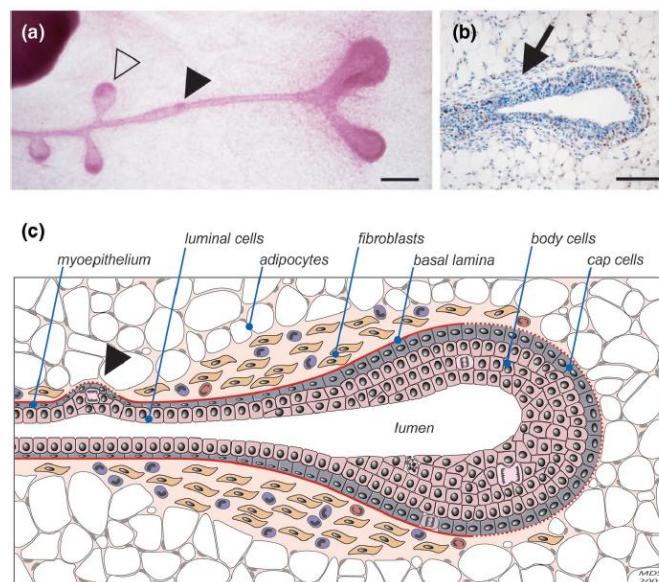


Figure 12: la morphologie des TEB et du canal galactophore. **(a)** Un canal primaire coloré par le carmine coloré par le Carmin (haut à gauche). **(b)** Une immunophotomicrographie d'un TEB **(c)** Un schéma dépeignant les caractéristique architecturales d'un TEB et son canal(Selon **Sternlicht, 2006**)

À partir de la puberté (8 semaines en moyenne), la croissance des glandes mammaires suit le cycle sexuel. Il y a une prolifération des canaux galactophores au moment des étapes de proestrus et d'oestrus et ceux-ci régressent au moment des étapes de metoestrus et de dioestrus du fait d'une régulation hormonale sous le contrôle de l'axe hypothalamus-hypophyse (Osborne et al., 2015 ; Ferrier, 2012).

Durant la grossesse, elle subit une différenciation rapide impliquant principalement le développement du système lobulo-alvéolaire pour se préparer à la lactogénèse (Fig. 13) (Yart et al., 2013).

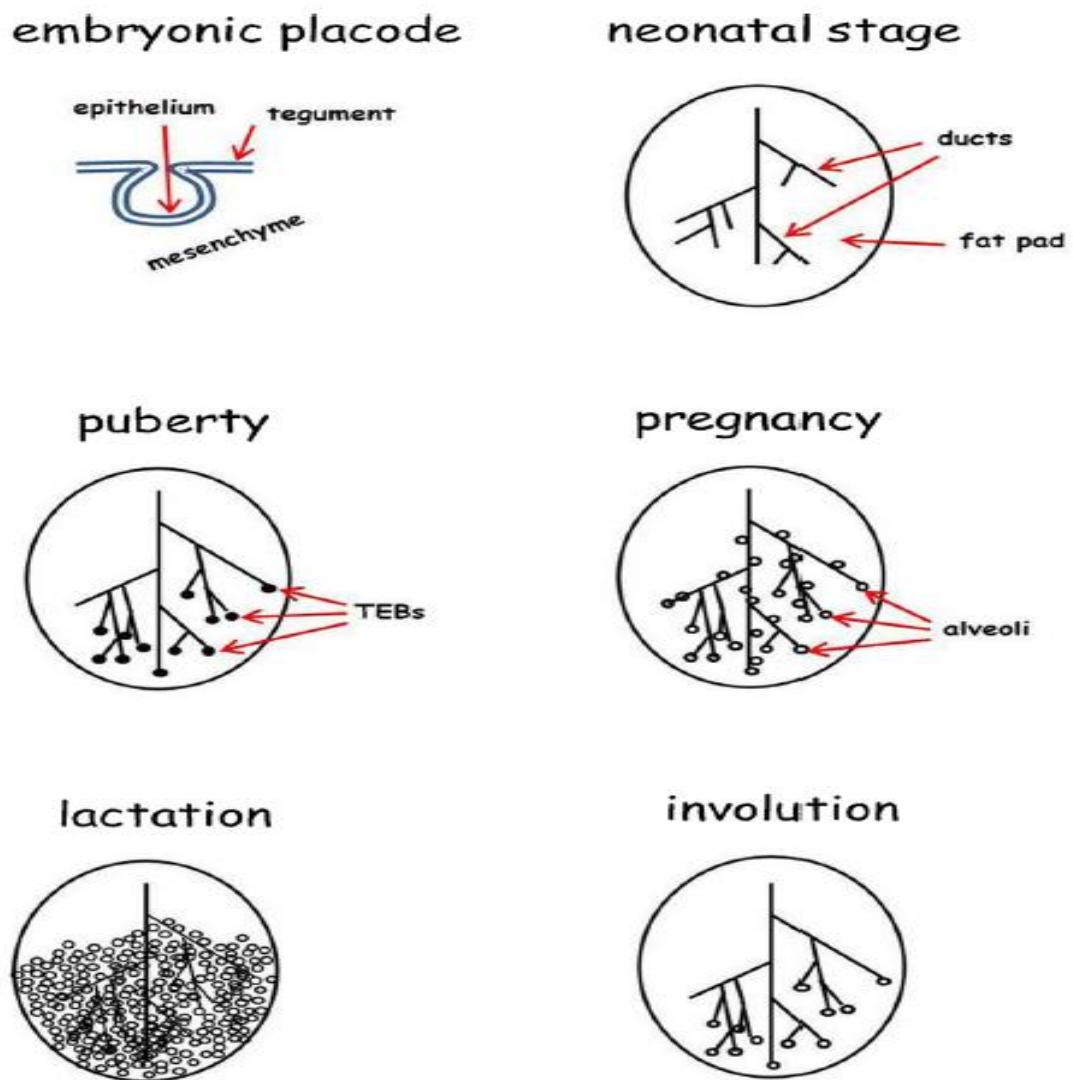


Figure 13: Les différents étapes du développement mammaire. (selon Musumeci et al., 2015)

PARTIE PRATIQUE

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS ET METHODES

1. Matériels biologiques

1.1. Les rats

L'étude est effectuée sur un groupe de rats femelles *Wistar albinos* provenant de l'animalerie de la faculté des sciences de la nature et de la vie, université des Frères Mentouri- Constantine, âgées de 3 à 4 semaines. L'élevage a été réalisé dans des cages en plastiques à une température ambiante et un régime alimentaire standard.

1.2. Abeilles

L'acupuncture est réalisé avec des abeilles *Apis mellifera* connu également sous le nom d'abeille européenne, abeille mellifère, ou encore abeille ou mouche à miel.

a. Position systématique :

- ✓ **Ordre :** Hymenoptera (hyménoptère)
- ✓ **Sous-ordre :** Apocrita (apocrites)
- ✓ **Intra-ordre :** Terebrantes.
- ✓ **Super-famille :** Apoidea.
- ✓ **Famille :** Apidae.
- ✓ **Sous-famille :** Apinea.
- ✓ **Genre :** Apis
- ✓ **Espèce :** Mellifera.

2. Traitement

Les rattes sont divisées en 4 lots et traitées comme suit :

- 1^{er}lot (T): un lot contrôle qui reçoit quotidiennement une injection de BPS
- 2^{ème}lot (V): traité, un jour sur deux, par une piqure cutanée
- 3^{ème}lot (C) : traité par le carcinogène N- Nitroso methyl urée une fois par semaine pendant 30jrs.
- 4^{ème}lot (C+V) : traité par le carcinogène et le venin. Le carcinogène est administré en premier pendant 30 jours à raison d'une injection par semaine (même protocole que le lot C). Le venin est ensuite appliqué, 24 heures après la dernière injection du carcinogène, par acupuncture a raison d'une piqure un jour sur deux.

La durée de traitement pour tous les lots est de 90 jours.

3. Prélèvement et dissection :

Un prélèvement sanguin est réalisé, au niveau du sinus caverneux, après 21, 44, 67, 90 jours du traitement et les sérums sont conservés à -20°C.

Les animaux sont disséqués à la fin de l'expérimentation. Une étude macroscopique a été réalisée sur les glandes mammaires et le foie.

Le foie a été congelé afin de doser les paramètres du stress oxydant.

4. Analyse quantitative et qualitative des protéines sériques:

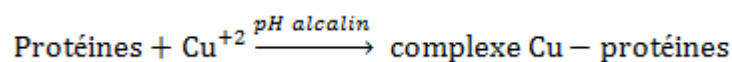
4.1. Electrophorèse des protéines sériques:

La séparation électrophorétique des protéines a été réalisée à l'aide de l'appareil Helena V8 et selon les indications du kit « V8 serum Protein 6-Band Zoom », qui utilise un tampon alcalin pour séparer les protéines sériques en 6 fractions principales (albumine, alpha1 globuline, alpha 2 globuline, beta 1 globulin, beta 2 globuline et gammaglobuline). Chaque fraction, à l'exception de l'albumine, contient au moins 2 composants. La proportion relative de ces différentes fractions peut aider à établir un diagnostic et un pronostic pour certaines pathologies.

4.2. Dosage des protéines totales :

Le dosage des protéines totales est réalisé sur l'auto-analyseur COBAS INTEGRA 700 et selon les indications de la cassette COBAS INTEGRA Total Protein Gen.2 (TP2). Le principe de la méthode est le suivant :

Les ions cuivriques réagissent en solution alcaline avec les liaisons peptidiques des protéines et forment un complexe de couleur pourpre.



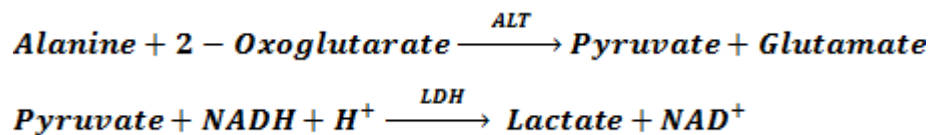
L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration des protéines. Elle est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 552nm.

5. Effet de différents traitements sur les lésions hépatiques

5.1. Dosage de l'activité de l'alanine-amino transférase (ALT/ TGP)

5.1.1. Principe :

L'alanine-aminotransférase (ALT ou TGP) est une enzyme qui catalyse le transfert du groupement amine de l'alanine au 2-oxoglutarate, en formant le pyruvate et le glutamate. La concentration catalytique est déterminée en utilisant la réaction couplée de la lactate-déshydrogénase (LDH), à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesuré à 340 nm.



5.1.2. Mode opératoire :

L'activité enzymatique de TGP a été mesurée en utilisant le kit BioSystems ALANINE AMINOTRANSFERASE. Le mélange réactionnel est formé de deux réactifs le premier est une solution de Tris (150 mmol/L), L-alanine (750 mmol/L) et lactate-déshydrogénase (> 1350 U/L). Le deuxième est formé de NADH (1,9 mmol/L), 2-oxoglutarate (75 mmol/L), Hydroxyde de sodium (148 mmol/L) et sodium azide (9,5 g/L).

La méthode de dosage consiste à mélanger dans la cuve du spectrophotomètre 1 ml du mélange réactionnel avec 50 µl du sérum.

La lecture des absorbances est effectuée chaque minute pendant 3 min à une longueur d'onde 340 nm.

L'activité enzymatique du TGP de l'échantillon est calculée selon la formule suivante:

$$\Delta A / \text{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times I \times VS} = U/L$$

ϵ : le coefficient d'extinction moléculaire du NaDH à 340 nm est égale 6300.

I : le trajet optique égale à 1cm.

Vt : le volume réactionnel total est 1,05 à 37°C.

Vs : le volume d'échantillon de 0,05 à 37°C.

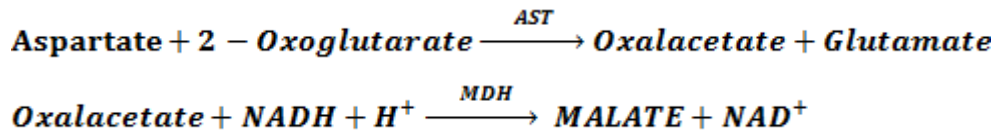
$\Delta A / \text{min}$: L'accroissement moyen est calculé suite a cette formule:

$$\Delta A / \text{min} = \Delta D_0 \times 3333 = U/L$$

5.2. Dosage de l'activité de l'aspartate-aminotransférase (AST/ TGO)

5.2.1. Principe :

L'alanine-aminotransférase (AST ou TGO) est une enzyme qui catalyse le transfert du groupement amino de l'aspartate au 2-oxoglutarate, en formant l'oxaloacétate et le glutamate. La concentration catalytique est déterminée, en utilisant la réaction couplée de la malate-déshydrogénase (MDH), à partir de la vitesse de disparition du NADH, mesuré à 340 nm



5.2.2. Mode opératoire :

L'activité enzymatique de TGO a été mesurée en utilisant le kit BioSystems ASPARTATE AMINOTRANSFERASE. Le mélange réactionnel est formé de deux réactifs, une solution de Tris (121 mmol/L), L-aspartate (362 mmol/L), malate-déshydrogénase (> 460 U/L) et lactate-déshydrogénase (> 660 U/L) et une solution formé de NADH (1,9 mmol/L), 2-oxoglutarate (75 mmol/L), Hydroxyde de sodium (148 mmol/L) et sodium azide (9,5 g/L).

Le dosage s'effectue dans une cuve du spectrophotomètre, en mélangeant 1 ml du mélange réactionnel avec 50 µl du sérum.

La lecture des absorbances est effectuée chaque minute pendant 3 min à une longueur d'onde 340 nm.

L'activité de l'enzyme est calculée selon la formule:

$$\Delta A / \text{min} \times \frac{Vt \times 10^6}{\epsilon \times I \times VS} = U/L$$

ϵ : le coefficient d'extinction moléculaire du NaDH à 340 nm est égale 6300.

I : le trajet optique égale à 1cm.

Vt : le volume réactionnel total est 1,05 à 37°C.

Vs : le volume d'échantillon de 0,05 à 37°C.

$\Delta A/\text{min}$: L'accroissement moyen est calculé selon la formule:

$$\Delta A/\text{min} = \Delta D_o \times 3333 = U/L$$

6. Dosage de l'activité de lactate-déshydrogénase sérique :

6.1. Principe :

La Lactate-déshydrogénase (LDH) catalyse la transformation du L-lactate en pyruvate. Le NAD est réduit en NADH. La vitesse initiale de formation du NADH est directement proportionnelle à l'activité catalytique du LDH. Elle est déterminée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm. Le dosage est réalisé selon l'indication du kit COBAS INTEGRA 700 Lactate-déshydrogénase selon l'IFCC version 2 Tube primaire.

7. Dosage du monoxyde d'azote :

7.1. Principe :

Le dosage du NO est réalisé selon la méthode de Griess. La technique repose sur la conversion, dans un milieu acide et en présence du nitrite, de l'acide sulfanilique en sels de diazonium. Ce dernier sera couplé au N-(1-naphtyl) éthylènediamine pour révéler un chromogène rose mesurable à 548 nm (Classen et al., 2009).

7.2. Mode opératoire :

Le dosage du taux de NO a été réalisé sur deux étapes. D'abord, la préparation du réactif de dosage où 0.735 ml d'acide orthophosphorique est dilué dans 24.3ml d'eau distillé. Puis, 0.25g de sulfamide est ajouté. Après 10 min d'agitation 0.025 g de naphtyl éthylène est ajouté (le mélange réactionnel doit être protégé de la lumière).

La méthode du dosage consiste à mélanger 1 ml du sérum (facteur de dilution 1/10) avec 1 ml de réactif.

La lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde 548 nm.

Le taux du NO est calculé selon l'équation d'une courbe d'étalonnage du NO. Cette courbe est réalisée partir d'une solution standard de NaNO_2 (1mM) (Fig. 14).

$$Y = 0,0016X + 0,0122 \text{ et } R^2 = 0,9723$$

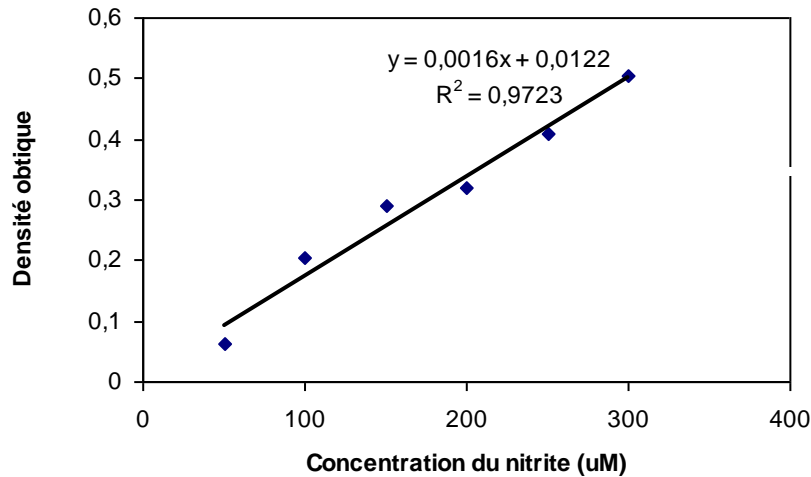


Figure 14: Gamme d'étalonnage NO réalisée par le NaNO_2 .

8. Effet du traitement sur l'activité de la catalase :

8.1. Préparation de l'homogénat :

0.5 gramme de foie sont homogénéisés à l'aide d'un Ultra-turrax dans 4 ml de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4). Après centrifugation à (9000 tours/min, 4°C, 15 min), le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs et conservés à -20°C en attendant d'effectuer les dosages des paramètres du stress oxydatif.

8.2. Dosage du catalase :

8.2.1. Principe :

L'activité du catalase est mesurée à l'aide de la méthode spectrophotométrique **d'Aebi (1984)**. L'activité est déterminée par la mesure de la diminution de l'absorbance à 240nm dans mélange réactionnel contenant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), tampon phosphate et un volume requis d'homogénat. Le coefficient d'extinction molaire $0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ est utilisé pour déterminer l'activité de la catalase. L'activité spécifique est calculée et exprimée en $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2 / \text{min} / \text{mg}$ des protéines totaux.

8.2.2. Mode opératoire :

Afin de doser de l'activité enzymatique, 780 μl de tampon phosphate (100Mm, pH 7.5) est mélangé avec 200 μl de H_2O_2 (500Mm) dans une cuve en quartz, plus 20 μl de surnageant est ajouté.

La lecture des absorbances est effectuée chaque 15 s pendant 75 s à une longueur d'onde 240 nm.

L'activité de catalase est calculée selon l'équation suivante :

$$\Delta DO = \frac{(DO_{15s} - DO_{30s}) + (DO_{30s} - DO_{45s}) + (DO_{45s} - DO_{60s}) + (DO_{60s} - DO_{75s})}{4}$$

8.3. Dosage des Protéines totales du foie :

8.3.1. Principe :

Les protéines hépatiques sont quantifiées selon la méthode de **Bradford (1976)** qui utilise le bleu de Coomassie G 250 (BBC pour *Bradford Coomassie Brilliant*) comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines ($-NH_2$) des protéines pour former un complexe de couleur bleu. (L'apparition de la couleur bleue reflète le degré d'ionisation du milieu acide et l'intensité correspond à la concentration des protéines). L'absorbance est dosée par spectrophotométrie à 595 nm.

8.3.2. Mode opératoire :

Pour préparer le réactif de Bradford, 20 mg de BBC (poudre) est dissous dans 10 ml d'éthanol (95%). Après 2 heures d'agitation, 20 ml d'acide orthophosphorique est ajouté. Une quantité suffisante d'eau distillée pour 100 ml est rajoutée.

La démarche du dosage consiste à mélanger 0.1 ml de surnageant (dilué 1/4) avec 4 ml du réactif. 5 min sont nécessaires pour la stabilisation de la couleur.

La lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde 595 nm.

Le taux des protéines hépatiques est déterminé par comparaison à une gamme d'étalon d'albumine sérique bovine (BSA pour *Bovin Serum Albumin*) 1mg/ml préalablement réalisée dans les mêmes conditions (voir **Fig. 15**).

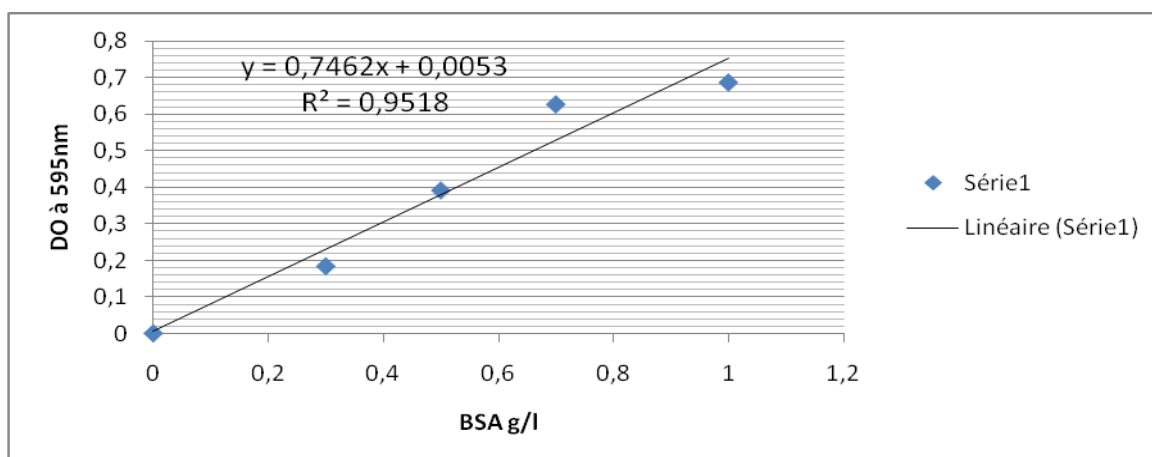


Figure 15: La courbe de la gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

9. Analyse statistique :

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel « Graph Pad Prism software ». Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne et l'écart type des différents échantillons biologiques.

La comparaison de moyennes a été réalisée avec le test « t » de Student dont le seuil de signification est $p \leq 0,05$.

RESULTATS

II. Resultats

1. Etude macroscopique des effets des traitements:

Les rattes montrent des changements morphologiques et comportementales après injection du carcinogène. On a remarqué une fatigue avec une chute de poiles après la deuxième injection du carcinogène.

Après 53 jours de traitement nous avons noté la présence de tumeurs palpables chez les rattes. 10 jours après, on a réalisé la première dissection d'une ratte où on a prélevé 3 tumeurs :

- Deux grandes tumeurs dures prélevées de la zone caudale. Elles sont bien encapsulées et vascularisées, de couleur foncé et d'une taille supérieure à 2 cm pour chacune.
- Une tumeur dure d'une taille égale à 1cm prélevée de la zone thoracique à gauche, d'une couleur blanchâtre, bien encapsulé.

Les animaux traités avec le carcinogène n'ont pas survie plus de 67 jours et 83.33% des rattes du lot C ont développé des tumeurs palpables de taille supérieures à 1 cm. Les tumeurs ont été prélevées de différentes localisations (**Fig.16**).

On a disséqué aussi 2 rattes du lot T, lot V et lot C+V pour faire une comparaison macro et microscopique.

Nous avons observé, chez les lots V et C+V pendant les premiers 21 jours de traitement, la présence d'une postule dans le acupoint de piqueur (**Fig. 17**) et des diarrhées.

A 90 jours de la dernière injection du carcinogène, le traitement est arrêté et toutes les rattes ont été disséqué.

L'étude macroscopique n'a réveillé la présence d'aucune masse tumorale dans le lot C+V. Sauf pour une ratte où on a remarqué la présence d'une petite tache d'une couleur brune de 0.2cm de taille sur la glande mammaire inguinale gauche.

On a remarqué l'existence des lésions dans les canaux galactophore pour les lots V et C+V. On a remarqué aussi que le sang de ces deux lots V et C+V est très liquide avec une coagulation trop lente.

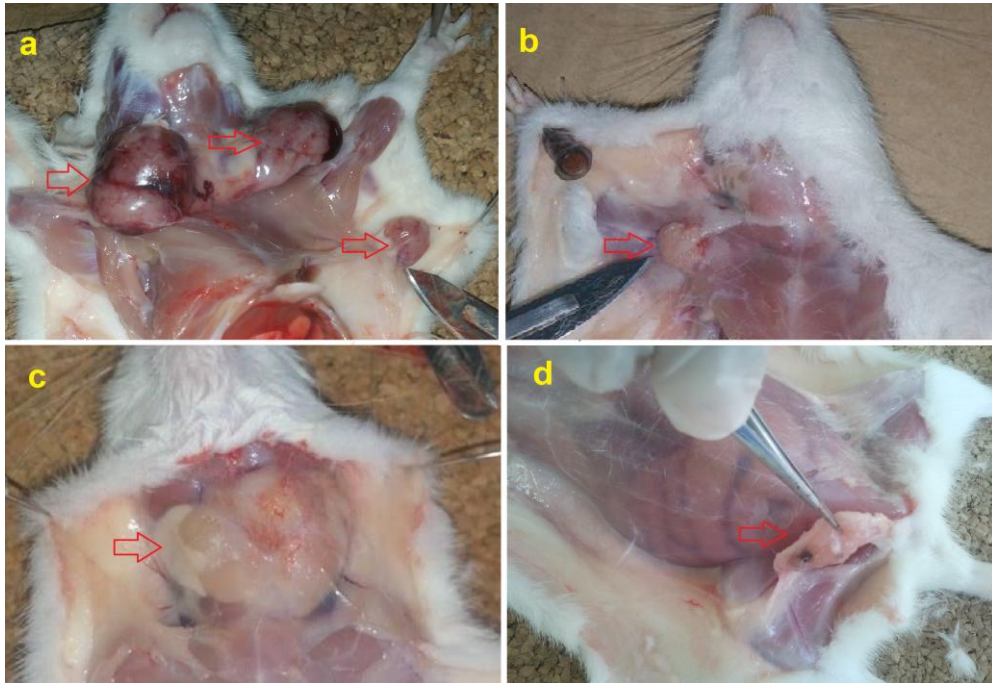


Figure 16: Les différentes tumeurs avec les différentes localisations. **a.** deux tumeurs mammaires caudales et une tumeur mammaire thoracique. **b.** une tumeur mammaire thoracique. **c.** une tumeur mammaire caudale. **d.** une tumeur mammaire inguinale.

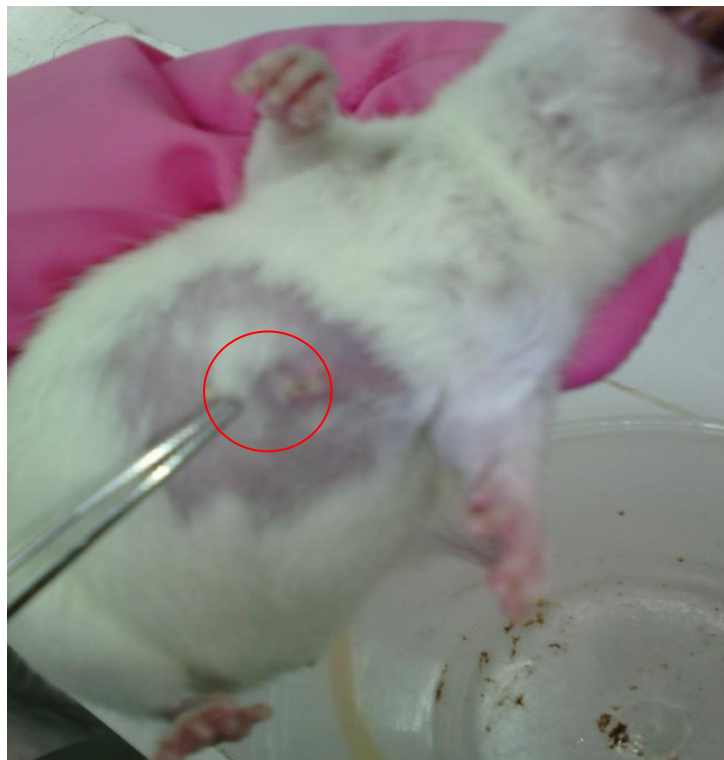


Figure 17: Postule former dans le lieu de piquer

2. Effet des différents traitements sur le poids des animaux

Les résultats (**Fig.18**) montrent que les différents traitements entraînent des diminutions significatives des poids des animaux uniquement les premiers 15 jours après cette période les poids deviennent comparatifs à ceux des contrôles.

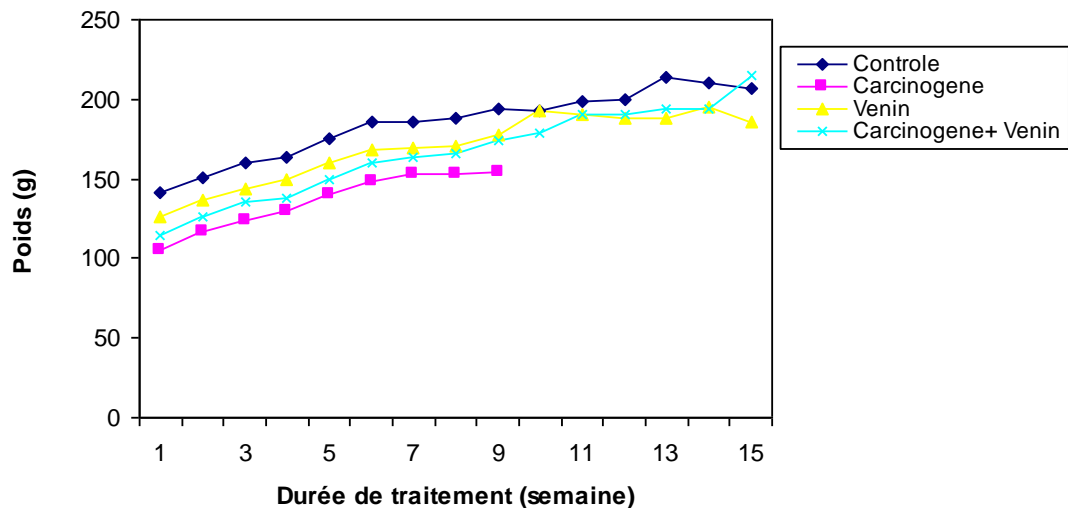


Figure 18: Effet des différents traitements sur l'évolution du poids des ratte (n=5)

3. Effet de différents traitements sur les lésions hépatiques

3.1. Effet du traitement sur l'activité de l'enzyme TGP

Les résultats (**Fig.19**) indiquent que le traitement des ratte avec le carcinogène n'a aucun effet sur l'activité enzymatique du TGP à 21 et 44 jours comparativement au contrôle. A 67 jours l'activité enzymatique augmente de manière hautement significative ($p < 0,001$) comparativement au contrôle.

Le traitement des ratte avec le venin d'abeille entraîne une diminution de l'activité enzymatique après 21 et 44 ($p < 0,05$) jours de traitement, comparativement au contrôle. Une augmentation de l'activité enzymatique est observée, par contre, après 67 ($p < 0,01$) et 90 ($p < 0,001$) jours du traitement. Il est également, important de signaler que l'activité du TGP augmente avec la durée de traitement.

Le traitement combiné carcinogène + venin entraîne une inhibition de l'activité du TGP après 21 ($p < 0,05$) jours. L'activité enzymatique du TGP augmente progressivement jusqu'à 90 jours où on note une augmentation très hautement significativement ($p < 0,001$).

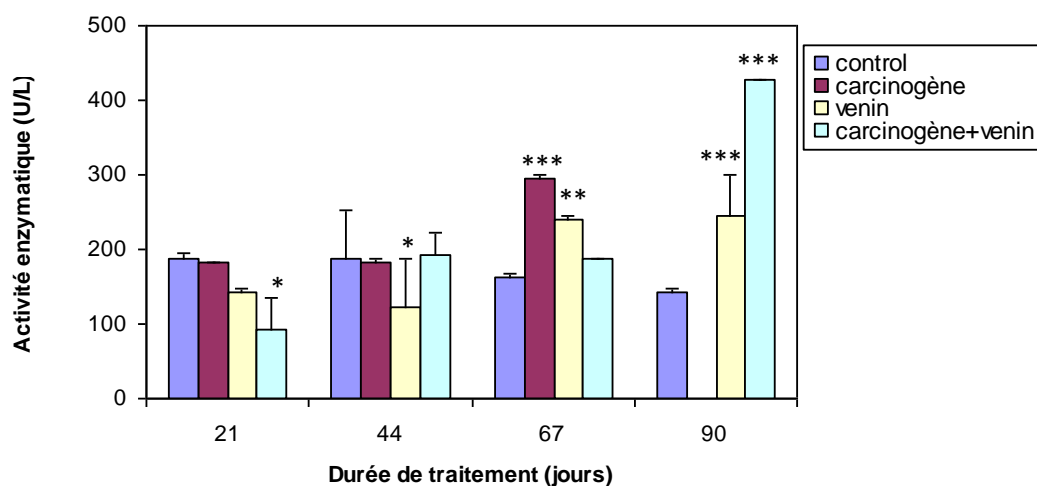


Figure 19: Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique du TGP (n=3, * significatif $p<0,05$, ** tres significatif $p<0,01$, *** hautement significatif $p<0,001$)

3.2. Effet du traitement sur l'activité de l'enzyme TGO

La **figure 20** montre l'effet des différents traitements sur l'activité du TGO. Les résultats signalent que le traitement des rattes avec le venin d'abeille entraine une diminution de l'activité enzymatique après 21 ($p<0,001$), 67 et 90 ($p<0,001$) jours de traitement, comparativement au contrôle. Néanmoins une augmentation de l'activité enzymatique est observée après 44 jours.

Le traitement des rattes avec le carcinogène entraine une diminution non significative de l'activité enzymatique du TGO a 21,44 et 67 jours comparativement au contrôle.

La combinaison carcinogène + venin diminue l'activité du TGO après 21 ($p<0,001$), 44 ($p<0,001$), 67 ($p<0,001$) et 90 ($p<0,001$) jours, comparativement au contrôle.

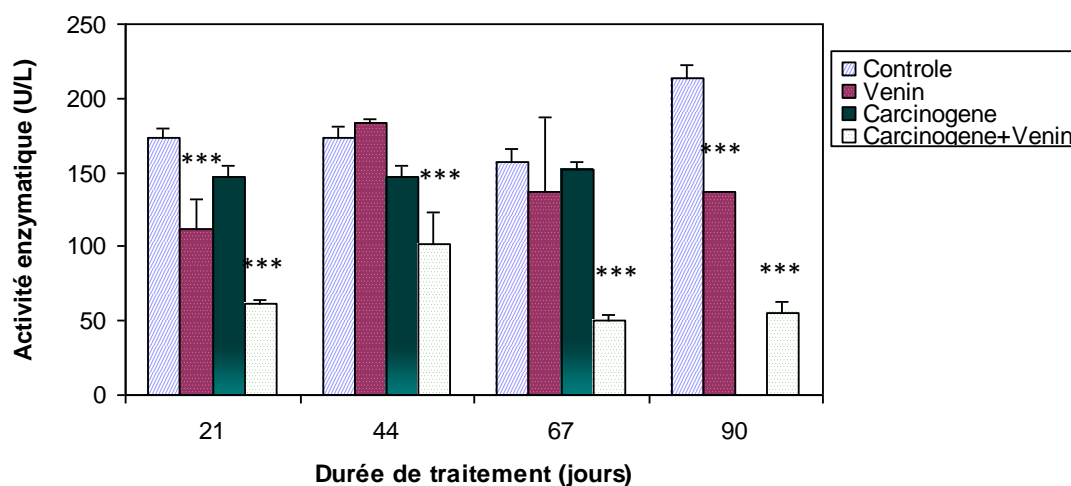


Figure 20 : Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique du TGO (n=3, *** hautement significatif $p < 0,001$)

4. Effet du traitement sur l'activité du LDH

Les résultats (**Fig.21**) montrent que le traitement des ratte avec le venin d'abeille entraine une diminution de l'activité enzymatique après 21 ($p < 0,05$), 44 et 67 jours de traitement, comparativement au contrôle. Une augmentation de l'activité enzymatique est observée, par contre, après 90 ($p < 0,01$) jours. Il est également, important de signaler que l'activité du LDH augmente avec la durée de traitement.

Le traitement des ratte avec le carcinogène entraine une diminution de l'activité enzymatique du LDH a 21 ($p < 0,001$) et 67 ($p < 0,001$) jours. A 44 jours l'activité de l'enzyme augmente de manière hautement significative ($p < 0,001$) comparativement au contrôle.

Le traitement combiné carcinogène + venin diminue l'activité du LDH après 21 ($p < 0,001$), 44 ($p < 0,001$) et 67 ($p < 0,01$) jours, comparativement au contrôle. Néanmoins une augmentation de l'activité enzymatique est notée après 90 ($p < 0,01$) jours du traitement. Il semble également que l'activité de cet enzyme est en augmentation progressive.

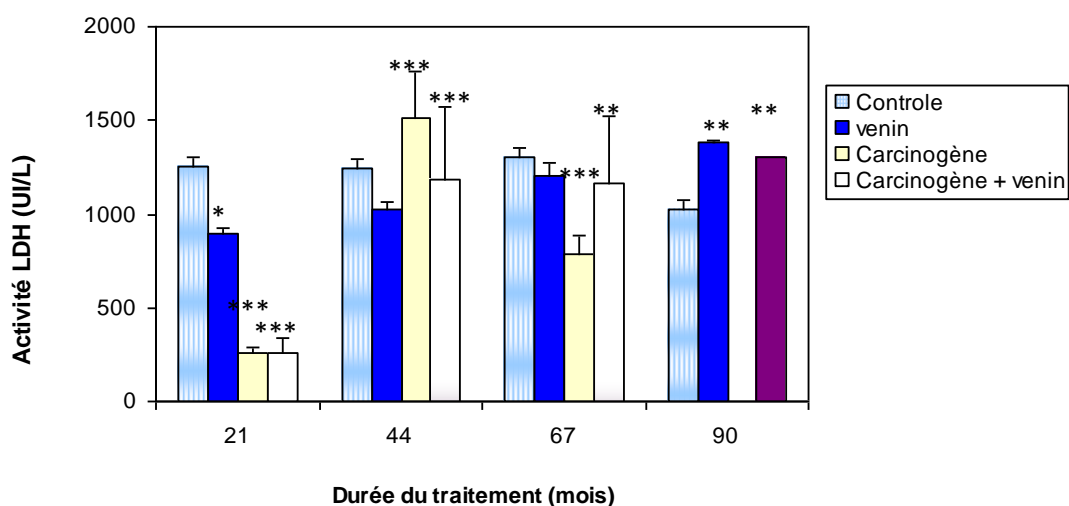


Figure 21: Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique du LDH (n=3, * significatif $p < 0,05$, ** très significatif $p < 0,01$, *** hautement significatif $p < 0,001$)

5. Analyse qualitative et quantitative des protéines sériques :

L'électrophorèse capillaire sépare les composants protéiques du sérum en 6 fractions (**Fig.22**) :

- Albumine
- Alpha 1 globuline (zone α_1)
- Alpha2 globuline (zone α_2)
- Beta 1 globuline (zone β_1)
- Beta 2 globuline (zone β_2)
- Gamma globuline (zone γ).

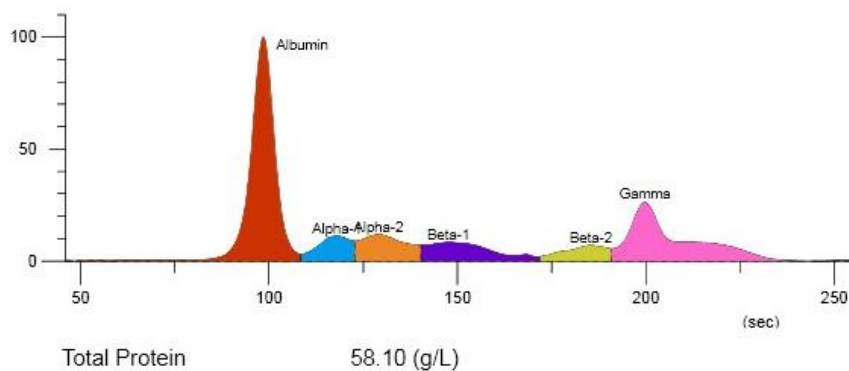


Figure 22 : Electrophérogramme des protéines sériques obtenue par électrophorèse capillaire: exemple d'un de nos échantillon.

5.1. Effet du traitement sur les protéines totales :

La **figure 23** montre l'effet des différents traitements sur le taux des protéines sériques. Les résultats indiquent que le traitement des ratte avec le carcinogène n'a pas d'effet significatif sur la quantité des protéines sériques malgré qu'on a remarqué une baisse non significative des taux des protéines a 44 jours, suivi d'une faible augmentation a 67 jours.

Aussi, le traitement avec le venin d'abeille seule ou combiné avec le carcinogène n'a pas d'effet significatif sur le taux des protéines après 21, 44 et 67 et 90 jours de traitement, comparativement au contrôle.

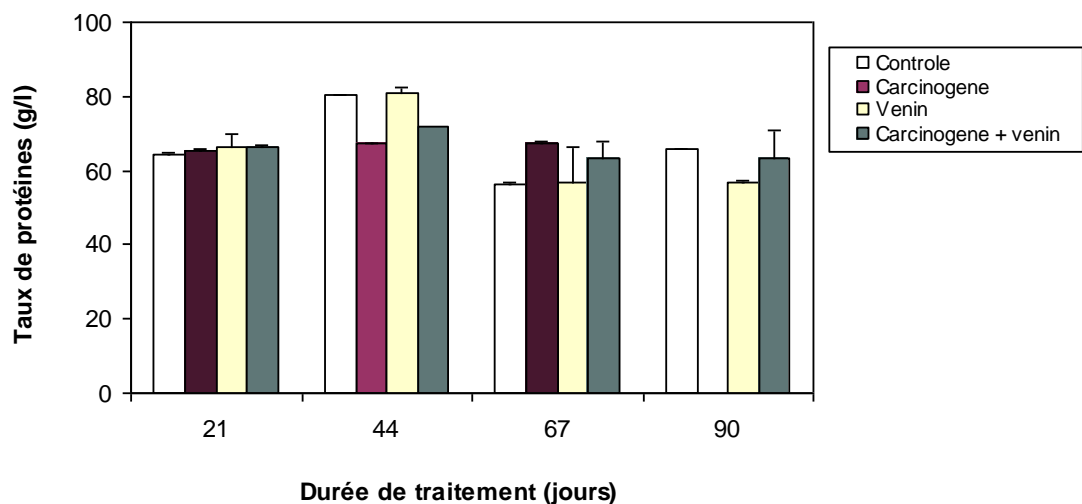


Figure 23 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines totaux sériques (n=3)

5.2. Effet du traitement sur le taux de l'albumine :

Les résultats (**Fig. 24**) indiquent que les différents traitements (carcinogène, venin ou combinaison carcinogène + venin) n'ont pas d'effet significatif sur le taux de l'albumine tout au long de la période du traitement (du 21 jusqu'aux 67 jours).

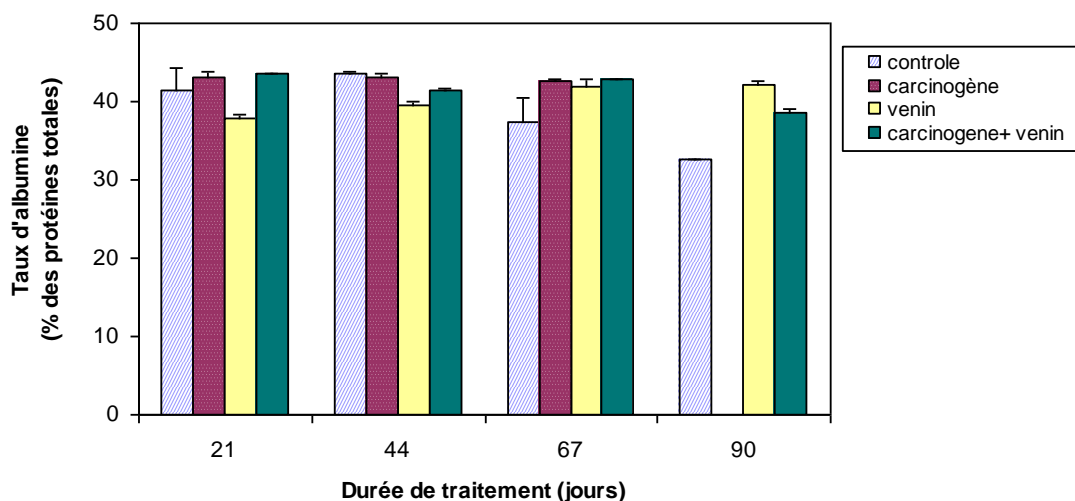


Figure 24 : Effet des différents traitements sur le taux de l'albumine (n=3)

5.3. Effet du traitement sur le taux des protéines alpha 1

Les résultats (**Fig.25**) indiquent que le traitement des rattes avec le carcinogène n'a pas d'effet significatif sur le taux des protéines alpha 1. Cependant, le traitement avec le venin d'abeille seul ou introduit après le carcinogène diminue de manière significative les taux de protéines alpha 1 après 21 (p<0,001).

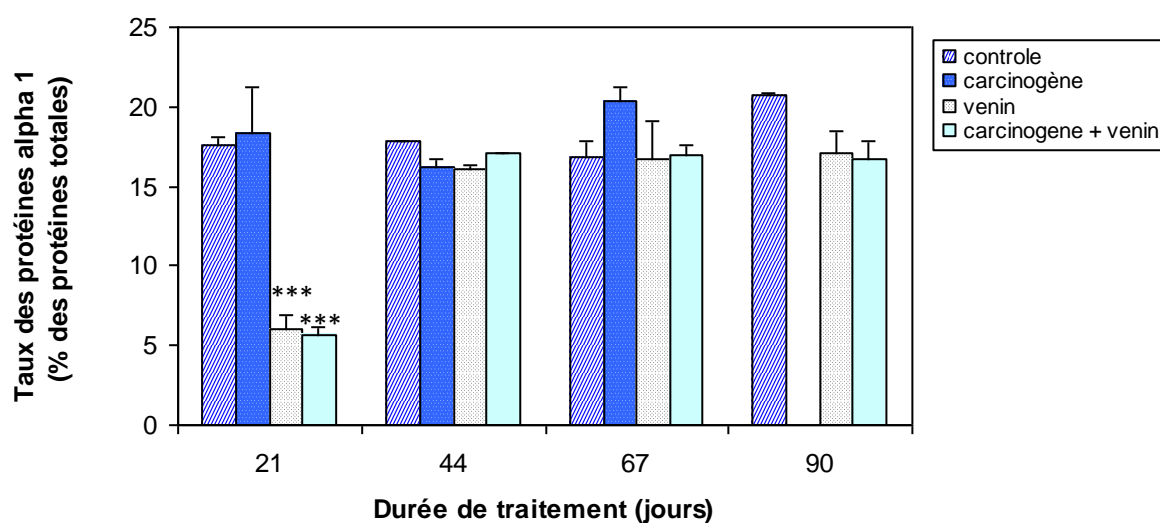


Figure 25 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines alpha 1 (n=3, *** hautement significatif p<0,001)

5.4. Effet du traitement sur le taux des protéines alpha 2 :

Les résultats de la **figure 26** montrent que le carcinogène entraîne des variations non significative. En effet, il augmente le taux des protéines alpha 2 après 21 et 44 jours du traitement et les diminue ensuite, après à 67 jours.

Le traitement des rattes avec le venin d'abeille entraîne une augmentation du taux des protéines alpha 2 après 21 ($p < 0,01$) et 44 ($p < 0,001$) jours. Mais, une diminution est observée après 67 et 90 ($p < 0,01$) jours, comparativement au contrôle. Les taux des protéines alpha 2 sont apparemment en diminution progressive.

Le traitement combiné carcinogène + venin augmente le taux des protéines alpha 2 après 21 et 44 jours d'une manière non significative, Une diminution du taux des protéines alpha 2 est notée après 67 et 90 ($p < 0,001$) jours du traitement. Il semble également que le taux de ces protéines est en diminution progressive.

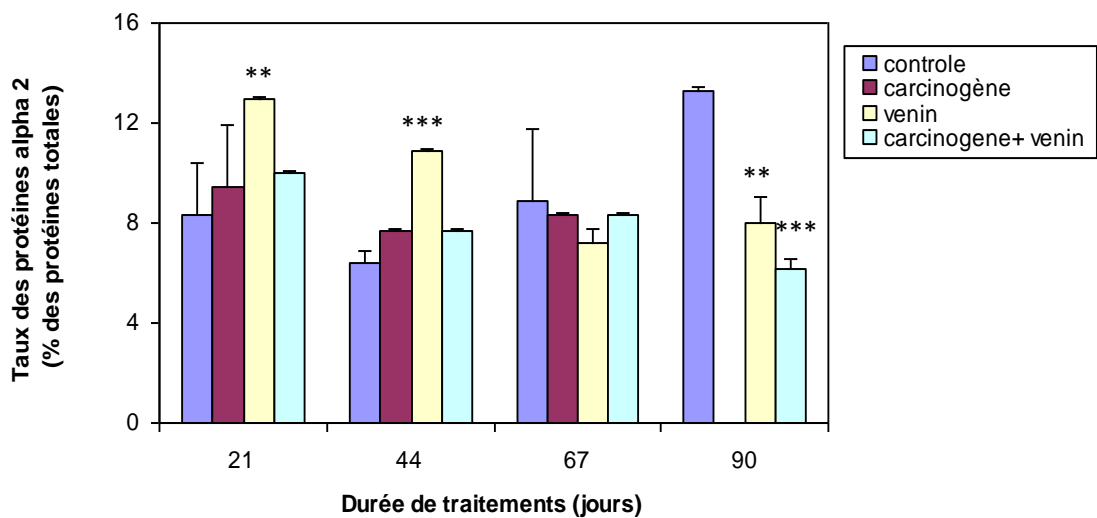


Figure 26 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines alpha 2 (n=3,** très significatif $p < 0,01$, *** hautement significatif $p < 0,001$)

5.5. Effet du traitement sur le taux des protéines beta 1 :

La **figure 27** indique que l'effet des différents traitements sur les taux des protéines beta 1 ne se manifeste qu'au début du traitement. En effet, les 3 traitements ; carcinogène,

venin et carcinogène + venin augmentent de manière hautement significative ($p < 0,001$), les taux de protéines beta 1 après 21 jours.

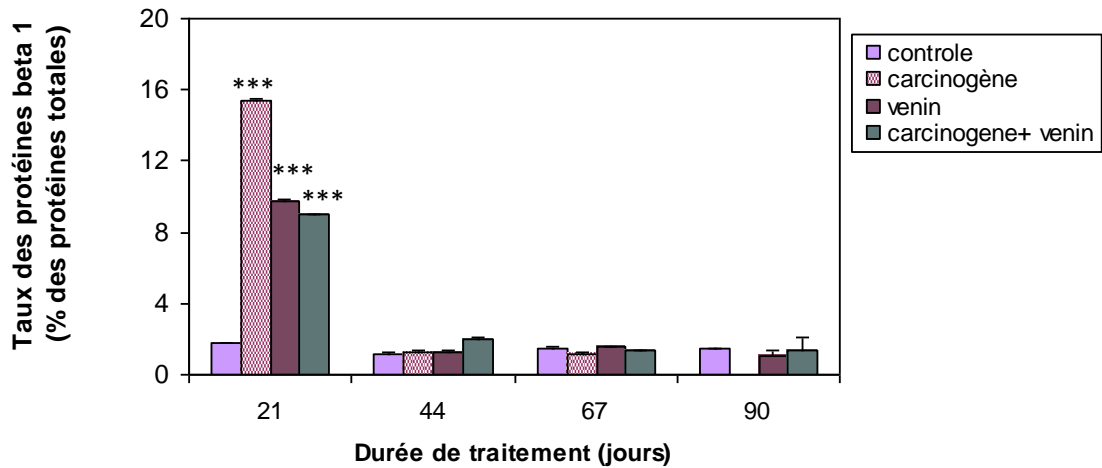


Figure 27: Effet des différents traitements sur le taux des protéines beta 1 (n=3,*** hautement significatif $p < 0,001$)

5.6. Effet du traitement sur le taux des protéines beta 2

Les résultats de la **figure 28** montrent que le traitement avec le carcinogène ou le venin entraîne une diminution progressive des protéines beta 2 avec un effet significatif à la fin de la période du traitement 67 ($p < 0,05$) jours pour le premier et 90 ($p < 0,05$) jours pour le deuxième. Le traitement avec le carcinogène suivi du venin entraîne par contre, une augmentation hautement significative a 90 jours ($p < 0,001$)

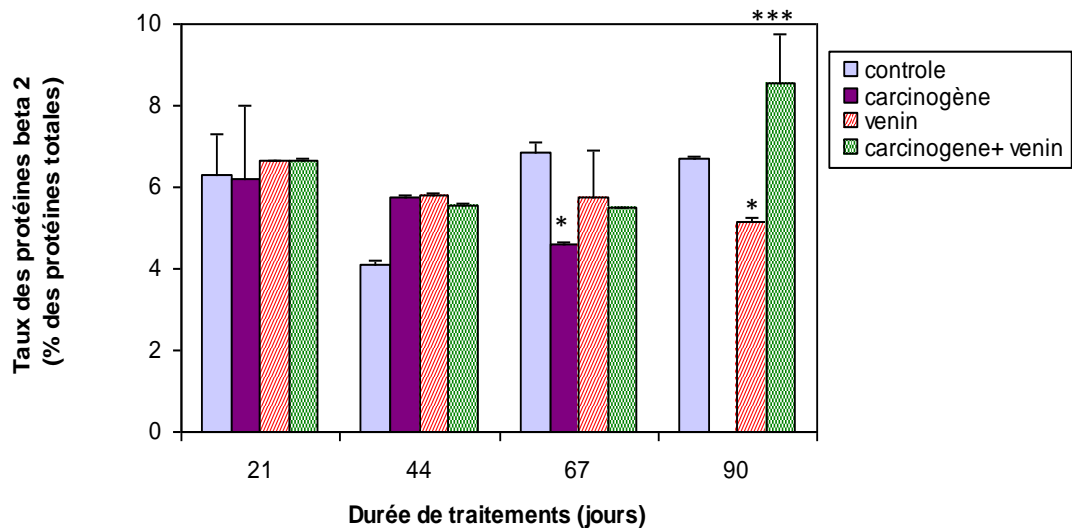


Figure 28 : Effet des différents traitements sur le taux des protéines beta 2 (n=3,* significatif $p < 0,05$, *** hautement significatif $p < 0,001$)

5.7. Effet du traitement sur le taux des gamma globulines

Les différents traitements (**Fig. 29**) n'ont pas d'effet significatif sur les taux sériques des gamma globulines. Une hausse significative est observé uniquement avec la combinaison carcinogène + venin après 90 ($p < 0,05$) jours de traitement.

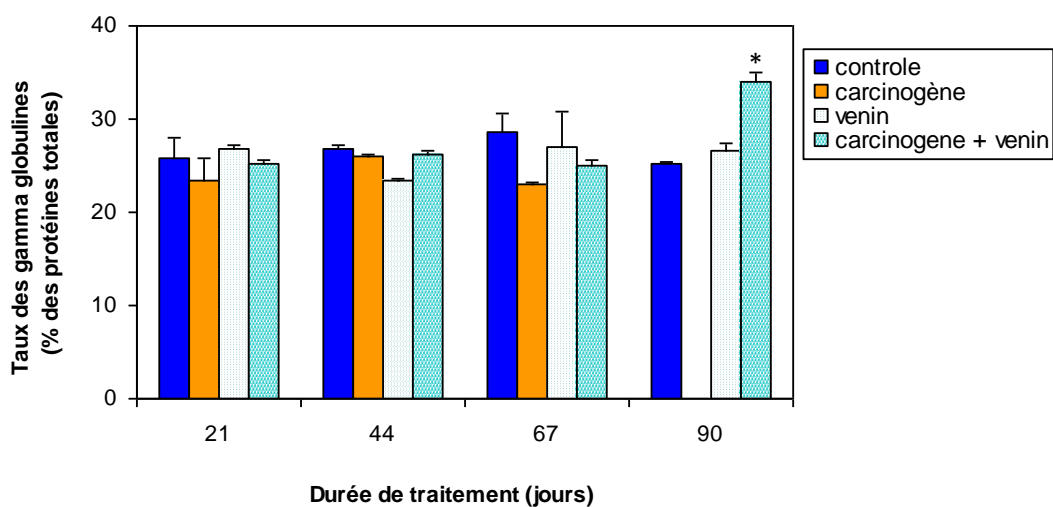


Figure 29: Effet des différents traitements sur le taux des gamma globulines (n=3,* significatif $p < 0,05$)

6. Effet du traitement sur le taux du monoxyde d'azote :

Les résultats de la **figure 30** montrent que le traitement par le carcinogène et le carcinogène + venin augmentent les taux du NO à 21, 44 et 90 et les diminuent à 67 jours. Par contre le venin augmente le taux du NO sur toute la période du traitement (à 21, 44, 67 et 90 jours).

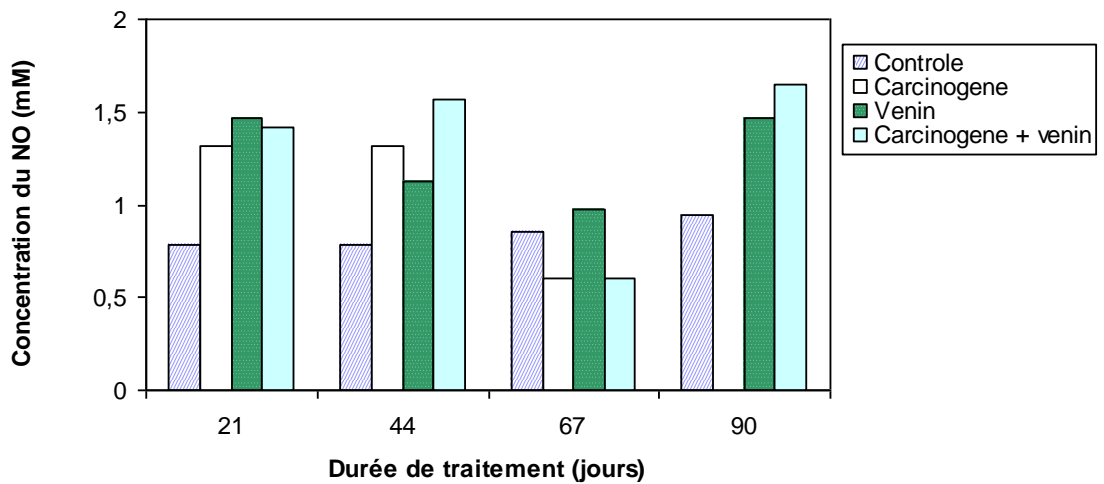


Figure 30: Effet des différents traitements sur le taux du monoxyde d'azote (n=3)

7. Effet du traitement sur l'activité de la catalase:

Cette étude (**Fig. 31**) signale que le traitement par le venin d'abeille augmentent l'activité de la catalase à 67 et 90 jours du traitement.

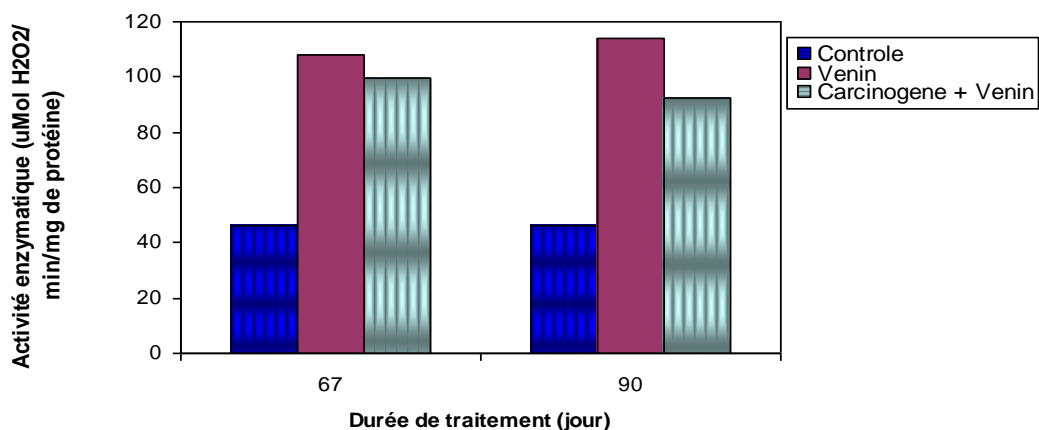


Figure 31 : Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique de la catalase (n=3)

DISCUSSION

V. Discussion:

1. Effet des différents traitements sur les observations macroscopiques :

1.1. Effet du carcinogène sur les glandes mammaires :

Dans ce travail, notre premier but était de développer un model animal de cancer mammaire, afin de tester l'effet anti-tumoral du venin d'abeille. Pour cela, on a utilisé un carcinogène chimique de la famille des "Nitroso". Les résultats des observations macroscopiques montrent que le carcinogène a induit des tumeurs mammaires dans 5/6 rattes avec un pourcentage de 83.33% (les mortalités sont négligées) avec une période latente de 67 jours. Ce résultat est en corrélation avec les travaux de **Jose et al., 2013** qui ont utilisé le même carcinogène et ils ont eu une incidence de 6/6 rattes avec un pourcentage de 100% mais avec une période de latence égale à 85.83 ± 1.759 jours.

1.2. Effet du venin sur la carcinogénèse des glandes mammaires :

Nos résultats indiquent l'absence de tumeurs chez le lot C+V. Cette absence de tumeurs peut être expliquée par l'existence d'un effet anti tumoral du venin d'abeille ou que ce dernier ralentie le processus de carcinogénèse. Cependant les travaux de **Oršolić et al., 2003** ont montré que le venin d'abeille inhibe la prolifération des cellules de carcinome mammaire in vitro et la croissance tumorale in vivo chez un model de souris. Aussi, **Liu et al., 2002** ont rapporté que le venin d'abeille peut être utilisé comme un agent chimiothérapeutique contre les tumeurs malignes. Nos résultats également montrent que les traitements par le venin (lot V et C+V) rendent le sang plus liquide avec un temps de coagulation plus long, ce qui corrobore les résultats de **Zolfagharian et al., 2015**, ayant conclu que le venin d'abeille est un anti-coagulant.

2. Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique des TGO et TGP :

TGO et TGP sont des enzymes libérés dans le sang en cas de lésions hépatiques aigue, ce sont des indicateurs importants de l'hépatotoxicité (**Laskin et al., 1995; Waters et al., 2001 ; Whyte et al., 2007**). Une augmentation de l'activité de ces enzymes est associée à une surexpression hépatique de l'iNOS (*inducible NO synthase*). Cette surexpression est à l'origine de la génération de grande quantité du NO dans le foie. Ce dernier, peut promouvoir les lésions hépatiques via son interférence avec les produits de la respiration mitochondriale (ROS), ce qui provoque des lésions cellulaires suivies d'une

libération des enzymes cytoplasmiques TGO et le TGP dans le sang (**Moncada et Erusalimsky, 2002**).

2.1. Effet du venin sur l'activité du TGO et TGP

Nos résultats indiquent que le venin entraîne une diminution des activités enzymatiques du TGO et TGP au début du traitement. La baisse des TGO et TGP peut être expliquée par les caractéristiques anti-oxydantes et anti-inflammatoires du venin d'abeille et ses composants (**SON et al., 2007 ; Lee et al., 2010 ; Khalil et al., 2015**). Le venin d'abeille constitue un mélange très complexe de peptides, enzymes et amines fortement active dont les composants majeurs sont la mélittine et la phospholipase A2 (PLA2) (**Kim et al., 2010**).

Ces dernières molécules entraînent une baisse des taux du NO hépatiques, par une régulation négative de la machinerie de production, iNOS ; et une réduction de l'expression de la COX-2 (enzyme incluse dans le métabolisme de l'acide arachidonique), du facteur nucléaire kappa B (NFκB) et du TNF α (**Lee et al., 2010; Kim et al., 2014 ; Park et al., 2014; Rayahin, Buhrman et Gemeinhart, 2014**). Les études de **Cernanec et al., 2002; Park et al., 2007** et **Khalil et al., 2015** ont également prouvé que la PLA2 et la mélittine jouent le rôle des capteurs (*scavenger*) du NO et des ROS.

Nos résultats montrent aussi que l'activité du TGP augmente vers la fin du traitement alors que c'est le contraire pour l'activité du TGO. Cela peut être expliqué par le fait que la TGP est une enzyme spécifique au foie, par contre la TGO est présente dans le cœur et les muscles (**Caquet, 2015**). Cette augmentation est un indicateur de lésion hépatique.

Apparemment l'application du venin d'abeille à long terme entraîne des lésions hépatiques. Des études réalisées par **Asaoka et al. 1993, Bomalski et al. 1995 et Goddard et al. 1996** ont suggéré que le venin d'abeille et ses composants augmentent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que : l'IL-1, TNFα par les monocytes et les LTh₁, ce qui provoque une inflammation et des lésions hépatiques (**Oršolić et al., 2003**).

2.2. Effet du carcinogène sur l'activité du TGO et TGP

Notre étude signale que le taux de TGP augmente à la fin du traitement. Cela indique que le carcinogène, de la famille des Nitroso ; a provoqué des lésions au niveau des hépatocytes. Ces lésions vont permettre la libération du bio-marqueur du dommage

hépatique, TGP. Il a été bien établi que le foie est le lieu de détoxification de ce carcinogène (Yamazaki et al., 1992; Grudziński et al., 2005). Le carcinogène régule l'iNOS positivement en provoquant une surproduction du NO lequel est à l'origine des lésions hépatiques (Ohshima et Bartsch, 1994; Allavena et al., 2008).

3. Effet des différents traitements sur l'activité enzymatique de LDH :

LDH est une enzyme d'origine cellulaire qui catalyse la conversion reverse du pyruvate en lactate, leur libération dans le sang est un marqueur de souffrance cellulaire (Jurisic, Radenkovic et Konjevic, 2015; Storey, 2015).

3.1. Effet du carcinogène sur l'activité enzymatique de LDH:

Notre étude montre que le taux de l'activité de LDH diminue au début du traitement puis augmente ensuite. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Antropov et al., 2012 qui ont utilisé un carcinogène de type nitroso sur des grenouille où ils ont remarqué que l'activité de LDH diminue après 28 jours du traitement. Comme il a été bien démontré par Hiramoto et al., 2001 et Hiramoto et al., 2002, le carcinogène se décompose pour former le NO et les intermédiaires de nitrite/ nitrate, ce qui génère un stress nitrosatif. Ce qui est en accord avec nos résultats où on a remarqué que le taux du NO augmente lors du traitement avec le carcinogène. La relation LDH-NO a été démontrée aussi par Soloveva et Peretyagin, 2016 où ils ont trouvé que le NO à une concentration donnée diminue l'activité enzymatique de LDH. Mais le mécanisme reste encore à élucidé.

Nos résultats indiquent aussi une augmentation de l'activité de LDH après 44 jours. Cela peut être expliqué par la destruction tissulaire provoquée par la croissance néoplasique ce qui libère de grande quantité de LDH dans le sang. Cette augmentation peut être expliquée, aussi par une sur-régulation de LDH-A (isotype de LDH) dans les cancers (Hussien et Brooks, 2010). Notre résultat macroscopique montre l'apparition de tumeur palpable à 53 jours, ce qui indique l'existence d'une prolifération rapide et une néo-angiogenèse intense. Kolev et al., 2008 ont montré qu'une surexpression de LDH-A est en corrélation avec l'hypoxie et l'angiogenèse intra-tumoral. D'autres auteurs confirment cette relation, en trouvant que l'augmentation de l'expression de LDH-A est potentiellement corrélée avec l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF *Vascular endothelial growth factor*) (Kim et al., 2014).

3.2. Effet du venin et du carcinogène + venin sur l'activité enzymatique de LDH:

Nos résultats montrent que le venin diminue l'activité enzymatique de LDH. Cette baisse de l'activité enzymatique peut être expliquée soit par l'existence d'une molécule dans le venin d'abeille capable de réguler négativement l'expression de LDH ou a inhibé l'activité enzymatique de LDH.

Suite a plusieurs travaux de recherches, il a été bien démontré aujourd'hui que LDH est sous le contrôle de différents gènes tels que : le facteur d'induction de l'hypoxie (HIF1 α *Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), c-Myc à des taux transrationnels élevées et par la protéine kinase A et la protéine kinase C dans les conditions normales (**Jungmann, 2005; Seth et al., 2011**). Alors que d'autres recherches prouvent que le venin d'abeille régule négativement tous ces gènes (**ZHU et al., 2002; Oršolić et al., 2003; Park et al., 2010; Du et al., 2011; Shin et al., 2013; Yang et al., 2014; Gallo et al., 2015**).

Cela confirme bien que le venin d'abeille est dose et durée-dépendant. Le venin d'abeille active la réponse inflammatoire ce qui provoque à long terme des lésions tissulaires et une libération de LDH (**Chen et Lariviere, 2010**). Au même temps plusieurs recherches prouvent que la mélittine (appelé aussi pore-formation) à certain concentration provoque une lyse cellulaire semblable à une lyse par le complément (CAM complexe d'attaque membranaire) (**Gajski et Garaj-Vrhovac, 2013; Mahmoodzadeh et al., 2015**).

4. Effet des différents traitements sur les protéines sériques :

L'électrophorèse donne, d'autre part, un reflet panoramique de l'ensemble des protéines sériques et peut à ce titre dépister, notamment un syndrome inflammatoire (zones alpha-1 et alpha-2), une carence martiale (zone bêta), une hémolyse intra-vasculaire (zone alpha-2), une cirrhose (zone bêta-gamma), une maladie infectieuse, auto-immune ou de système (zone alpha-1, alpha-2, bêta et surtout gamma), un déficit congénital ou acquis des immunoglobulines ou d'autres protéines (albumine, alpha-1 antitrypsine et gammaglobulines notamment) ou d'évaluer le retentissement d'une pathologie connue, voire d'en assurer le suivi : atteinte hépatique (dont une cirrhose ou une hépatite), atteinte rénale (dont un syndrome néphrotique), digestives, etc. (**Szymanowicz et al., 2006**).

4.1. Effet sur les taux des protéines totales et de l'albumine :

Cette étude montre que les différents traitements n'ont aucun effet sur les taux des protéines totales et de l'albumine. Ces résultats sont en accord avec les résultats de (**Han et al., 2009**).

4.2. Effet sur le taux des protéines alpha 1 :

Les protéines qui migrent dans la zone des protéines alpha 1 sont alpha 1 antitrypsine (A1AT) et α 1 glycoprotéine acide ou orosomucoïde (AGP α 1-acid glycoprotein) (**Bhagavan et Ha, 2015**).

Nos résultats indiquent une diminution hautement significative du taux des protéines alpha 1 au début du traitement. Une baisse du taux des protéines alpha 1 est expliquée par l'effet anti-inflammatoire du venin d'abeille. Cette baisse peut être expliquée par une diminution du taux de l'A1AT. Il a été indiqué qu'un déficit de l'A1AT peut être causé par une diarrhée motrice activé par la Prostaglandine E2 (PGE₂) (**Amiot, 2015; Satitsri et al., 2016**). (**Lambeau et Gelb, 2008; Schewe et al., 2016**). Le venin d'abeille induit des diarrhées a travers l'effet de la PLA2 qui stimule a son tour la production des PGE₂ chose qu'on a remarqué au cours de notre expérimentation ce qui entraine une diminution du taux des alpha 1. Surtout que le taux des protéines alpha 1 retourne à la norme par rapport au témoin après disparition des diarrhées.

4.3. Effet sur le taux des protéines alpha 2 :

Cette fraction comprend majoritairement l'haptoglobine, α 2-macroglobuline (**Bhagavan et Ha, 2015**).

Nos résultats montrent une augmentation du taux des protéines alpha 2. Cette augmentation peut être expliquée par une surexpression de l'haptoglobine, une molécule de la phase aigue de l'inflammation régulée par la cytokine pro-inflammatoire IL-6 lors de la réponse inflammatoire (**Robert, 2013; Hunter et Jones, 2015**). En basant sur le model proposé par **Quaye, 2008** nous pouvons supposer que l'haptoglobine constitue un des mécanismes anti-inflammatoires impliqués par le venin d'abeille. Plusieurs recherches confirment également que les composants du venin d'abeille ont la capacité de réguler positivement la réponse inflammatoire (**Régnier-Vigouroux et al., 1988; Buku,1999 ; Buku et al., 2005 Park et al., 2014; Bourgeois, 2015**).

5. Effet sur le taux des protéines beta 1 :

Nos résultats indiquent une hausse des taux des protéines beta 1. Beta 1 est composé principalement de la transferrine et les lipoprotéines de basses densités (LDL *low density lipoprotein*) (**Wahed et Dasgupta,2015**). Une augmentation dans la bande $\beta 1$ peut évoquer une hypertransferrinémie (un taux élevé de transferrine libre) (**Le Carrer et Bach-Ngohou, 2005**). L'augmentation du taux de la transferrine est due à une anémie ferriprive, ou carence martiale est une anémie due à une carence des réserves en fer de l'organisme (**Szymanowicz et al.,2006**). La sortie du fer dans la circulation sanguine est finement régulée par l'expression de la ferroportine, un transporteur qui assure la sortie du fer à la fois des entérocytes (Fer provenant de l'absorption) et des macrophages (provenant du recyclage de l'hème dans système réticulo-endothélial obtenu de la dégradation des érythrocytes) vers la circulation sanguin (**McKie et al., 2000; Zon et al., 2000; Yang et al., 2002; Knutson, 2003**). La ferroportine est régulée par l'hormone peptidique hepcidine. La formation d'un complexe ferroportine-hepcidine induit l'internalisation et la dégradation de la ferroportine (**Nemeth, 2004**). L'hepcidine est sur-régulé par le stress inflammatoire (**Roy et Andrews, 2005; Ganz et Nemeth, 2009**).

D'après **Verma, Bahorun et Kumar, 2012** même le carcinogène est capable d'induire l'expression de toute une gamme de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent agir sur les taux de l'hepcidine et notamment la fraction beta 1.

6. Effet sur le taux des protéines beta 2 :

Nos résultats indiquent que le traitement par le carcinogène seul ou le venin seul diminuent le taux des protéines beta 2. Dans cette zone migre les composants du complément et β -lipoprotéine (appelé aussi LDL *low density lipoprotein*) (**Bhagavan et Ha, 2015**). La diminution de la fraction beta 2 dans notre cas peut être expliquée une diminution du taux de LDL. Ce résultat est en corrélation avec les résultats de **Wright et al.,1991** et **Ambaga M, 2015**.

Par contre, nos résultats indiquent une augmentation des protéines beta 2 dans le traitement combiné carcinogène + venin. Cette augmentation peut être expliquée par hypercomplémentémie d'origine inflammatoire (**Szymanowicz et al.,2006**).

7. Effet sur le taux des gamma globulines :

Nos résultats indiquent que les traitements par le venin seul et le carcinogène seul n'ont aucun effet sur le taux des gamma globulines. La fraction gamma globuline renferme les 5 classes d'immunoglobulines IgM, IgG, IgA, IgD et IgE, plus la protéine réactive C (CRP) qui aussi migre dans cette zone (**Stockham ET Scott, 2013**).

D'après **Jang et al., 2003** les immunoglobulines sont habituellement non visibles sur le profil à l'exception des très rares myélomes.

Néanmoins, l'augmentation des gamma globulines vers la fin du traitement par le carcinogène + venin peut être expliquée par un grand taux de CRP libéré par l'inflammation (**Bhagavan et Ha, 2015**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre étude a été menée dans le but d'évaluer l'effet protecteur du venin d'abeille contre la carcinogénèse des glandes mammaires et les lésions hépatiques induites par un carcinogène de la famille nitroso. L'effet du venin est testé sur l'activité des enzymes TGP, TGO, LDH, catalase et sur le profil des protéines sériques et la production du NO.

Nos résultats montrent que le venin possède un effet anti tumorale en inhibant la carcinogénèse des glandes mammaires. Aussi, l'application du venin d'abeille a une courte durée diminue les taux de l'activité enzymatique du TGO, TGP, LDH et le taux sériques des protéines alpha 1. Par contre, il augmente le taux du NO, des protéines alpha 2, beta 1 et l'activité enzymatique du catalase. L'application de venin pour une de longue durée augmente l'activité des TGP, LDH comme indicateur de lésion.

Le venin d'abeille a plusieurs effets en relation avec le système immunitaire parfois contradictoire. Le venin d'abeille est durée-dépendant.

En perspectives il serait intéressant de :

- Extraire les molécules actives responsables des propriétés anti-tumorales, anti-inflammatoires et antioxydantes du venin d'abeille.
- D'entamer une étude moléculaire pour approfondir les mécanismes d'actions du venin d'abeille.
- Etudier d'autres paramètres de stress oxydatif et de la réponse inflammatoire.
- De réaliser une étude in-vitro.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Référence

- A**bbas, A., Lichtman, A. and Pillai, S. (2015). Cellular and molecular immunology. 8th ed. Saunders, an imprint of Elsevier, pages 535.
- Actor, J. (2014). Introductory Immunology. London: Academic Press, pages 162.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
- AL-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J. and Wink, M. (2015). Pharmacological synergism of bee venom and melittin with antibiotics and plant secondary metabolites against multi-drug resistant microbial pathogens. *Phytomedicine*, 22(2), pp.245-255.
- Allavena, P., Garlanda, C., Borrello, M., Sica, A. and Mantovani, A. (2008). Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18(1), pp.3-10.
- Ambaga M, K. (2015). Effect of Honey Bee Venom (*Apis mellifera*) on Hyperglycemia and Hyperlipidemia in Alloxan Induced Diabetic Rabbits. *Journal of Diabetes & Metabolism*, 06(03).
- Amiot, A. (2015). Gastro-entéropathies exsudatives. *La Revue de Médecine Interne*, 36(7), pp.467-473.
- Antropov VI, Samoïlov VO, Slepian ÉI (2012). Effect of carcinogenic nitrogen-containing compounds on cell metabolism. *Vopr Onkol.* 2012;58(4):532-6.
- Armstrong, D. and Stratton, R. (2016). Oxidative stress and antioxidant protection. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc.
- Asaoka, Y., Yoshida, K., Sasaki, Y., Nishizuka, Y., Murakami, M., Kudo, I., Inoue, K., 1993. Possible role of mammalian secretory group II phospholipase-A2 in T-lymphocyte activation implication in propagation of inflammatory reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 716–719.

Ballard, A. (2015). Epstein–Barr virus infection is equally distributed across the invasive ductal and invasive lobular forms of breast cancer. *Pathology - Research and Practice*, 211(12), pp.1003-1005.

Banerjee, E. (2014). *Perspectives in inflammation biology*. Springer India, pages 148.

Banerjee, M., Banerjee, N., Ghosh, P., Das, J., Basu, S., Sarkar, A., States, J. and Giri, A. (2010). Evaluation of the serum catalase and myeloperoxidase activities in chronic arsenic-exposed individuals and concomitant cytogenetic damage. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249(1), pp.47-54.

Barnig, C. (2016). Médiateurs lipidiques pro-résolvant dans l'inflammation allergique. *Revue Française d'Allergologie*, 56(1), pp.38-42.

Battino, M., Greabu, M. and Calenic, B. (2016). Oxidative stress in oral cavity: interplay between reactive oxygen species and antioxidants in health, inflammation, and cancer. In: D. Armstrong and R. Stratton, ed., *Oxidative stress and antioxidant protection*, 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc, pp.155-166.

Belaïch, R. and Boujraf, S. (2016). Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés : effets et stratégies thérapeutiques. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 10(1), pp.38-42.

Berryhill, G., Trott, J. and Hovey, R. (2016). Mammary gland development—It's not just about estrogen1. *Journal of Dairy Science*, 99(1), pp.875-883.

Bhagavan, N. V., & Ha, C. E. (2015). *Essentials of Medical Biochemistry: With Clinical Cases*. Academic Press.

Blask, D. (2009). Melatonin, sleep disturbance and cancer risk. *Sleep Medicine Reviews*, 13(4), pp.257-264.

Bomalski, J.S., Ford, T., Hudson, A.P., Clark, M.A., 1995. Phospholipase A2-activating protein induce the synthesis of IL-1 and TNF in human monocytes. *J. Immunol.* 154 (8), 4027–4031.

Bourgeois, E. A., Subramaniam, S., Cheng, T. Y., De Jong, A., Layre, E., Ly, D., ... & Cerundolo, V. (2015). Bee venom processes human skin lipids for presentation by CD1a. *The Journal of experimental medicine*, 212(2), 149-163.

Bradford M.M. , 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the Princip of protein-dye binding. *Anal. Biochem*,72:248-254

Brock, A., Krause, S. and Ingber, D. (2015). Control of cancer formation by intrinsic genetic noise and microenvironmental cues. *Nature Reviews Cancer*, 15(8), pp.499-509.

Buckley, C., Barone, F., Nayar, S., Bénézech, C. and Caamaño, J. (2015). Stromal Cells in Chronic Inflammation and Tertiary Lymphoid Organ Formation. *Annual Review of Immunology*, 33(1), pp.715-745.

Buehring, G., Shen, H., Jensen, H., Jin, D., Hudes, M. and Block, G. (2015). Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. *PLOS ONE*, 10(9), p.e0134304.

Buku, A. (1999). Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation. *Peptides*, 20(3), pp.415-420.

Buku, A., Condie, B., Price, J. and Mezei, M. (2005). [Ala12]MCD peptide: a lead peptide to inhibitors of immunoglobulin E binding to mast cell receptors1. *J Pept Res*, 66(3), pp.132-137.

Caquet, R. (2015). *250 examens de laboratoire*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson.p553,

Ceriello, A., Testa, R. and Genovese, S. (2016). Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 26(4), pp.285-292.

Cernanec, J., Guilak, F., Weinberg, J., Pisetsky, D. and Fermor, B. (2002). Influence of hypoxia and reoxygenation on cytokine-induced production of proinflammatory mediators in articular cartilage. *Arthritis & Rheumatism*, 46(4), pp.968-975.

Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S. and Snowden, N. (2014). Essentials of clinical immunology. Wiley-Blackwell,UK, pages 365.

Chen, J. and Lariviere, W. (2010). The nociceptive and anti-nociceptive effects of bee venom injection and therapy: A double-edged sword. *Progress in Neurobiology*, 92(2), pp.151-183.

Classen A., Ioberas J and Celada A.2009. macrophage activation in *macrophage and dendritic cells*. pp 361. Springer edition.

Desnoyers, A., Riesco, E., Fülöp, T. and Pavic, M. (2016). Activité physique et cancer : mise au point et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne*, 37(6), pp.399-405.

Dietrich-Muszalska, A. (2016). Oxidative and nitrative stress in schizophrenia. In: D. Armstrong and R. Stratton, ed., *Oxidative stress and antioxidant protection*, 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc, pp.57-75.

Du, Y., Xiao, Y., Lu, Z., Ding, J., Xie, F., Fu, H., Wang, Y., Strong, J., Zhang, J. and Chen, J. (2011). Melittin activates TRPV1 receptors in primary nociceptive sensory neurons via the phospholipase A2 cascade pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(1), pp.32-37.

Durand, D., Damon, M. and Gobert, M. (2013). Le stress oxydant chez les animaux de rente : principes généraux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 48(5), pp.218-224.

Fatima, G., Sharma, V., Das, S. and Mahdi, A. (2014). Oxidative stress and antioxidative parameters in patients with spinal cord injury: implications in the pathogenesis of disease. *Spinal Cord*, 53(1), pp.3-6.

Feinberg, A., Koldobskiy, M. and Göndör, A. (2016). Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet*, 17(5), pp.284-299.

Feinberg, A., Ohlsson, R. and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*, 7(1), pp.21-33.

Feldman, N., Rotter-Maskowitz, A. and Okun, E. (2015). DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Research Reviews*, 24, pp.29-39.

Ferrier, E. (2012). Étude du développement du tissu mammaire chez la souris adulte en région interscapulaire comparée à la région ventrale pérिमamelonnaire sous l'influence des oestrogènes. Thèse pour le doctorat vétérinaire. École nationale vétérinaire d'Alfort, France.

Gajski, G. and Garaj-Vrhovac, V. (2013). Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), pp.697-705.

Gallo, M., Sapio, L., Spina, A., Naviglio, D., Calogero, A. and Naviglio, S. (2015). Lactic dehydrogenase and cancer an overview. *Frontiers in Bioscience*, 20(8), pp.1234-1249.

Ganz, T. and Nemeth, E. (2009). Iron Sequestration and Anemia of Inflammation. *Seminars in Hematology*, 46(4), pp.387-393.

Garnier, R., Villa, A. and Chataigner, D. (2011). Les dangers du formaldéhyde et du toluène justifient-ils une substitution systématique en milieu hospitalier et dans les laboratoires ?. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 72(3), pp.252-255.

Gay, J., Menkhoff, I. and Zierski, M. (2014). Abeilles. Paris: Éditions Place des Victoires, p.31.

Goddard, D.H., Bomalaski, J.S., Lipper, S., Shorr, R.G., Clark, M.A., 1996. Phospholipase A2-mediated inflammation induces regression of malignant gliomas. *Cancer Lett.* 102 (1–2), 1–6.

Grudziński, I. P., Frankiewicz-Józko, A. N. N. A., & Szarska, E. (2005). Total antioxidant status in the blood serum of rats exposed to N-nitroso compounds and nitric oxide synthase inhibitors. *Roczniki Państwowego Zakładu*, 56(2), 5.

Guerby, P., Vidal, F., Garoby-Salom, S., Vayssiere, C., Salvayre, R., Parant, O. and Negre-Salvayre, A. (2015). Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la pré-éclampsie : mise au point. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 43(11), pp.751-756.

- Han, S. M., Lee, K. G., Yeo, J. H., Hwang, S. J., Jang, C. H., Chenoweth, P. J., & Pak, S. C. (2009). Effects of bee venom treatment on growth performance of young pigs. *The American journal of Chinese medicine*, 37(02), 253-260.
- Hanahan D., Robert A & Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 246-274
- Hardin, J., Cobelli, N. and Santambrogio, L. (2015). Consequences of metabolic and oxidative modifications of cartilage tissue. *Nat Rev Rheumatol*, 11(9), pp.521-529.
- Haschek, W., Rousseaux, C. and Wallig, M. (2013). Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology. Academic Press Elsevier: London, pp.2665-2693.
- He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S. and Du, Z. (2015). Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked?. *Molecules*, 20(5), pp.9183-9213.
- Headland, S. and Norling, L. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*, 27(3), pp.149-160.
- Heikkila, K., Nyberg, S., Madsen, I., de Vroome, E., Alfredsson, L., Bjorner, J., Borritz, M., Burr, H., Erbel, R., Ferrie, J., Fransson, E., Geuskens, G., Hooftman, W., Houtman, I., Jöckel, K., Knutsson, A., Koskenvuo, M., Lunau, T., Nielsen, M., Nordin, M., Oksanen, T., Pejtersen, J., Pentti, J., Shipley, M., Steptoe, A., Suominen, S., Theorell, T., Vahtera, J., Westerholm, P., Westerlund, H., Dragano, N., Rugulies, R., Kawachi, I., Batty, G., Singh-Manoux, A., Virtanen, M. and Kivimäki, M. (2016). Long working hours and cancer risk: a multi-cohort study. *Br J Cancer*, 114(7), pp.813-818.
- Hiramoto, K., Ohkawa, T. and Kikugawa, K. (2001). Release of nitric oxide together with carbon-centered radicals from N-nitrosamines by ultraviolet light irradiation. *Free Radical Research*, 35(6), pp.803-813.
- Hiramoto, K., Ryuno, Y. and Kikugawa, K. (2002). Decomposition of N-nitrosamines, and concomitant release of nitric oxide by Fenton reagent under physiological conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 520(1-2), pp.103-111.

Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nature Medicine*, 21(11), pp.1253-1261.

Hunter, C. and Jones, S. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5), pp.448-457.

Hussien, R. and Brooks, G. (2010). Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiological Genomics*, 43(5), pp.255-264.

Hvid, H., Thorup, I., Oleksiewicz, M., Sjögren, I. and Jensen, H. (2011). An alternative method for preparation of tissue sections from the rat mammary gland. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(4), pp.317-324.

Hvid, H., Thorup, I., Sjögren, I., Oleksiewicz, M. and Jensen, H. (2012). Mammary gland proliferation in female rats: Effects of the estrous cycle, pseudo-pregnancy and age. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(4), pp.321-332.

Jain, P., Pandey, R. and Shukla, S. (2015). *Inflammation: Natural Resources and Its Applications*. Springer India, pages 156.

Jang, M., Shin, M., Lim, S., Han, S., Park, H., Shin, I., Lee, J., Kim, K., Kim, E. and Kim, C. (2003). Bee Venom Induces Apoptosis and Inhibits Expression of Cyclooxygenase-2 mRNA in Human Lung Cancer Cell Line NCI-H1299. *J Pharmacol Sci*, 91(2), pp.95-104.

Jeggo, P., Pearl, L. and Carr, A. (2015). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), pp.35-42.

Jeong, Y., Choi, Y., Shin, J., Cho, H., Kang, J., Park, K., Choe, J., Bae, Y., Han, S., Kim, C., Chang, H. and Chang, Y. (2014). Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 68, pp.218-225.

Jiménez-Dalmaroni, M., Gerswhin, M. and Adamopoulos, I. (2016). The critical role of toll-like receptors — From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmunity Reviews*, 15(1), pp.1-8.

Jose, M., Amathi, R., Sathyamurthy, D. and Kumar, B. (2013). Chemopreventive effect of montelukast in n-nitroso n-methyl urea induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 45(3), p.286.

Juglard P. (2015). Abeilles et santé : de l'apithérapie à l'allergie. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse 3 – Paul Sabatier, faculté des sciences pharmaceutiques.

Jungmann, R. (2005). Cyclic AMP and AKAP-mediated Targeting of Protein Kinase A Regulates Lactate Dehydrogenase Subunit A mRNA Stability. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), pp.25170-25177.

Juriscic, V., Radenkovic, S. and Konjevic, G. (2015). The Actual Role of LDH as Tumor Marker, Biochemical and Clinical Aspects. *Advances in Cancer Biomarkers*, pp.115-124.

Karin, M. and Clevers, H. (2016). Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*, 529(7586), pp.307-315.

Khalil, S., Abd-Elhakim, Y., Selim, M. and Al-Ayadhi, L. (2015). Apitoxin protects rat pups brain from propionic acid-induced oxidative stress: The expression pattern of Bcl-2 and Caspase-3 apoptotic genes. *NeuroToxicology*, 49, pp.121-131.

Khan, A., Ellis, I., Hanby, A., Coasar, E., Rakha, E. and Kandil, D. (2015). Precision molecular pathology of breast cancer. Springer Science+Business Media New York. p338.

Kim, H., Keum, D., Kwak, J., Chung, H. and Bae, H. (2014). Bee Venom Phospholipase A2 Protects against Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury by Modulating Regulatory T Cells and IL-10 in Mice. *PLoS ONE*, 9(12), p.e114726.

Kim, H., Lee, H., Yang, H. and Kim, W. (2014). High Lactate Dehydrogenase 5 Expression Correlates with High Tumoral and Stromal Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Gastric Cancer. *Pathobiology*, 81(2), pp.78-85.

Kim, K., Kum, Y., Park, Y., Park, J., Kim, S., Lee, W., Lee, K., Han, S. and Park, K. (2010). The Protective Effect of Bee Venom against Ethanol-Induced Hepatic Injury via

Regulation of the Mitochondria-Related Apoptotic Pathway. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107(1), pp.619-624.

Knutson, M. (2003). Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood*, 102(12), pp.4191-4197.

Koeberle, A. and Werz, O. (2014). Multi-target approach for natural products in inflammation. *Drug Discovery Today*, 19(12), pp.1871-1882.

Kolev, Y., Uetake, H., Takagi, Y. and Sugihara, K. (2008). Lactate Dehydrogenase-5 (LDH-5) Expression in Human Gastric Cancer: Association with Hypoxia-Inducible Factor (HIF-1 α) Pathway, Angiogenic Factors Production and Poor Prognosis. *Annals of Surgical Oncology*, 15(8), pp.2336-2344.

Kotas, M. and Medzhitov, R. (2015). Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell*, 160(5), pp.816-827.

Lambeau, G. and Gelb, M. (2008). Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A 2. *Annu. Rev. Biochem.*, 77(1), pp.495-520.

LARSEN W.J., SCHOENWOLF G.C., BLEYL S., BRAUER R., FRANCIS-XEST P.H. (2011). *Embryologie humaine*, 3rd ed. Oxford, de Boeck, 209

Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow DJ (1995) Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* 21: 1045–1050.

Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow DJ (1995) Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* 21: 1045–1050.

LE CARRER, D., & BACH-NGOHOU, K. (2005). L'électrophorèse capillaire automatisée en biologie clinique. *Spectra Biologie*, 24(146), 47-52.

Lee, H., Park, S., Kim, T., Jung, Y., Park, M., Oh, S., Yun, H., Jun, H., Yoo, H., Han, S., Lee, U., Yoon, J., Song, M. and Hong, J. (2015). Bee venom inhibits growth of human cervical tumors in mice. *Oncotarget*, 6(9), pp.7280-7292.

Lee, W., Kim, S., Park, J., Kim, K., Chang, Y., Park, Y., Lee, K., Han, S., Yeo, J., Pak, S. and Park, K. (2010). Bee Venom Reduces Atherosclerotic Lesion Formation via Anti-inflammatory Mechanism. *The American Journal of Chinese Medicine*, 38(06), pp.1077-1092.

Lepetsos, P. and Papavassiliou, A. (2016). ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(4), pp.576-591.

LÍŠKA, J., BRTKO, J., DUBOVICKÝ, M., MACEJOVÁ, D., KISSOVÁ, V., POLÁK, Š. and UJHÁZY, E. (2016). Relationship between histology, development and tumorigenesis of mammary gland in female rat. *Exp. Anim.*, 65(1), pp.1-9.

Liu, X., Chen, D., Xie, L. and Zhang, R. (2002). Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(8), pp.1083-1089.

Lochhead, P., Chan, A., Nishihara, R., Fuchs, C., Beck, A., Giovannucci, E. and Ogino, S. (2014). Etiologic field effect: reappraisal of the field effect concept in cancer predisposition and progression. *Mod Pathol*, 28(1), pp.14-29.

Lundberg, J., Gladwin, M. and Weitzberg, E. (2015). Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(9), pp.623-641.

Mahmoodzadeh, A., Zarrinnahad, H., Bagheri, K., Moradia, A. and Shahbazzadeh, D. (2015). First report on the isolation of melittin from Iranian honey bee venom and evaluation of its toxicity on gastric cancer AGS cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 78(10), pp.574-583.

Mathew, G. and Unnikrishnan, M. (2015). Multi-target drugs to address multiple checkpoints in complex inflammatory pathologies: evolutionary cues for novel “first-in-class” anti-inflammatory drug candidates: a reviewer’s perspective. *Inflamm. Res.*, 64(10), pp.747-752.

Mayne, S., Playdon, M. and Rock, C. (2016). Diet, nutrition, and cancer: past, present and future. *Nature Reviews Clinical Oncology*.

McKie, A., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T., Farzaneh, F., Hediger, M., Hentze, M. and Simpson, R. (2000). A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Molecular Cell*, 5(2), pp.299-309.

Melillo, G. (2014). Hypoxia and cancer. Springer Science+Business Media NewYork, p.363.

Mendelsohn, J., Gray, J., Howley, P., Israel, M. and Thompson, C. (2015). The molecular basis of cancer. Saunders, an imprint of Elsevier Inc., p.863.

Merlin, J. (2014). Les biomarqueurs moléculaires en oncologie . Springer-Verlag France,p.175.

Minihane, A., Vinoy, S., Russell, W., Baka, A., Roche, H., Tuohy, K., Teeling, J., Blaak, E., Fenech, M., Vauzour, D., McArdle, H., Kremer, B., Sterkman, L., Vafeiadou, K., Benedetti, M., Williams, C. and Calder, P. (2015). Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*, 114(07), pp.999-1012.

Moncada, S. and Erusalimsky, J. (2002). OPINION Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), pp.214-220.

Monsefi M, Abedian M, Azarbahram Z, Ashraf MJ. *Salvia officinalis* L. induces alveolar bud growing in adults female rat mammary glands. *Avicenna J Phytomed*, 2015; 5 (6): 560-567.

Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Szychlinska, M., Aiello, F., Vecchio, G., Salvatorelli, L., Magro, G. and Imbesi, R. (2015). Mammary gland: From embryogenesis to adult life. *Acta Histochemica*, 117(4-5), pp.379-385.

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database;

CID=7071, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7071> (accessed Apr. 22, 2016).

Nemeth, E. (2004). Heparin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, 306(5704), pp.2090-2093.

Ohshima, H. and Bartsch, H. (1994). Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 305(2), pp.253-264.

Oršolić, N., Šver, L., Verstovšek, S., Terzić, S. and Bašić, I. (2003). Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicol*, 41(7), pp.861-870.

Osborne, G., Rudel, R. and Schwarzman, M. (2015). Evaluating chemical effects on mammary gland development: A critical need in disease prevention. *Reproductive Toxicology*, 54, pp.148-155.

Palavra, F., Reis, F., Marado, D. and Sena, A. (2015). Biomarkers of Cardiometabolic Risk, Inflammation and Disease. Springer International Publishing, pages 165.

Palm NW, Rosenstein RK, Yu S, Schenten DD, Florsheim E, et al. (2013) Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. *Immunity* 39: 976–985.

Panieri, E. and Santoro, M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis*, 7(6), p.e2253.

Parham, P. (2015). The immune system. 4th ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, pages 532.

Park, H., Son, D., Lee, C., Choi, M., Lee, U., Song, H., Lee, J. and Hong, J. (2007). Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with I κ B kinase. *Biochemical Pharmacology*, 73(2), pp.237-247.

Park, J., Jeong, Y., Park, K., Cho, H., Chung, I., Min, K., Kim, M., Lee, K., Yeo, J., Park, K. and Chang, Y. (2010). Melittin suppresses PMA-induced tumor cell invasion by inhibiting NF- κ B and AP-1-dependent MMP-9 expression. *Mol Cells*, 29(2), pp.209-215.

Park, J., Lee, W., Kim, H., Han, S., Chang, Y. and Park, K. (2014). Protective effects of melittin on tumor necrosis factor- induced hepatic damage through suppression of apoptotic pathway and nuclear factor-kappa B activation. *Experimental Biology and Medicine*, 239(12), pp.1705-1714.

Pathania, R., Ramachandran, S., Elangovan, S., Padia, R., Yang, P., Cinghu, S., Veeranan-Karmegam, R., Arjunan, P., Gnana-Prakasam, J., Sadanand, F., Pei, L., Chang, C., Choi, J., Shi, H., Manicassamy, S., Prasad, P., Sharma, S., Ganapathy, V., Jothi, R. and Thangaraju, M. (2015). DNMT1 is essential for mammary and cancer stem cell maintenance and tumorigenesis. *Nature Communications*, 6, p.6910.

Pelengaris, S. and Khan, M. (2013). *The Molecular biology of cancer*. John Wiley & Sons, Inc. p.620.

Plass, C., Pfister, S., Lindroth, A., Bogatyrova, O., Claus, R. and Lichter, P. (2013). Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer. *Nat Rev Genet*, 14(11), pp.765-780.

Portal-Núñez, S., Esbrit, P., Alcaraz, M. and Largo, R. (2016). Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology*, 108, pp.1-10.

Quaye, I. (2008). Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(8), pp.735-742.

Rahman, I. and Bagchi, D. (2014). *Inflammation, advancing age and nutrition*. Academic Press Elsevier, London, pages 364.

Rangel, M., Bertolette, D., Castro, N., Klauzinska, M., Cuttitta, F. and Salomon, D. (2016). Developmental signaling pathways regulating mammary stem cells and contributing to the etiology of triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 156(2), pp.211-226.

Rappaport, S. (2010). Implications of the exposome for exposure science. *J Expos Sci Environ Epidemiol*, 21(1), pp.5-9.

Rasic, I., Radovic, S. and Aksamija, a. (2016). Relationship Between Chronic Inflammation and the Stage and Histopathological Size of Colorectal Carcinoma. *Medical Archives*, 70(2), p.104.

Rayahin, J., Buhrman, J. and Gemeinhart, R. (2014). Melittin–glutathione S-transferase fusion protein exhibits anti-inflammatory properties and minimal toxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 65, pp.112-121.

Régnier-Vigouroux, A. N. N. E., el Ayeb, M. O. H. A. M. E. D., Defendini, M. L., Granier, C., & Pierres, M. (1988). Processing by accessory cells for presentation to murine T cells of apamin, a disulfide-bonded 18 amino acid peptide. *The Journal of Immunology*, 140(4), 1069-1075.

Rendl, M. and Atlasi, Y. (2014). Current topics in developmental biology. Academic Press Elsevier, p452.

Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M. and Aggarwal, B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(11), pp.1603-1616.

Reynolds, G. and Haniffa, M. (2015). Human and Mouse Mononuclear Phagocyte Networks: A Tale of Two Species?. *Front. Immunol.*, 6(330).

Robert, L. (2013). Serum haptoglobin in clinical biochemistry: Change of a paradigm. *Pathologie Biologie*, 61(6), pp.277-279.

Roberts, S., Klotz, L. and Kehrer, J. (2015). Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology. Humana Press Incorporated, p.498.

Roy, C. N., & Andrews, N. C. (2005). Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Current opinion in hematology*, 12(2), 107-111.

Ruggeri, B., Camp, F. and Miknyoczki, S. (2014). Animal models of disease: Pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical Pharmacology*, 87(1), pp.150-161.

- Satitsri, S., Pongkorpsakol, P., Srیمانote, P., Chatsudthipong, V. and Muanprasat, C. (2016). Pathophysiological mechanisms of diarrhea caused by the *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant: an in vivo study in mice. *Virulence*, pp.00-00.
- Schewe, M., Franken, P., Sacchetti, A., Schmitt, M., Joosten, R., Böttcher, R., van Royen, M., Jeammet, L., Payré, C., Scott, P., Webb, N., Gelb, M., Cormier, R., Lambeau, G. and Fodde, R. (2016). Secreted Phospholipases A2 Are Intestinal Stem Cell Niche Factors with Distinct Roles in Homeostasis, Inflammation, and Cancer. *Cell Stem Cell*.
- Seth, P., Grant, A., Tang, J., Vinogradov, E., Wang, X., Lenkinski, R. and Sukhatme, V. (2011). On-target Inhibition of Tumor Fermentative Glycolysis as Visualized by Hyperpolarized Pyruvate. *Neoplasia*, 13(1), pp.60-71.
- Shen, H., Kreisel, D. and Goldstein, D. (2013). Processes of Sterile Inflammation. *The Journal of Immunology*, 191(6), pp.2857-2863.
- Shin, J., Jeong, Y., Cho, H., Park, K., Chung, I., Lee, I., Kwak, J., Chang, H., Kim, C., Moon, S., Kim, W., Choi, Y. and Chang, Y. (2013). Melittin Suppresses HIF-1 α /VEGF Expression through Inhibition of ERK and mTOR/p70S6K Pathway in Human Cervical Carcinoma Cells. *PLoS ONE*, 8(7), p.e69380.
- Soloveva et Peretyagin (2016). The effect of subchronic inhalations of nitric oxide on metabolic processes in blood of experimental animals. *Biomed Khim.* 2016 Feb;62(2):212-214.
- SON, D., LEE, J., LEE, Y., SONG, H., LEE, C. and HONG, J. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 115(2), pp.246-270.
- Sternlicht, M. (2006). Key stages in mammary gland development The cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Research*, 8(1), p.201.
- Stockham, S. L., & Scott, M. A. (2013). *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. John Wiley & Sons.

Storey, K. (2015). Comparative enzymology—new insights from studies of an “old” enzyme, lactate dehydrogenase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*.

Stracquadanio, G., Wang, X., Wallace, M., Grawenda, A., Zhang, P., Hewitt, J., Zeron-Medina, J., Castro-Giner, F., Tomlinson, I., Goding, C., Cygan, K., Fairbrother, W., Thomas, L., Sætrom, P., Gemignani, F., Landi, S., Schuster-Böckler, B., Bell, D. and Bond, G. (2016). The importance of p53 pathway genetics in inherited and somatic cancer genomes. *Nature Reviews Cancer*, 16(4), pp.251-265.

Suva, M., Riggi, N. and Bernstein, B. (2013). Epigenetic Reprogramming in Cancer. *Science*, 339(6127), pp.1567-1570.

Szpirer, C. (2009). Cancer Research in Rat Models. *Methods in Molecular Biology*, 597, pp.445-458.

Szymanowicz, A., Cartier, B., Couaillac, J. P., Gibaud, C., Poulin, G., Rivière, H., & Le Carrer, D. (2006, July). Proposition de commentaires interprétatifs prêts à l'emploi pour l'électrophorèse des protéines sériques. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 64, No. 4, pp. 367-380).

Trinh, T., Christensen, S., Brand, J., Cuzick, J., Czene, K., Sjölander, A., Bälter, K. and

Hall, P. (2015). Background risk of breast cancer influences the association between alcohol consumption and mammographic density. *Br J Cancer*, 113(1), pp.159-165.

Van Linthout, S., Miteva, K. and Tschöpe, C. (2014). Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovascular Research*, 102(2), pp.258-269.

Verma, S., Bahorun, T. and Kumar, A. (2012). N-methyl N-nitroso Urea induced altered DNA structure initiate hepatocarcinogenesis. *Preventive Medicine*, 54, pp.S130-S136.

Vohr, H. (2016). *Encyclopedia of Immunotoxicology*. Springer-Reference, Berlin, pages 977.

Volmering, S., Block, H., Boras, M., Lowell, C. and Zarbock, A. (2016). The Neutrophil Btk Signalosome Regulates Integrin Activation during Sterile Inflammation. *Immunity*, 44(1), pp.73-87.

Wahed, A., & Dasgupta, A. (2015). *Hematology and Coagulation: A Comprehensive Review for Board Preparation, Certification and Clinical Practice*. Elsevier.

Waters E, Wang JH, Redmond HP, Wu QD, Kay E, et al. (2001) Role of taurine in preventing acetaminophen-induced hepatic injury in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G1274–1279.

Whyte IM, Francis B, Dawson AH (2007) Safety and efficacy of intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen overdose: analysis of the Hunter Area Toxicology Service (HATS) database. *Curr Med Res Opin* 23: 2359–2368

Wright LC, May GL, Mackinnon WB, Gregory P, Holmes KT, Dyne M, Sullivan D, Mountford CE (1991). Tumour evolution in rats monitored by changes to serum and lipoproteins. *Invasion Metastasis*. 1991;11(6):332-47
Laskin DL, Gardner CR, Price VF, Jollow DJ (1995) Modulation of macrophage functioning abrogates the acute hepatotoxicity of acetaminophen. *Hepatology* 21: 1045–1050.

Wright LC, May GL, Mackinnon WB, Gregory P, Holmes KT, Dyne M, Sullivan D, Mountford CE (1991). Tumour evolution in rats monitored by changes to serum and lipoproteins. *Invasion Metastasis*. 1991;11(6):332-47

Yamazaki, H., Oda, Y., Funae, Y., Imaoka, S., Inui, Y., Guengerich, F. and Shimada, T. (1992). Participation of rat liver cytochrome P450 2E1 in the activation of N -nitrosodimethylamine and N -nitrosodiethylamine to products genotoxic in an acetyltransferase–overexpressing *Salmonella typhimurium* strain (NM2009). *Carcinogenesis*, 13(6), pp.979-985.

Yang, F., Liu, X., Quinones, M., Melby, P., Ghio, A. and Haile, D. (2002). Regulation of Reticuloendothelial Iron Transporter MTP1 (Slc11a3) by Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp.39786-39791.

Yang, F., Liu, X., Quinones, M., Melby, P., Ghio, A. and Haile, D. (2002). Regulation of Reticuloendothelial Iron Transporter MTP1 (Slc11a3) by Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(42), pp.39786-39791.

Yart, L., Lollivier, V., Marnet, P. and Dessauge, F. (2013). Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants. *Animal*, 8(01), pp.72-85.

Zhang, S., Melzer, M., Sen, S., Çelebi-Ölçüm, N. and Warren, T. (2016). A motif for reversible nitric oxide interactions in metalloenzymes. *Nature Chemistry*.

Zheng, J., Lee, H. L., Ham, Y. W., Song, H. S., Song, M. J., & Hong, J. T. (2015). Anti-cancer effect of bee venom on colon cancer cell growth by activation of death receptors and inhibition of nuclear factor kappa B. *Oncotarget*, 6(42), 44437.

ZHU, W., WANG, B. and ZHU, X. (2002). Isolation and purification of BV α -2H from bee venom and analysis of its biological action. *Chinese Science Bulletin*, 47(11), p.910.

Zolfagharian, H., Mohajeri, M. and Babaie, M. (2015). Honey Bee Venom (*Apis mellifera*) Contains Anticoagulation Factors and Increases the Blood-clotting Time. *Journal of Pharmacopuncture*, 18(4), pp.7-11.

Zon, L., Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S., Moynihan, J., Paw, B., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., Law, T., Brugnara, C., Lux, S., Pinkus, G., Pinkus, J., Kingsley, P., Palis, J., Fleming, M. and Andrews, N. (2000). *Nature*, 403(6771), pp.776-781.

Abstrat :

The aim of this study is to investigate the antitumor effect of venom bee on a chemical mammary gland induced tumor model in rats. The study was realized on 24 females rats, the animals were divided into four groups, the first group served as a control group, the second group was treated by carcinogen, the third one receive a venom bee and the last one was treated with combination of carcinogen followed by venom. The effect of different treatment was assessed on serum proteins profile, NO levels, and enzyme activity of TGP, TGO, LDH and catalase. Macroscopic observations show that 83,33 % of rats primed by the carcinogen were developed tumor, whereas any tumor was detected in rats treated by venom or carcinogen followed by venom bee. Results from enzymatic assays show that the venom bee decreases TGP, TGO, LDH and serum proteins alpha 1 level. At the same time, it increases catalase activity, NO, and serum protein alpha 2 and beta 1 levels. At long term, application of venom bee increases TGP and LDH activity as markers of tissues alteration. To conclude, venom bee has an antitumor and anti inflammatory effect.

الملخص:

الهدف: يتمثل الهدف الرئيسي من هذه الدراسة في تجربة فعالية سم النحل كمضاد للأورام في نموذج حيواني لسرطان الثدي احدث كيميائيا عند الجرذان. **المواد و طرق العمل:** تمت هذه الدراسة على 24 جرّد أنثى قسمت الى 4 مجاميع: مجموعة الشاهد, السرطان, مجموعة سم النحل و مجموعة السرطان و سم النحل. تمت تجرب تأثير مختلف العلاجات على كمية البروتينات الدموية , كمية أكسيد النيتروجين , على نشاط بعض الإنزيمات TGP,TGO, LDH, Catalase. الملاحظات العينية تظهر ان المادة المسرطنة احدثت أورام الغدد الثديية بنسبة 83.33% في جرذان المجموعة سرطان. بحيث كان أول جس لورم عند 53 يوم. لكن لم يتم ملا حظة أية اورام عند المجموعة المعالجة بالمسرطن ثم بسم النحل. نتائج العيارات تظهر أن سم النحل في فترة قصيرة يخفض في نشاط الإنزيمات TGP,TGO, LDH و في كمية بروتينات ألفا 1. في نفس الوقت, سم النحل يرفع نشاط أنزيم Catalase, كمية أكسيد النيتروجين, البروتينات ألفا 2 و بيتا 1. لكن مع طول المدة, سم النحل يرفع من النشاط الأنزيمي ل TGP و LDH. كخلاصة, سم النحل يحوز على تأثير مضاد للسرطان و للإلتهاب.

Evaluation de l'effet anti-carcinogène du venin d'abeille
Etude de quelques marqueurs d'inflammation, de lésions hépatiques et du stress oxydatif

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en :

Immunologie moléculaire et cellulaire ; Oncologie

L'objectif de cette étude est de tester l'effet anti-tumoral du venin d'abeille sur modèle de tumeur chimique de glandes mammaires induites chez les rats. L'étude a été réalisée sur un groupe de 24 rattes réparties en 4 lots : un lot témoins, un lot traité avec le carcinogène, un lot traité avec le venin d'abeille et le dernier est traité avec le carcinogène suivi du venin. L'effet des différents traitements a été testé sur le profil des protéines sériques, sur le taux du NO et sur l'activité de quelques enzymes TGP, TGO, LDH et catalase. Les observations macroscopiques indiquent que le carcinogène a induit l'apparition des tumeurs mammaires chez 83.33% des rattes traitées par le carcinogène, l'apparition de la première tumeur palpable était après une période de 53 jours. Par contre aucune tumeur n'a été détectée dans le lot traité par le carcinogène suivi du venin. Les résultats des dosages enzymatiques ont montré que le venin d'abeille diminue, au début du traitement, l'activité enzymatique des TGO, TGP, LDH et le taux des protéines alpha 1. En même temps, il augmente l'activité de la catalase, le taux du NO, le taux des protéines alpha 2 et beta 1. A long terme, l'application du venin d'abeille, augmente l'activité enzymatique des TGP et du LDH. En conclusion, le venin d'abeille possède un effet anti-tumoral et anti-inflammatoire.

Mots clés : Venin d'abeille, carcinogène, protéines sériques, TGO, TGP, LDH, Stress oxydant.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie et physiologie cellulaire et moléculaire, animalerie Laboratoire d'immunologie, laboratoire d'analyse médicale Ibn Sina

Jury d'évaluation :

Président du jury : *NAIMI Dalila* (Prof – ENSB Constantine),

Rapporteur : *EL OUAR Ibtissem* (MCA - UFM Constantine),

Examineur : *AGGOUN Cherifa* (MCB - UFM Constantine).

Date de soutenance : 23/06/2016

