



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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 والحياة

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 protecteur d'un produit de la ruche, la gelée royale sur le Stress oxydatif et l'inflammation induit par le formaldéhyde chez le rat

Présenté et soutenu par : *MAHMOUD ALI ISMAIL*

Le : 29/06/2016

FENGHOUR MOULOUD

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : *EL OUAR. I* (MCA - UFM Constantine).

Rapporteur : *RAHMOUNE .H* (MAA - UFM Constantine).

Examineurs : *MESSAOUDI. S* (MAA- UFM Constantine).

Année universitaire
2015 - 2016

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah Le Tout Puissant pour nous avoir accordé la santé, l'énergie et l'opiniâtreté nécessaire à la réalisation de ce modeste travail.

Nous remercions très singulièrement notre encadreur Mme RAHMOUNE H. pour avoir accepté diriger ce travail, pour ses conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'elle nous a témoigné tout au long de cette étude. Tout au long de la réalisation de ce mémoire, nous avons pu apprécier son enthousiasme, son savoir-faire, sa pédagogie, son sens de communication. Merci pour tous ces bons moments.

Nous adressons également nos remerciements à :

- Melle EL OUAR I. Maître de conférences à l'UFM-Constantine pour l'honneur qu'elle nous fait de présider ce jury.
- Mr MESSAOUDI S. Maître assistant à l'UFM-Constantine d'avoir accepté d'apporter son jugement à ce travail.

Nos plus sincères gratitude vont vers ce beau pays, l'ALGERIE, qui nous a accueillis et suivi tout au long de notre parcours.

Nous saisissons cette occasion pour exprimer nos profonds respects et notre reconnaissance à l'ensemble du corps enseignant de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie plus particulièrement celui de la spécialité Immunologie, pour avoir participé à notre formation graduée.

Merci à Mr KHELIFI D du laboratoire de cytogénétique et son équipe, à Mme Djeghar Radia qui nous ont beaucoup aidés lors de notre travail.

Merci à Mr CHEBEL Brahim EL Khalil

Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à nos parents, nos amis, nos camarades ainsi que tous ceux qui nous ont toujours soutenus et encouragés au cours de la réalisation de ce mémoire.

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents ma mère et mon père

Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur

Encouragement

A mes sœurs Radia, Fatima, Faiza, Farida

A mes frères Gharib, Imrane

A L'enseignante Melle « Mehati Chahinaz »

*A mes amis Samir, A. raouf, Ammar, Hichame Amin, Hassen,
Mohamed, Chams eddine Fateh Amir*

Sans oublier mon binôme Mahmoud ALi Ismail.

FNGHOUR MOULLOUD

Dédicace

Je ne peux adresser les prémices de cette dédicace qu'à mes parents, premiers piliers de mon éducation, vous m'avez soutenu depuis mes débuts jusqu'à maintenant par vos bénédictions.

Aucun mot, aussi expressif qu'il soit, ne saurait remercier sa juste valeur.

*Puisse Allah vous garder longtemps auprès de nous et vous bénir
infiniment*

A mes frères Mahamat Ali Ismail et Mahamat Sied Mahamat A pour leur encouragement, leur sacrifice qui m'ont permis d'aller de l'avant.

A toute la communauté Tchadienne à Constantine (Issa, Abdel Salam, Bichara, Abdraman, Abdelbari, Mahamat Adji, Annour et Mahamat Amine) et en Algérie.

A toute la communauté des étudiants étrangers à Constantine

A tous mes amis algériens. En particulier Mokhtari mohamed badreddine Merci à vous.

Enfin à tous ceux ou celles que j'ai eu l'immense plaisir de côtoyer. Merci à vous tous

A mes Parents....

Mahmoud Ali Ismail

TABLE DES MATIERS
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : Le stress oxydatif.....	3
1. Définition.....	3
2. Les radicaux libres dans la biologie	3
3. Les principales espèces réactives de l’oxygène	3
4. L’origine des radicaux libres.....	8
4.1. La production endogène	9
4.2. La production exogène	12
5. Les conséquences biologiques du stress oxydant	12
5.1. Le dommage oxydatif à l’ADN	13
5.2. Le dommage oxydatif aux lipides.....	13
5.3. Le dommage oxydatif aux protéines	13
5.4. Oxydation des lipoprotéines	14
5.5. Oxydation des glucides	14
6. Les systèmes de défenses antioxydants	14
6.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	14
6.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques.....	17
Chapitre II : Le Formaldéhyde	23
1. Informations générales sur le formaldéhyde.....	23
2. Propriétés physico-chimiques du formaldéhyde.....	23
2.1 Propriétés physiques	23
2.2. Propriétés chimiques	23
3. Les voies d’exposition	25
4. Métabolisme et élimination	25
5. Propriétés irritantes du formaldéhyde	26
5.1. Irritation et inflammation neurogène.....	27
5.2. Irritation et activation mastocytaire.....	27
5.3. Irritation et épithélium respiratoire.....	27
6. Les effets toxicologiques	28
6.1. Effet chronique non cancérigène.....	29
6.2. Effet cancérigène	29
7. Activités pro-inflammatoires du formaldéhyde	30
7.1. Afflux des cellules inflammatoires	30
7.2. Stress oxydant.....	30

Chapitre III : La Gelée Royale	32
1. Généralités	32
2. Propriétés physiques de la gelée royale	32
3. Conservation de la gelée royale	33
4. Composition chimique	33
5. Propriétés thérapeutiques de la gelée royale	35
5.1. Activité antioxydante	35
5.2. Action anti-inflammatoire	35
5.3. Action immunostimulante	36
5.4. Propriétés cicatrisantes	36
5.5. Action antitumorale.....	37
5.6. Effet antibiotique	37
6.Effets indésirables	39
Partie expérimentale	40
Chapitre : Matériels et Méthodes	40
1.Matériel biologique et conditions d'élevage	40
1.1.Traitement des rats.....	40
1.2. Prélèvement du sang et des organes	41
2.Méthodes	41
2.1.Mesure de l'activité des transaminases plasmatiques.....	41
2.2. Evaluation de certains paramètres du stress oxydant	42
2.2.1. Préparation de l'homogénat.....	42
2.2.2. Dosage du glutathion réduit.....	42
2.2.3. Dosage des protéines.....	43
2.2.4. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT)	44
2.2.3.Dosage de malondialdéhyde (MDA).....	45
2.3.Etude histologique	46
2.4.Analyse statistique des résultats.....	49
Résultats et Discussion	50
1. Effet du traitement sur la croissance corporelle	50
2. Influence du traitement sur la variation de quelques paramètres du stress oxydant	50
2.1 Le dosage du foie	50
2.2. Le dosage du poumon	53
3. Influence du traitement sur l'activité des transaminases (TGP/ALAT)	55
4. Effet de different traitement sur la structure histologique du foie	55
Discussion	58
5. Conclusion generale et Perspectives	63

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Différentes espèces réactives de l'oxygène et leur formation en cascade.	05
2	L'Origine des radicaux libres	08
3	Principales sources endogènes des radicaux libres	09
4	La chaîne respiratoire.	10
5	Production des ROS par le phagocyte	11
6	Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR	13
7	Effets biologiques des polyphénols	20
8	Pyramide des systèmes de défenses antioxydants	22
9	Métabolisme du formaldéhyde chez les mammifères	26
10	Cellule royale contenant une larve de reine baignant dans la gelée royale	34
11	La gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.	44
12	Coubre standard pour le calcul de MDA.	46
13	Variation du poids corporel en (g) des rats traités et témoins après 14 jours du traitement	50
14	Variation de la teneur cellulaire en glutathion (nmol/mg prot) dans le foie chez les rats témoins et traités après 14 jours du traitement.	51
15	Variation de l'activité enzymatique de la catalase ($\mu\text{mol/mg prot}$) dans le foie chez les rats témoins et traités après 14 jours du traitement.	52
16	Variation du taux de malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans le foie chez les rats témoins et traités après 14 jours de traitement.	53
17	Variation de l'activité enzymatique du catalase ($\mu\text{mol/mg prot}$) dans les poumons chez les rats témoins et traités après 14 jours du traitement.	54
18	Variation du taux malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans les poumons chez les rats témoins et traités après 14 jours de traitement.	54
19	Variation de l'activité enzymatique de la TGP (UI/L) chez les rats témoins et traités après 14 jours de traitement	55
20	Coupe histologique du foie des rats témoins	56
21	Coupe histologique du foie des rats traités par FA	56
22	Coupe histologique du foie des rats traités par combinaison (GR150mg /kg+ FA)	56
23	Coupe histologique du foie des rats traités par combinaison (GR200mg /kg+ FA)	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Principales espèces réactives dans les systèmes biologiques	04
2	Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées	17
3	Propriété physico-chimique des formaldéhydes	24
4	Composition moyenne de la gelée royale	34

ABREVIATIONS

10HAD: Acide 10-hydroxy-2-décanoïque.

AGE: Advanced Glycosylation End Products.

ALAT: Alanine-aminotransférase.

ATP: Adenosine triphosphate.

BSA: Serum albumin bovine.

CAT: Catalase.

CGRP: Calcitonin gene-related peptide.

CH₂O: Formaldéhyde.

COV: Composés organiques volatiles

Cu: Cuivre.

Cu-SOD : Isoenzyme superoxyde dismutase à cuivre.

DNTB : Acide 5,5' dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou réactif d'Ellman.

EOA : Espèces oxygénées activées.

ERN : Espèces réactives d'azote.

ERO : Espèces réactives de l'oxygène.

FA : Formaldéhyde.

FDH : Formaldéhyde déshydrogénase.

Fe : Fer.

Fe-SOD : Isoenzyme superoxyde dismutase à ferreux.

GPX : Glutathion peroxydase.

GR : Gelée royale.

GS-CH₂OH : Hydroxyméthylglutathion.

G-S-CHO : S-formylglutathion.

GSH : Glutathion réduit.

GSSG : Glutathion oxydé.

H₂O₂ : Peroxydase d'hydrogène.

HCOO⁻ : Ion formiate.

HO : Hème oxygénase.

HOCl : Acide hypochloreux.

LDL : Low density lipoproteins.

LPS : lipopolysaccharide.

MDA : Malondialdéhyde.

Mn : Manganèse.

Mn-SOD : Isoenzyme superoxyde dismutase à manganèse.

MPO : Myéloperoxydase.

MRJP: Major royal jelly proteins

NO : Monoxyde d'azote.

NO₂[°]: Nitrique dioxyde.

NOS : Oxyde nitrite syntase.

O₂[°]-: Radicale superoxyde (anion superoxyde).

OH : Radical hydroxyle.

ONOO⁻ : Peroxynitrite.

RO : Radicale alkoxyde.

ROO : Radicale pyroxydes.

ROOH : Radicale hydro peroxydes.

SBM : syndrome des bâtiments malsains.

Se : Sélénium.

SOD : Superoxyde dismutase.

TBA : "2-Thiobarbituric acid": L'acide thiobarbiturique.

TCA : Trichloroacétique.

THF : Tétrahydrofolate.

TNF- α : Tumor Necrosis Factor.

TRx : Thiorédoxine

TRxR : Thiorédoxine réductase

VEGF: Vascular endothelial growth factor.

Zn : Zinc.

Introduction

Introduction

Aujourd'hui, les individus passent de 70 à 90 % de leur temps dans des espaces clos et en particulier dans l'habitat dont l'air intérieur n'est pas à l'abri de la pollution. L'utilisation régulière dans nos maisons de multiples produits synthétiques, que ce soit pour la construction, la rénovation, le nettoyage ou le bricolage, provoque la libération de composés chimiques dans l'air.

La plupart de ces produits chimiques appartiennent à la grande famille des composés organiques volatils (COV). Les COV sont souvent plus nombreux et plus concentrés à l'intérieur qu'à l'extérieur compte tenu de la multiplicité des sources intérieures. Le formaldéhyde est un polluant majeur de l'air intérieur en raison de ses nombreuses sources d'émission et de sa toxicité [1].

Bien que très largement utilisé dans l'industrie et au niveau médical comme désinfectant, le formaldéhyde (FA) est un polluant environnemental très répandu, retrouvé dans la fumée de cigarettes, les gaz d'échappements, les résines industrielles, et les dérivés du bois (agglomérés...). Au niveau cellulaire, le FA est un composé extrêmement réactif qui réagit avec les fonctions amines et amides pour former des ponts méthylènes conduisant à des adduits covalents avec les protéines et l'ADN. Il peut également conduire à la diminution de la concentration en glutathion réduit [2,3].

En effet, certaines études ont mis en évidence le lien entre une exposition chronique au FA et les conséquences pathologiques en termes de cancers, d'effets tératogènes et de maladies neurodégénératives et vasculaires [4,5,6]. Cependant la toxicité du FA a été largement sous-estimée parce qu'il est rapidement métabolisé et éliminé de l'organisme.

De plus, le formaldéhyde a été reclassé cancérigène pour l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 2004 (auparavant il n'était que « cancérogène probable »). Les principaux cancers étudiés chez les sujets exposés au formaldéhyde par inhalation concernent les voies respiratoires supérieures et la cavité buccale (nasopharynx) [7].

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du "stress oxydatif", c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines [8].

Pour échapper aux conséquences du stress oxydant, il est nécessaire de rétablir l'équilibre oxydant / antioxydant afin de préserver les performances physiologiques de l'organisme. Les antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus d'un intérêt certain dans la conservation des denrées comestibles, ils pourraient s'avérer utiles dans la prophylaxie et le traitement des maladies dans lesquels le stress oxydant est incriminé.

La ruche est une vraie richesse à revaloriser sur les plans nutritionnel, cosmétique et surtout thérapeutique. Ses produits sont prescrits aux affections digestives, respiratoires, cardiovasculaires, rhumatismales, dermatologiques, neurologiques parmi tant d'autres. Elle est considérée comme une pharmacie complète de par les vertus thérapeutiques de la propolis, du pollen, de la cire, de la gelée royale, du venin et du miel riche en glucides, en acides organiques et lactones, en substances minérales et oligo-éléments, vitamines, enzymes, facteurs antibiotiques.

De plus en plus pratiquée dans le monde, l'apithérapie ou l'usage médical de ces produits de la ruche fait l'objet de plusieurs études scientifiques mais qui restent toutefois encore trop peu nombreuses ou incomplètes [10].

Récemment, les utilisations de la gelée royale se sont développées grâce à de nombreuses études scientifiques qui leur ont redonnés, tout comme aux autres produits de la ruche, la juste place que les anciens leur avaient attribuée. De plus, les thérapeutiques dites naturelles suscitent un regain d'intérêt pour ces produits ; c'est ainsi que l'apithérapie, définie comme étant « la médecine par les abeilles », a connu un essor considérable ces dernières années.

Après avoir présenté dans une synthèse bibliographique quelques connaissances sur le stress oxydatif, les systèmes de défenses enzymatiques et non enzymatiques, les dégâts et les biomarqueurs du stress oxydant ; Le formaldéhyde et son implication dans le stress oxydatif, et ses propriétés irritantes ; La Gelée royale et ses propriétés thérapeutiques, antioxydantes et anti-inflammatoires.

Nous allons ensuite, étudier l'effet pro oxydant et inflammatoire induit par le formaldéhyde d'une part, et d'évaluer l'effet protecteur de la gelée royale d'autre part. Les effets des différents traitements ont été analysés par :

- Évaluation de quelques paramètres biochimiques (ALAT) ;
- Évaluation du statut oxydant par le dosage de : GSH, CAT et MDA ;
- Et étude des coupes histologiques.

CHAPITRE I

Le Stress Oxydatif

Chapitre I : Le stress oxydatif

1. Définition

Le stress oxydatif, dénommé également stress oxydant, résulte d'un déséquilibre de la balance « pro-oxydants/antioxydants » en faveur des oxydants [11] ce qui se traduit par des dommages oxydatifs de l'ensemble des constituants cellulaires : les lipides avec perturbations des membranes cellulaires, les protéines avec l'altération des récepteurs et des enzymes, les acides nucléiques avec un risque de mutation et de cancérisation. Un stress oxydatif peut donc se développer suite à une surproduction des oxydants comme les espèces activées de l'oxygène et/ou à une diminution des systèmes de défense antioxydants [12].

Il semble donc que le stress oxydatif soit étroitement lié à l'inflammation. Peut-on dire que l'un est la cause ou la conséquence de l'autre ? La réponse à cette question n'est pas simple car les causes du déclenchement du processus inflammatoire sont multiples et, selon le signal initial, la suite des événements conduisant à un état inflammatoire diffère.

2. Les radicaux libres dans la biologie

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule très réactive contenant un ou plusieurs électrons non pairs dans ses orbitales. Ce déséquilibre n'est que transitoire et il est comblé soit par l'acceptation d'un autre électron soit par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule. Ces espèces radicalaires très instables et très réactives sont produites d'une manière continue, dans de nombreux phénomènes biologiques. Les radicaux libres sont indispensables à la vie parce qu'ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la transduction de signaux cellulaires, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à la destruction par apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, à la différenciation cellulaire, à la régulation de la dilatation capillaire, au fonctionnement de certains neurones. Mais de façon générale, les radicaux libres contribuent au stress oxydatif par une série de réactions en chaîne. Leur durée de vie est très courte (10⁻⁴s) et leur réactivité réside dans la recherche d'un électron afin de ré-apparier leur électron célibataire [13].

3. Les principales espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres sont divisés en deux groupes, les espèces radicalaires (l'anion superoxyde, le radical hydroxyle...) et les espèces non radicalaires (l'oxygène singlet, le peroxyde d'hydrogène, le peroxydinitrite...) [14]. (Tableau 1)

Tableau 1 : Principales espèces réactives dans les systèmes biologiques [14].

Les radicaux libres				
Espèces radicalaires			Espèces non-radicalaires	
Espèce réactive d'oxygène		Espèce réactive azote	Espèce non réactive d'oxygène	Espèce non réactive d'azote
O ₂ ^{-·} : superoxyde	Anion	NO [·] : Monoxide d'azote	ONOO [·] : peroxynitrite	ONOO [·] : peroxynitrite
HO ₂ [·] : hydroperoxyde	Radical	NO ₂ [·] : Dioxide d'azote	OONO [·] : peroxynitrate	OONO [·] : peroxynitrate
OH [·] : hydroxyle	Radicale	N ₃ [·] : Nitrate	H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène	ONOOH : Acide peroxynitreux
RO [·] : alkoxyde	Radical		O ₂ : Oxygène singulet	ROONO : Alkyl peroxynitrate
ROO [·] : alkoperoxyde	Radicale		O ₃ : ozone	HNO ₂ : Acide nitreux
ROOH [·] : hydroxyperoxyde	Radicale		HOCl : Acide hypochloreux	NO ⁺ : Cation
			ROOH : Peroxyde organiques	NO ⁻ : Anion nitrosyl

Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical, l'appellation **(ROS)** n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène, ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants l'anion radicalaire superoxyde (O₂^{-·}), radical hydroxyle (OH[·]), monoxyde d'azote(NO[·]), et aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le peroxynitrite (ONOO⁻)[15].

3.1. L'oxygène singulet

Forme excitée de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilée à un radical libre en raison de sa forte réactivité. Le radical superoxyde $O_2^{\circ-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle OH° sont encore appelés espèce réactive de l'oxygène (ROS) car, ces espèces sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance. Toutefois, il existe d'autres ROS tels que les radicaux peroxydes ROO° , hydro peroxydes $ROOH^\circ$, ainsi que les radicaux alkoxyde RO° , et des espèces réactives d'azote (ERN) tels que le NO , produit par le NO synthétase [16]. L'oxygène moléculaire peut être produit par plusieurs réactions biochimiques d'oxydation incluant la peroxydase et la lipoxygénase, par la réaction entre divers EOR ou en présence de la lumière, d'oxygène et de photosensibilisateur [17] (Figure 1).

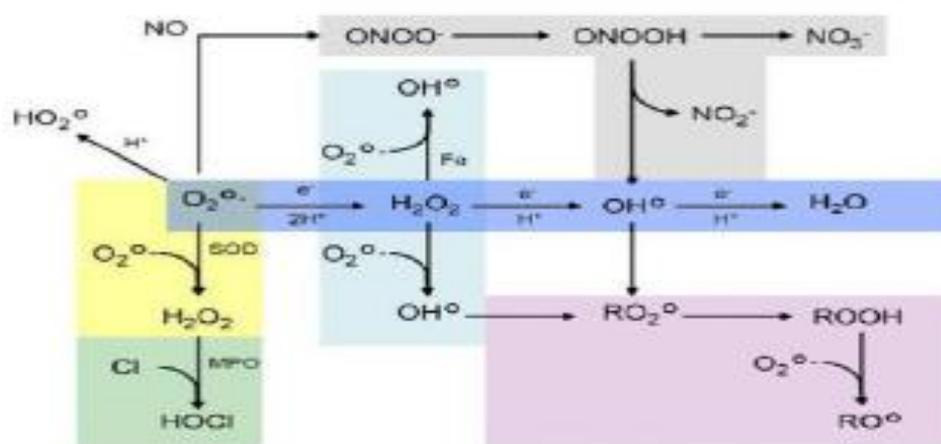


Figure 1 : Différentes espèces réactifs de l'oxygène et leur formation en cascade [18].

3.2. L'anion superoxyde

L'anion superoxyde est l'espèce la plus couramment générée par la cellule, par réduction d'une molécule d'oxygène. Cette réaction semble surtout catalysée par des NADPH oxydases membranaires. L' $O_2^{\circ-}$ peut également être formé dans certains organites cellulaires tels que les peroxysomes via la conversion de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique, catalysée par la xanthine oxydase et les mitochondries où 2% à 5% d'oxygène consommé est transformé en radicaux superoxydes [19].

L'oxygène moléculaire possède deux électrons non appariés, les spins de ses deux électrons sont parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande. Dans l'organisme, une partie de l'oxygène moléculaire peut capter d'une manière univalente un électron conduisant à la formation du radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) [18].

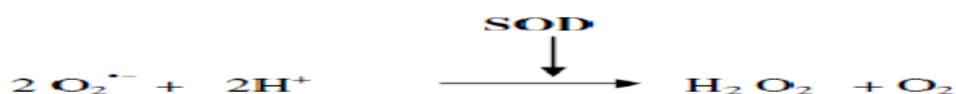
Le cytochrome oxydase qui se trouve dans la mitochondrie peut également catalyser une telle réaction selon l'équation suivante :



La chaîne de transport d'électrons mitochondrial est la source principale de radical superoxyde au niveau du complexe I (NADH /ubiquinone oxydoréductase). Les mitochondries utilisent environ 0 à 5 % de l'oxygène moléculaire, qui est partiellement réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire, il y a d'autres chaînes de transport d'électrons (microsomes) contribuent pareillement à la production du ($O_2^{\cdot -}$) dans les cellules en aérobiose [21].

3.3. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène se forme par la dismutation du radical superoxyde, catalysée par le superoxyde dismutase (SOD) selon la réaction suivante.



Il existe d'autres enzymes responsables à la production d' H_2O_2 comme par exemple les oxydases qui se présentent spécifiquement dans les peroxysomes. Mais certaines de ces enzymes peuvent catalyser la réduction de l'oxygène moléculaire produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène sans formation du radical superoxyde comme par exemple la glycoxylate oxydase [22].

3.4. Le radical hydroxyle

Le plus important des produits est le radical hydroxyle (OH°). C'est une espèce oxygénée très réactive qui provient de la coexistence de l'anion superoxyde et de peroxyde

d'hydrogène. Comme on va voir dans la réaction suivante, le peroxyde d'hydrogène réagit avec le fer (forme ferreux) et produit du fer oxydé (forme ferrique) et le radical hydroxyle.

C'est la réaction de Fenton.



Ensuite le fer ferrique est réduit en fer ferreux par l'anion superoxyde principalement.



L'ensemble de ces réactions forme la réaction d'Haber Weiss. [22]



3.5. Le monoxyde d'azote

L'oxyde azotique NO^\ominus est principalement produit par un système enzymatique, la NO synthase, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH.



3.6. Nitrique dioxyde NO_2^\cdot

Formé à partir de la réaction du radical peroxyde avec NO. Le nitrique dioxyde est un puissant déclencheur du lipide peroxydation par sa capacité d'arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison au niveau des acides gras polyinsaturés. [23].

3.7. Le peroxyde nitrite

Le monoxyde d'azote par concomitance avec un ion superoxyde va entraîner la formation de peroxyde nitrite (ONOO^-) qui est hautement cytotoxique. Cette réaction est surtout retrouvée au niveau des vaisseaux sanguins. [23].



3.8. L'acide hypochloreux

L'acide hypochloreux (HOCl) Comme le peroxyde d'hydrogène, ne rentre pas dans la définition stricte du radical. Cependant, au cours de l'inflammation, la métabolisation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux par la myéloperoxydase (MPO) est élevée et l'acide hypochloreux est un agent chlorant et oxydant fort.



L'acide hypochloreux est considéré comme 100 à 1000 fois plus toxique que le radical superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène et a des cibles bien marquées : inactivation enzymatique, oxydation des groupements thiols de la membrane plasmique, diminution des propriétés d'adhésion de certains composés de la matrice extracellulaire [24].

4. L'origine des radicaux libres

Dérives instable et toxique de l'oxygène qui réagissent et dégradent l'ADN, les lipides, les protéines. Augmente par situation : Stress, tabac, alcoolisme, surpoids, exercice physique mal géréetc. [20].

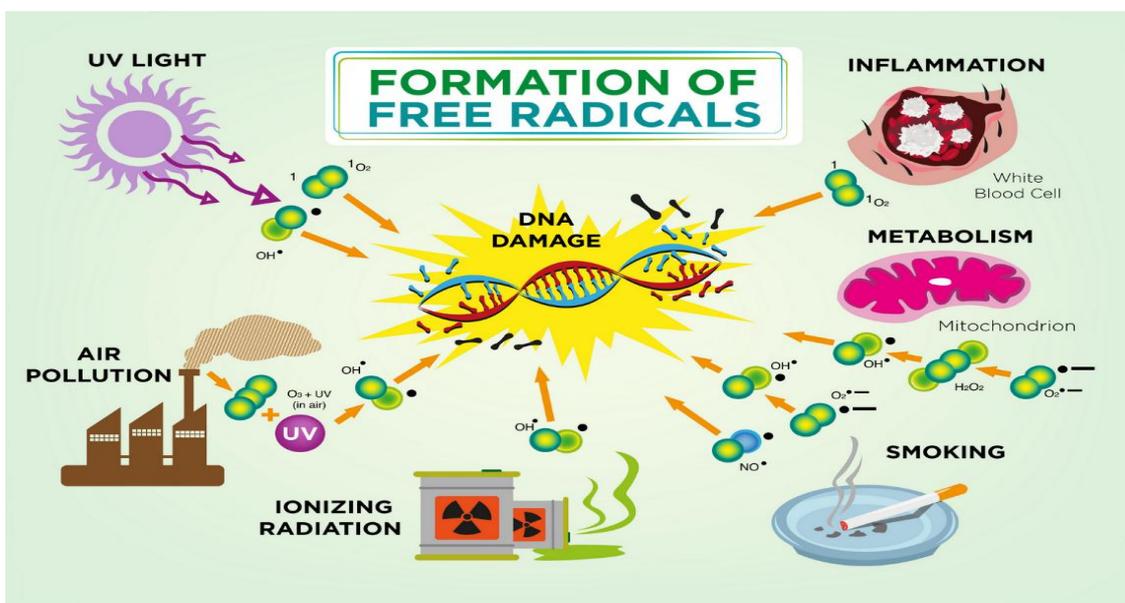


Figure 2 : L'Origine des radicaux libres [40]

Les facteurs responsables de l'augmentation de la production de radicaux libres par l'organisme sont appelés facteurs oxydants. Ils se divisent en deux facteurs endogènes et exogènes (**Figure 2**)

4.1. La production endogène

La formation endogène de radicaux libres s'effectue au niveau de diverses voies

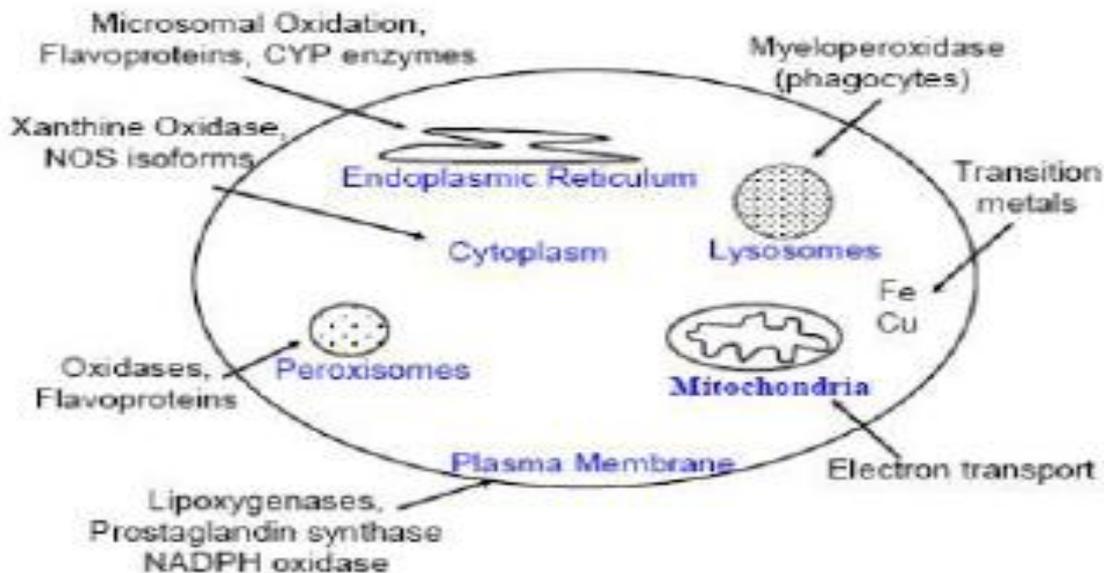


Figure 3 : Principales sources endogène des radicaux libres.

4.1.1. La chaîne respiratoire

La vie en aérobiose se traduit au niveau cellulaire par l'existence d'une chaîne respiratoire mitochondriale nécessaire au stockage de l'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). La chaîne respiratoire est une succession de phénomènes d'oxydoréduction au cours desquels il existe des transferts d'électrons. Ces électrons peuvent réagir avec une molécule avoisinante pour aboutir à la formation d'un radical libre. A l'état normal, l'oxygène respiré subit une réduction tétravalente, conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase, le récepteur terminal d'électrons présent dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située de la membrane interne mitochondriale.



Environ de 2% de l'oxygène subit une réduction univalente conduisant à la formation du radicale superoxyde au niveau de l'ubiquinone (ou coenzyme Q) [24].

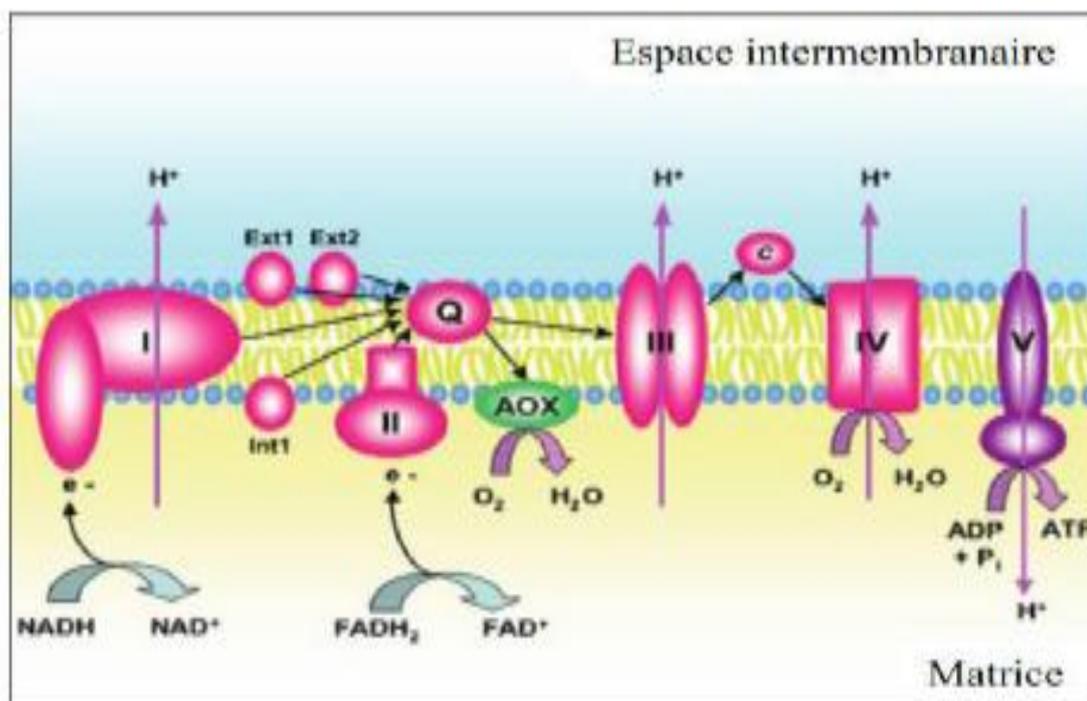


Figure 4 : La chaîne respiratoire [14].

4.1.2. La réaction immunitaire

Les radicaux libres jouent un rôle essentiel dans le bon déroulement de la réaction immunitaire. La phagocytose des bactéries et parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une production d'espèces réactives de l'oxygène (Figure 5) si brutale et intense qu'elle est connue, sous le nom de « burst oxydatif », c'est-à-dire explosion respiratoire. Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase et l'action des superoxydes dismutase (SOD) et NOS (oxyde nitrite syntase) aboutissent à un mélange très corrosif de O_2° , H_2O_2 , HO° , ONOOH , avec en plus dans le polynucléaire HOCl et O_2° . Ce mélange réactionnel, que l'Homme utilise comme désinfectant l'eau de javel ou l'eau oxygénée, détruit par oxydation l'ensemble des composants bactériens [25].

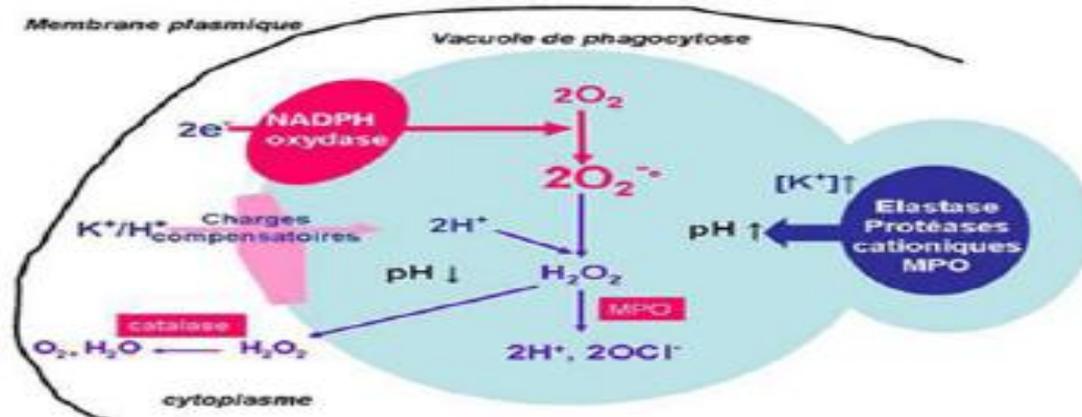


Figure 5 : Production des ROS par le phagocyte [26].

4.1.3. La communication cellulaire

Si la production des ROS est relativement modérée, ils peuvent jouer un rôle de messenger intra et/ou extracellulaire. Ils sont ainsi impliqués dans les phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée), dans la prolifération des cellules musculaires lisses (cellules vasculaires), dans l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, ou bien encore dans l'agrégation plaquettaire, et permettent aussi l'expression de gènes de défense [27]. La vasodilatation est un exemple de phénomène biologique issu de la signalisation à l'aide du NO, Des messagers cellulaires, dépendants des forces hémodynamiques du flux sanguin, vont permettre d'activer la NOS endothéliale (qui est exprimée de manière constitutive dans l'endothélium, l'épithélium et les cardiomyocytes [28].

4.1.4. Autres sources d'origine endogène

- ✓ Le fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire.
- ✓ La fécondation de l'ovule.
- ✓ La régulation des gènes [29].
- ✓ Le règlement de la croissance des cellules et à la signalisation intracellulaire.
- ✓ Libération de fer libre à partir des protéines chélatrices ou d'une oxydation de certaines molécules.
- ✓ La cyclo-oxygénase et les lipoxygénases, ainsi que les enzymes du réticulum endoplasmique (cytochrome P450) [30].

4.2. La production exogène

Les agents exogènes générateurs des ROS continue d'attaquer toujours l'organisme humain est obéissante à leur agression [29].

4.2.1. Les rayonnements UV

Les radiations UV provoquent particulièrement des démâtements au niveau de l'ADN les radiations ionisantes induisent la synthèse de radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que : ($O_2 \cdot^-$), (O), (O_2) et les molécules génératrices des radicaux libres par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants [31].

4.2.2. Le monoxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote (NO₂)

Sont formés par les Nitric Oxyde Synthases (NOS). Ils sont des toxiques présents dans notre environnement comme par exemple : suie, goudron, tabac, polluants industriels. En plus, sont également responsables de la synthèse des radicaux libres. [53].

4.2.3. L'alimentation

Comme l'alcool, café, les aliments riches en protéines et en lipides pouvant être à l'origine de la production des radicaux libres, donc ils ont une faible consommation des antioxydants [32].

4.2.4. Certains médicaments

Les médicaments qui sont utilisés comme un traitement contre le cancer (anticancéreux comme les anthracyclines) peuvent provoquer aussi la production des radicaux libres. Des facteurs environnementaux peuvent contribuer à la formation d'entités radicalaires. Une production importante des ROS est observée lors d'une intoxication par des métaux lourds (cadmium, mercure, arsenic) ou dans les phénomènes d'irradiations provoquant des dommages au niveau de l'ADN. Par ailleurs la fumée de tabac, l'alcool ou même certains médicaments (Xénobiotiques) peuvent être source de radicaux libres par oxydations de ces composés au niveau du cytochrome P450 [19].

5. Les conséquences biologiques du stress oxydant

Les ROS deviennent néfastes et toxiques pour l'organisme à des doses excessives. Cette surproduction au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques donne lieu au

stress oxydant qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs maladies allant de l'artériosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, les ischémies et le processus du vieillissement. Ces ROS attaquent principalement les lipides membranaires, mais aussi les protéines et les acides nucléiques.

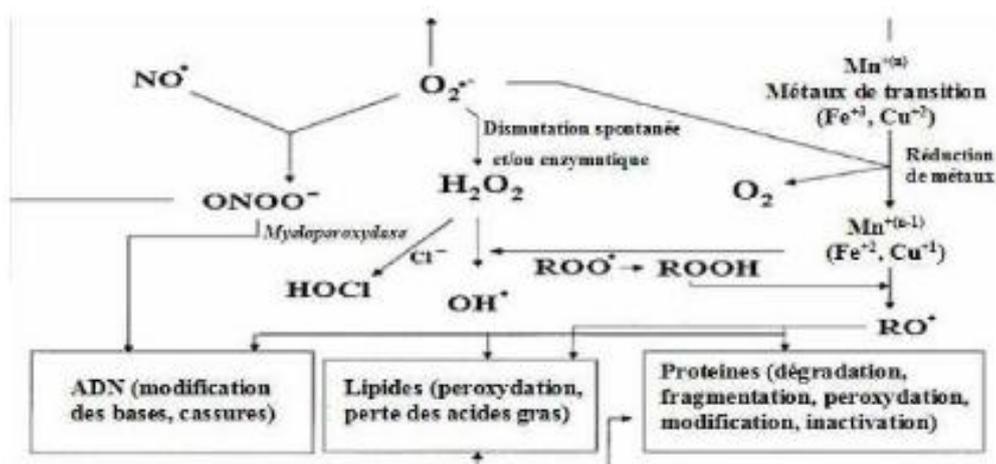


Figure 6 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les EOR [42].

5.1. Le dommage oxydatif à l'ADN

Au niveau de l'ADN, les radicaux libres peuvent induire des effets oxydatifs et mutagènes ou un arrêt des réplifications. Ils agissent en provoquant des altérations des bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures simples et doubles brins [34].

5.2. Le dommage oxydatif aux lipides

Les cibles des ROS sont principalement les acides gras polyinsaturés, en raison de la présence des doubles liaisons, comme par exemple l'acide linoléique. L'origine des réactions radicalaires sont assurés par peroxydation lipidique qui se traduit par le rancissement in vitro. Il se trouve trois différentes étapes pour le mécanisme de la réaction radicalaire sera complet se sont : l'initiation, la propagation et finalement la terminaison [35].

5.3. Le dommage oxydatif aux protéines

Au cours du stress oxydant, les protéines subissent des modifications soit en présence de métaux de transition, soit sous l'action des radicaux libres. La formation de groupement

carbonyles résulte lorsque les radicaux libres réagissent avec le groupement radical des acides aminés.

Le dosage plasmatique des protéines carbonylées est actuellement le marqueur d'oxydation avancée des protéines le plus utilisé, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* [36].

5.4. Oxydation des lipoprotéines

Le dommage oxydatif provoque des changements dans la structure des lipoprotéines de faible densité (low density lipoproteins ou LDL) qui sont riches en acides gras polyinsaturés. La peroxydation induite dans les LDL par les ROS provoque *in situ* la formation d'aldéhyde (MDA et HNE qui peuvent à leur tour oxyder les LDL. Ces LDL modifiées sont captés par les macrophages au sein des quels elles s'accumulent en formant des cellules spumeuses. En s'accumulant dans l'espace interstitiel, ces cellules contribuent au développement de l'athérosclérose [37].

5.5. Oxydation des glucides

L'oxydation du glucose conduit à la formation de différents intermédiaires réactifs, dont les produits terminaux de la glycation protéique, les AGE (Advanced Glycosylation End Products) s'accumulent au niveau des protéines à durée de vie longue, entraînant notamment une perte d'élasticité tissulaire au niveau des vaisseaux sanguins et du cristallin, et pourraient ainsi participer au dysfonctionnement endothélial et aux complications vasculaires du diabète [38].

6. Les systèmes de défenses antioxydants

L'organisme est déterminé d'un ensemble de systèmes de défenses antioxydants très efficaces afin de diminuer la concentration des espèces oxydants dans l'organisme. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques.

6.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les différentes espèces oxydantes. Leur rôle principal est de diminuer la quantité des ROS dans la cellule. Parfois, ces enzymes nécessitent des cofacteurs comme les oligoéléments (Zn, Cu, Mn, Se, Fe.) pour exercer leur activité enzymatique.

6.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs iso enzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire [47].

6.1.2. Glutathion peroxydase (GPx) et réductase (GR)

La (GPx) est présente dans les liquides extracellulaires (sang), dans les cellules au niveau du cytoplasme et dans les membranes. Leur rôle principal est d'assurer la réduction du (H₂O₂) en H₂O et O₂.

Lors de sa réaction deux molécules de glutathion (GSH) réduit sont oxydées en glutathion- Disulfure (GSSG).

Dans chacune de ces réactions, une molécule de glutathion oxydée est obtenue, pour perdurer cette réaction, il doit y avoir un taux constant de GSH, ce qui est rendu possible par la glutathion réductase (GR), qui est catalyse la réduction du (GSSG) en (GSH), à l'aide d'un cofacteur qui est le NDPH sous forme réduite (NADPH, H⁺) [41]. L'équation suivante explique ca :

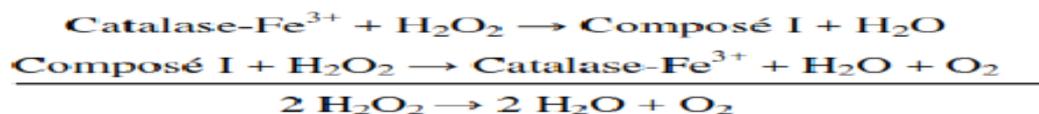


6.1.3. Catalase (CAT)

Le peroxyde d'hydrogène généré notamment lors de la dismutation de l'anion superoxyde est dégradé par la CAT qui est donc le responsable à leur détoxification. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges, elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

La CAT est formée de quatre chaînes polypeptides, chacune porte un groupe hème (Fe), qui constituent les sites actifs de la catalase qui a une très grande affinité pour l'H₂O₂ par contre aux globules rouges qui ont une faible affinité pour l'H₂O₂, seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues.

Pour catalyser la réaction, l'atome de fer du groupement hème réalise une coupure hétérolytique de la liaison (O-O) le peroxyde d'hydrogène, ce qui crée une molécule d'eau et un groupement intermédiaire très oxydant qui peut oxyder une autre molécule de (H₂O₂). [39, 41].



6.1.4. La thiorédoxine

Les thiorédoxines (TRx et la thiorédoxine réductase (TRxR)) Les thiorédoxines sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque comme toutes les protéines à groupement thiol (SH). Elles jouent aussi un rôle important dans la régulation du système immunitaire. Une fois oxydée, la thiorédoxine est réduite par la thiorédoxine réductase (TRxR) qui est une enzyme possédant un groupement sélénocystéine dans son site actif. La TRxR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique.

6.1.5 Les Hèmes oxygénases

Les hèmes oxygénases (HO) sont des protéines qui catalysent la dégradation des molécules d'hème en biliverdine et génèrent du monoxyde de carbone et du fer. Le mécanisme enzymatique des Hème oxygénases n'est pas encore complètement élucidé mais le fait que la biliverdine et le monoxyde de carbone soient des piègeurs d'espèces radicalaires expliquerait en partie le rôle antioxydant de ces protéines, par conséquent leur capacité à réduire le stress oxydant [43].

6.1.6. Autre enzymes antioxydantes

Les protéines liant les métaux, également considérées comme éléments du système antioxydant. En effet, les métaux de transition (fer, cuivre) impliqués dans de nombreuses réactions radicalaires produisent des espèces hautement réactives.

Les formes de stockage et de transport de ces métaux (transferrine, ceruléoplasmine, lactoferrine) ont une fonction antioxydante via un effet chélateur, la formation de ces complexes protéines-métaux permet ainsi d'inhiber les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss, évitant la production du radical hydroxyle [14].

6.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Ce sont des nutriments naturellement amenés par des composés endogènes ou par l'alimentation (Tableau 2), ils ont la capacité de trappé les espèces oxydantes en captant leur électron libre et en formant ainsi des espèces plus stables qui pourront être éliminées par d'autre systèmes antioxydants. Dans cette catégorie d'antioxydant les principales molécules sont les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome c et les vitamines E et C.

Tableau 2 : Principaux antioxydants non enzymatiques et sources alimentaires associées [18]

Principaux Antioxydants	nutriments	Sources alimentaires
Vitamine C		Agrume, melon, fraise, kiwi, chou, poivron
Vitamine E		Huile de tournesol, de soja, de maïs, beurre, œufs, noix
β-carotène		Légumes et fruits orangés, et vert foncés
Sélénium		Poisson, œufs viandes, céréales, volaille
Zinc		Viande, pain complet, légumes verts, huitres, produits laitiers
Flavonoïdes		Fruits, légumes, thé vert
Acide Phénoliques		Céréales complètes, baies, cerises
Tanins		Lentilles, thé, raisins, vin
Métabolismes de cysteine, glutathion		Caséine, Lactalbumine(petit-lait), produits laitiers Brocoli, chou, œufs, poissons, viandes

6.2.1. Glutathion (GSH)

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation du glutamate, de cystéine et glycine est donné une formule semi-développé : γ -L-Glutamyl cystéinyl glycine et le plus abondant est le thiol intracellulaire. Il permet la conversion des ponts disulfures (R-S-S-R) des protéines oxydées en deux fonctions thiols (R-SH).

Les formes GSH (réduite) et GSSG (oxydée) forment un couple d'oxydoréduction très important dans la cellule car il permet les échanges des électrons à l'intérieur de la cellule. Des études ont montré son importance dans plusieurs pathogènes comme le cancer ou une protéine exercerait son effet anti-carcinogène en augmentant les concentrations de GSH [44].

6.2.2. Ubiquinones et cytochrome c

L'ubiquinone y a une forme semi-radicalaire, il joue un rôle principal dans la production de ROS. Contrairement, Il peut être également impliqué dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS. Le cytochrome C se trouve dans l'espace inter membranaire, il participe à la détoxification par saisir l'électron libre d' $O_2\bullet$ - qui se produise au niveau de la chaîne respiratoire. Aussi bien que, il donne cet électron au complexe IV pour former le cytochrome c oxydé et le H_2O [45].

6.2.3. Les Vitamines

6.2.3.1. Vitamine E

La vitamine E est le principal antioxydant lipophile pouvant réduire les radicaux peroxy et réagir avec l' O_2 , l' $HOCl$ et l' $ONOO^-$. Il se transforme en radical hydroxyle après l'échange d'un électron libre. Le radical tocophéroxyl est peu réactif de par sa structure cyclique et peut être régénéré par l'acide ascorbique.

La vitamine E existe sous huit formes naturelles : quatre tocophérols (α , β , γ et δ) et quatre tocotriénols (α , β , γ et δ). Chez l'homme, les formes prédominantes sont l' α et le γ -tocophérol, l' α -tocophérol étant la plus active.

Du fait de sa nature lipophile, la vitamine E peut agir au site même de la peroxydation lipidique membranaire, elle est essentielle dans la prévention de l'oxydation des lipides et des lipoprotéines [14].

6.2.3.2. Vitamine C

L' α -tocophérol peut être régénéré lors de la réduction du radical tocophéryle par la vitamine C ou acide ascorbique. Ce dernier est le plus fréquemment présent sous forme d'ascorbate et est considéré comme l'antioxydant le plus important des fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace de l'ensemble des ERO. Il réagit particulièrement avec les peroxydes aqueux en formant le radical ascorbyl ce qui protège les lipoprotéines et les membranes de la peroxydation lipidique [46].

6.2.4. L'Acide urique

L'acide urique est produit par oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydase et la xanthine déshydrogénase. Au pH physiologique, il est majoritairement présent sous la forme ionisée (urate) pouvant interagir avec les radicaux hydroxyles et conduisant à la formation de l'espèce radicalaire $UrH^{\circ-}$ stable. Celle-ci est à son tour réduite par l'acrobate régénérant l'urate. L'urate protège les protéines de la nitration en réagissant avec le peroxy-nitrite. Il peut également chélater les ions métalliques et donner des chélates peu réactifs sur le plan catalytique [48].

6.2.5. Les polyphénols

Les polyphénols végétaux regroupent une grande variété de composés comprenant entre autres les flavonoïdes, les anthocyanes et les tanins. Ce sont des composés ubiquistes que l'on retrouve dans les plantes. Ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes. En réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices.

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques interviennent dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques.

Ces composés montrent des activités anti-carcinogènes, anti-inflammatoires, antiathérogènes, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux, antiallergènes, vasodilatateurs [49].

Les composés polyphénoliques sont d'ailleurs de plus en plus utilisés en thérapeutique. Ils sont regroupés dans la catégorie des veinotoniques et des vasculoprotecteurs. Parmi les veinotoniques, nous citerons le Relven et ou le Cirkant renfermant du ruténoside, le Daflont ou le Diosmilt renfermant de la diosmine. Un certain nombre de molécules polyphénoliques sont également en étude clinique comme des anti-agrégant plaquettaire, ou hypotenseur sans résultats probants [50] (Figure7).

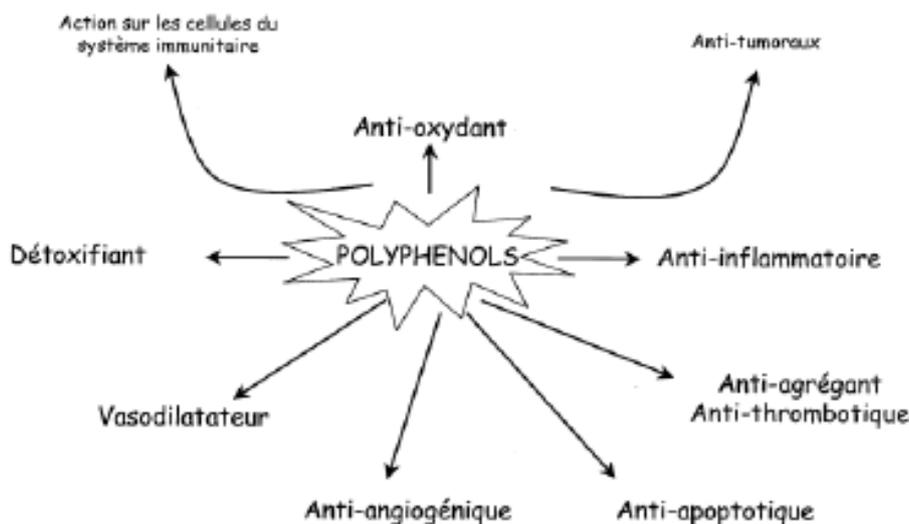


Figure 7 : Effets biologiques des polyphénols [50].

6.2.6. La bilirubine

La bilirubine est un produit terminal de la dégradation de l'hémoglobine, un puissant agent réducteur et un potentiel antioxydant physiologique. Dans les fluides extracellulaires, principalement liée à l'albumine elle est une molécule hydrosoluble hydrophobe. La molécule libre et tout comme celle liée à l'albumine peuvent réduire la vitamine E et inhiber la peroxydation lipidique dans le plasma et les lipoprotéines [51].

6.2.7. L'albumine

L'albumine est la protéine circulante la plus abondante, possède de nombreux groupements thiols qui lui permettent, tout comme le GSH, de jouer le rôle de trappe radicalaire ; même si la vitesse des réactions dans lesquelles elle est impliquée est plus lente, elle constitue un important antioxydant plasmatique [14].

6.2.8. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques, dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance.

Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus, et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration C6-C3-C6 de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2phényle chromane [52].

6.2.9. Les oligo-éléments

Les oligo-éléments sont des cofacteurs enzymatiques impliqués dans toutes les grandes voies métaboliques et notamment dans la protection contre les espèces radicalaires. Le rôle antioxydant paradoxal du fer s'exerce par l'intermédiaire de la catalase. Cependant sous forme d'ion Fe^{2+} libre, le fer peut être pro-oxydant par l'intermédiaire des réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Le zinc remplit de multiples rôles dans l'organisme : un effet antioxydant par sa participation au maintien de l'activité de la SOD cytoplasmique cuivre et zinc dépendante, un effet modulateur de l'apoptose et une activité de défense anti-infectieuse. Le cuivre agit en synergie avec le zinc dans la SOD cytosolique, et possède ainsi un effet antioxydant et par conséquent un effet anti-inflammatoire et anti-infectieux, notamment dans les tissus cutanéomuqueux. [50]

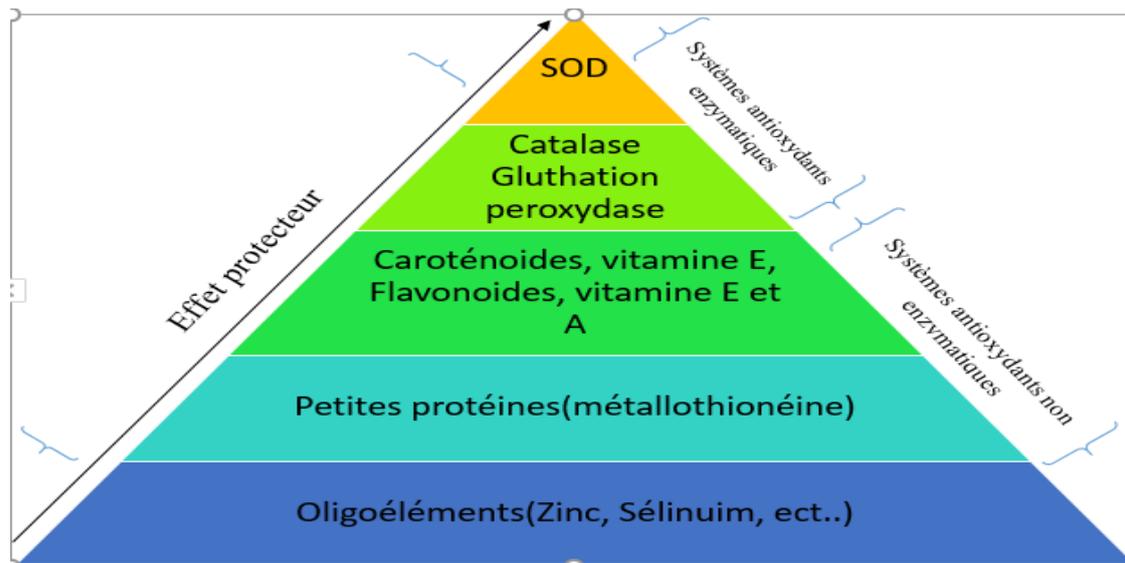


Figure 8 : Pyramide des systèmes de défenses antioxydant

CHAPITRE II

Le Formaldéhyde

Chapitre II : Le Formaldéhyde

1. Informations générales sur le formaldéhyde

Le formaldéhyde (CH_2O) est un composé très ubiquitaire de nos environnements intérieurs, professionnels, privés ou de loisirs. [54]. Sa densité de vapeur est de 1, comme l'air, ce qui le rend particulièrement diffusible [55].

Le formaldéhyde, ou aldéhyde formique, est largement utilisé en milieu industriel dans des secteurs d'activité variés (industries chimiques, textiles, agro-alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques, secteur hospitalier, . . .) pour des applications extrêmement diverses (intermédiaire de synthèse, production de résines destinées à la fabrication de nombreux matériaux, désinfectant, conservateur, . . .). [56].

Le formaldéhyde est également présent dans la fumée de tabac ou les gaz d'échappement des automobiles. Ses sources nombreuses sont à l'origine d'expositions professionnelles ou domestiques survenant essentiellement par contact cutané ou par inhalation [57].

2. Propriétés physico-chimiques du formaldéhyde.

2.1. Propriétés physiques

À la température ordinaire, l'aldéhyde formique est un gaz incolore, d'odeur piquante et suffocante. Il est très soluble dans l'eau et dans les solvants polaires tels que l'éthanol, l'acétone et l'oxyde de diéthyle.

L'aldéhyde formique n'est pas commercialisé sous forme gazeuse. Il est généralement livré en solutions aqueuses à des concentrations de 30 % à 55 % en poids. Mais il est également disponible sous ses formes polymérisées : le paraformaldéhyde (polymère) ou le trioxane (trimère). [59 - 65].

2.2. Propriétés chimiques

L'aldéhyde formique est un composé très réactif et très hygroscopique. Il se polymérise facilement en particulier à froid ou en présence de traces d'impuretés polaires (acides, alcalins) ou d'eau (le gaz pur et sec est relativement stable à 80-100 °C).

Dans l'eau, à température ambiante, l'aldéhyde formique est présent sous forme d'hydrate et de poly (oxyméthylène) glycols, oligomères qui troublent les solutions aqueuses. Le méthanol et certains stabilisants, tels que des dérivés de la cellulose, permettent de ralentir ou d'inhiber la polymérisation.

Tableau 03 : Propriétés physico chimiques du formaldéhyde.

Forme physique	Gaz incolore à température ambiante, odeur « piquante »
Masse Molaire	30,03 g.mol ⁻¹
Point d'ébullition	-19,1 ° C
Point de fusion	- 92 ° C
Densité	1,03 à 1,06 (air = 1)
Solubilité dans l'eau	Très soluble (400-500 g.L ⁻¹)
Solubilité dans les solvants organiques	Soluble (éther, alcool, etc.)
Pression de vapeur	440 kPa à 20 ° ; 516-519 kPa à 25 ° C
Log Kow 3	0,35 à 25° C

Il réagit vigoureusement avec les oxydants forts, les acides et les bases. La réaction de condensation du phénol avec l'aldéhyde formique peut être violente, voire explosive. Dans certaines conditions de température et d'humidité, l'action de l'aldéhyde formique sur le chlorure d'hydrogène peut engendrer de l'oxyde de bis (chlorométhyle), cancérigène puissant. L'aldéhyde formique en solution diluée peut réagir avec l'hydroxyde de sodium en libérant de l'hydrogène.

Les solutions d'aldéhyde formique sont légèrement corrosives vis-à-vis de la plupart des métaux. [59, 62, 64].

3. Les voies d'exposition

Du fait de sa présence très fréquente dans l'air, la voie principale d'exposition au formaldéhyde est l'inhalation. Lors de ce type d'exposition, de par sa forte solubilité dans l'eau, il est retenu au niveau de la cavité nasale, de la bouche, de la trachée et des bronches principales. Cette voie prépondérante n'exclut pas la possibilité d'une exposition par ingestion (notamment via l'eau) avec alors une majorité du formaldéhyde retrouvée dans le tube digestif et par contact (l'absorption est alors plus faible après application d'une solution à 37 % sur de la peau humaine) [66].

Chez le rat, après inhalation de 15 ppm de formaldéhyde marqué pendant 6h, la radioactivité se retrouve dans l'œsophage, les reins, le foie, les intestins et les poumons. En réalité, ce sont les métabolites du formaldéhyde et ses produits de réactions qui sont dans ce cas détectés. [67].

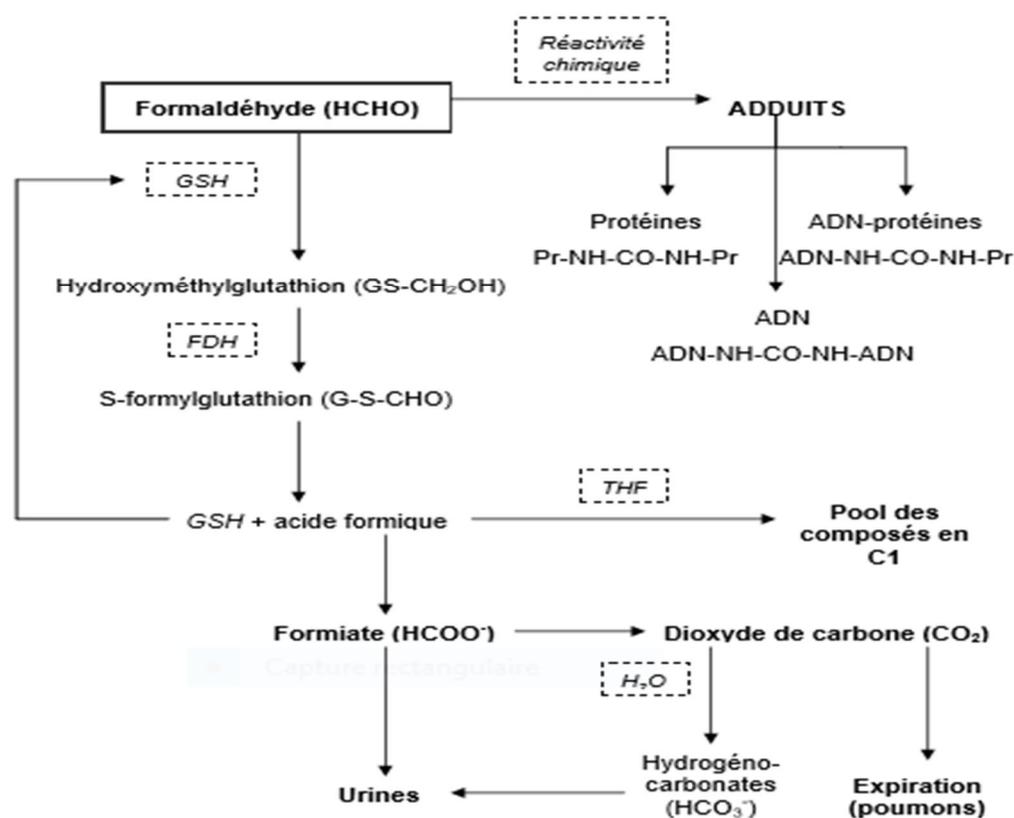
4. Métabolisme et élimination

Il existe des sources endogènes de formaldéhyde, essentiellement liées au métabolisme d'acides aminés (glycine et sérine notamment). La concentration sanguine de formaldéhyde endogène est de 0,1 mM (2,7 mg/L) [66]. Sa rétention au site de contact, sa forte réactivité, et sa métabolisation rapide expliquent que cette concentration n'augmente pas significativement suite à une exposition. De ce fait, celle-ci n'est pas un bon marqueur d'exposition [68].

De plus, le formaldéhyde peut être formé lors de la dégradation de certains xénobiotiques (tels que le méthanol ou le méthyltertbutyléther utilisé comme additif dans l'essence) [69].

En effet, au niveau des sites de contact, le formaldéhyde est rapidement métabolisé en formiate puis en CO₂ par plusieurs enzymes cellulaires hydrosolubles, la plus importante étant la formaldéhyde déshydrogénase NAD⁺-dépendante (FDH). Le formaldéhyde réagit rapidement avec le glutathion (GSH) pour former dans une première étape l'hydroxyméthylglutathion (GS-CH₂OH) qui est ultérieurement oxydé en présence de la FDH en S-formylglutathion (G-S-CHO). L'hydrolyse de ce composé libère du glutathion et un ion formiate (HCOO⁻) qui est soit éliminé dans les urines, soit oxydé en CO₂ éliminé surtout au niveau pulmonaire ou intégré dans le pool des composés en C1 via la voie dépendante du tétrahydrofolate (THF) [70].

Quand il n'est pas métabolisé, le formaldéhyde peut, en raison de sa forte réactivité avec les groupements fonctionnels des molécules, se lier de manière covalente avec les sites nucléophiles des protéines, des petites et moyennes molécules et de l'ADN [71].



La Figure 9 : Métabolisme du formaldéhyde chez les mammifères [91].

La demi-vie du formaldéhyde dans le sang excède rarement 2 minutes chez l'homme. Il est éliminé par voie respiratoire sous forme de dioxyde de carbone par un mécanisme de clairance mucociliaire et par voie urinaire sous forme de formiate après métabolisation. Les concentrations moyennes d'acide formique urinaire dans une population non exposée professionnellement se situent aux alentours de 12 mg/L et sont extrêmement variables d'un individu à l'autre [72].

5. Propriétés irritantes du formaldéhyde

Le formaldéhyde est un puissant irritant [56]. Cette propriété pourrait expliquer la plupart des effets respiratoires du formaldéhyde.

5.1. Irritation et inflammation neurogène

Chez le sujet sain, l'inhalation de formaldéhyde provoque un afflux d'éosinophiles et une augmentation de la concentration en protéines dans le liquide de lavage nasal [73]. De même, chez le rat, l'inhalation aigue de formaldéhyde induit un afflux de neutrophiles et de cellules mononuclées dans les voies respiratoires, ainsi qu'une augmentation de perméabilité vasculaire trachéale et bronchique [74,75].

La stimulation des fibres sensibles par les irritants provoque la libération de neuropeptides, tels que le calcitonin gene-related peptide(CGRP) ou la substance P, responsables d'une inflammation neurogène.

Ainsi, l'activation des fibres nerveuses sensibles et la libération des neuropeptides pourraient représenter un des mécanismes d'action du formaldéhyde dans les voies aériennes.

5.2. Irritation et activation mastocytaire

Une des cellules majeures dans la réponse à l'allergène est le mastocyte, qui constitue une source importante de médiateurs broncho-actifs et pro-inflammatoires. Deux études ont analysé le rôle de cette cellule dans l'action du formaldéhyde au niveau respiratoire [76].

Ont rapporté que des faibles concentrations de formaldéhyde augmentent la libération d'histamine induite par l'allergène à partir de mastocytes péritonéaux de rats ou de mastocytes dérivés de la moelle osseuse de souris [76].

Ainsi, le mastocyte pourrait également être une cible importante dans l'action du formaldéhyde au niveau respiratoire.

5.3. Irritation et épithélium respiratoire

Dans les voies aériennes, l'épithélium respiratoire, qui joue un rôle important de défense en assurant les fonctions de barrière physique et de clairance mucociliaire, constitue une cible majeure des toxiques inhalés. Certains irritants sont capables d'altérer les propriétés de barrière de l'épithélium respiratoire et de faciliter ainsi l'accessibilité de la muqueuse respiratoire aux allergènes.

Ainsi, l'exposition de monocouches de cellules épithéliales bronchiques humaines à de la fumée de cigarettes, qui renferme du formaldéhyde, se traduit par une baisse de la résistance électrique de ces cultures, associée à une augmentation du passage de l'allergène au travers de la monocouche épithéliale [77].

Des travaux, réalisés *in vivo* chez le rat ou sur des préparations isolées d'épithélium cilié de grenouille, ont montré que le formaldéhyde provoque des lésions de l'épithélium respiratoire, ainsi qu'une inhibition de la fonction mucociliaire [78,79].

Ainsi, le formaldéhyde pourrait contribuer à augmenter d'une part, les risques de sensibilisation allergénique chez des sujets sains, et d'autre part, l'intensité de la réponse bronchique à l'allergène chez des sujets sensibilisés, en favorisant la pérennisation des pneumallergènes dans les voies respiratoires et leur accès à la muqueuse bronchique.

6. Les effets toxicologiques

De très nombreuses études de toxicité en laboratoire ont été réalisées chez le rat, la souris, les primates. De plus, quelques expositions humaines volontaires (avec des expositions comprises entre 0 et 4 ppm) [80,81].

Les symptômes observés lors d'une exposition à des doses importantes sont principalement liés aux propriétés irritantes du formaldéhyde, notamment au niveau des yeux et des voies respiratoires.

Ces irritations (accompagnées de larmoiements et d'une sécheresse buccale) apparaissent à partir de 0,2 - 0,3 ppm (soit 250 - 375 µg/m³) mais les résultats sont très variables entre les sujets et entre les études.

Ainsi, **Arts *et al.* [81]**. Reportent, après une revue de la littérature, la survenue des irritations oculaires à partir de 0,5-1 ppm, des irritations du nez à partir de 2 ppm et des irritations de la gorge à partir de 3 ppm.

Le seuil d'odeur est compris entre 0,02 et 0,5 ppm (30 et 600 µg/m³).

Les études chez l'animal montrent qu'à partir de 2 ppm, ces effets sont associés à des lésions locales de l'épithélium nasal [82].

Des travaux réalisés *in vitro* ont également mis en évidence des lésions de l'épithélium respiratoire pouvant favoriser la mise en contact des allergènes avec la muqueuse.

6.1. Effet chronique non cancérigène

6.1.1. Données épidémiologiques chez des populations exposées professionnellement

Selon **Ameille et Escatha [83]**, les aldéhydes seraient responsables de 5,9 % des cas d'asthme professionnel (3 % chez l'homme, 9 % chez la femme), sans précision sur la part attribuable au formaldéhyde [84].

6.1.2. Données épidémiologiques chez des populations en générale

Il existe de nombreuses sources de formaldéhyde à l'intérieur des locaux. Or, on estime, en Europe comme dans de nombreux pays industrialisés, que les personnes passent près de 90 % de leur temps dans un local.

Ainsi, les pathologies liées à la pollution intérieure (atteintes du système respiratoire, allergies, hypersensibilité chimique multiple, plus connue sous le nom de syndrome des bâtiments malsains [SBM]...) ont suscité de nombreuses interrogations.

6.2. Effet cancérigène

En 2004, le **CIRC** a classé le formol dans le **groupe 1** des agents cancérogènes pour l'Homme suite aux résultats de plusieurs études épidémiologiques mettant en évidence une augmentation de l'incidence des cancers nasopharyngés chez des *sujets fortement exposés* professionnellement.

6.2.1. Données d'expérimentations en laboratoire

Les différents types de tests (mutations géniques, lésion primaire de l'ADN, transformation cellulaire) sont positifs avec les modèles utilisés [85].

Chez le rat, l'inhalation de formaldéhyde (à partir de 5,6 ppm, 6h/jour, 5j/sem., durant 2 ans) provoque des carcinomes épidermoïdes des fosses nasales.

L'apparition de ces tumeurs semble liée à la prolifération de cellules suite aux effets irritants. En dessous de 1 ppm, aucune anomalie n'a été observée chez le rat comme chez

le singe, et aucune tumeur en dessous de 2 ppm (l'incidence augmente à partir de 5,6 ppm).

Sul et al. (2007) [86]. Ont obtenu des résultats significatifs pour le test des comètes réalisé sur des cellules pulmonaires de rats exposés à partir de 6,2 mg/m³ [5,1 ppm, expositions 6h/j, 5j/sem., durant 2 sem.].

In vivo, à des doses irritantes, l'effet génotoxique reste limité. L'absence d'accumulation des ponts ADN-protéines - formol, suggère l'existence d'un mécanisme de réparation des lésions.

7. Activités pro-inflammatoires du formaldéhyde

La capacité du formaldéhyde à induire une inflammation [74,75] ou à augmenter la réponse inflammatoire bronchique provoquée par l'allergène [61,62] pourrait faire intervenir des mécanismes autres que ceux liés à ses propriétés irritantes.

7.1. Afflux des cellules inflammatoires

Des données de la littérature suggèrent que le formaldéhyde provoque ou favorise l'afflux des cellules inflammatoires en agissant sur les cellules structurales. En effet, dans les kératinocytes humains en culture, le formaldéhyde augmente la production d'IL-1 et d'IL-8 induite par les esters de phorbol, suggérant que l'exposition au formaldéhyde est susceptible d'aggraver la réponse inflammatoire des cellules structurales en augmentant leur capacité à produire des cytokines et des médiateurs chimio-attractants [87].

De plus, dans les cellules endothéliales humaines dérivées de la muqueuse nasale, le formaldéhyde augmente l'expression des molécules d'adhérence « ICAM-1 » et « VCAM-1 » et l'adhésion des éosinophiles [88]. Ainsi, le formaldéhyde pourrait provoquer ou favoriser le développement d'un infiltrat cellulaire dans les voies aériennes en augmentant la capacité des cellules structurales à attirer et interagir avec les cellules inflammatoires.

7.2. Stress oxydant

Le formaldéhyde est toxique pour la cellule. Des études sur des hépatocytes en culture ont montré que cette cytotoxicité résulte d'un stress oxydant [89]. En accord

avec cette hypothèse, l'administration de vitamine E antioxydants inhibe l'hépatotoxicité induite par le formaldéhyde chez le rat [90]. Cette action pro-oxydante pourrait contribuer à l'activité pro-inflammatoire du formaldéhyde dans les voies aériennes, ainsi qu'à une action lésionnelle sur l'épithélium respiratoire susceptible d'aggraver la réponse bronchique à l'allergène.

CHAPITRE III

La Gelée Royal

Chapitre III : La Gelée Royale

1. Généralités

Décrite comme conférant l'immortalité aux dieux de l'Olympe chez les Grecs de l'Antiquité, elle est consommée depuis des siècles par les hommes mais n'a été vraiment observée que vers la fin du XVII^e siècle par Swammerdam et par Aristote par la suite [92]. Plus tard, les travaux de divers scientifiques ont montré le rôle de la gelée royale dans la vie de la reine et les possibles applications en médecine humaine.

La gelée royale est sécrétée par les glandes pharyngiennes et mandibulaires de jeunes ouvrières nommées nourricières, glandes qui sont localisés dans la tête de l'insecte [93].

Nourriture exclusive des reines ou lors des 3 premiers jours de la vie larvaire des abeilles. [94,95,96]. La gelée royale est la substance centrale de la ruche : elle assure son existence et son fonctionnement. [97].

Sa composition dépend de sa destination dans la ruche et de la race des abeilles la produisant, le taux d'acide 10-hydroxy-2-decenoïque déterminant la qualité de cette gelée royale.

Ainsi, cette nourriture va permettre le développement des organes sexuels de la reine et le poids de celle-ci va se trouver 6 fois supérieures à celui de l'ouvrière, preuve de la possible présence de facteurs de croissance.

De plus, la reine va être beaucoup plus résistante aux maladies que les autres abeilles de la ruche et va vivre beaucoup plus longtemps (4 à 5 ans au lieu de 45 jours environ). Sans oublier que celle-ci peut déposer jusqu'à 2000 œufs par jour, soit son propre poids, en période de reproduction [98].

2. Propriétés physiques de la gelée royale

La gelée royale, est une substance d'aspect visqueux et blanc crémeux à jaune dore pale [94,95,96].

L'odeur de la gelée royale est piquante, caractéristique. Plus l'odeur est prononcée, plus elle indique la fraîcheur, une gelée royale sans odeur étant suspecte.

Elle est partiellement soluble dans l'eau et fortement acide (pH 3.4-4.5), avec une densité de 1.1 g/ml [100].



Figure 10 : Cellule royale contenant une larve de reine baignant dans la gelée royale [99].

3. Conservation de la gelée royale

Elle doit être conservée de préférence sous atmosphère stérile, sans oxygène, puis une fois le récipient ouvert, doit être placée au réfrigérateur à température inférieure à 5°C [94,101,102].

On peut également trouver de la gelée royale lyophilisée sous forme de gélules ou de capsules mais présentée ainsi, elle perd une partie de ses propriétés par l'évaporation de ses composants volatiles.

Il existe toutefois d'autres formes comme les ampoules sous vide ou en flacons, en comprimés ou mélangée avec du miel.

4. Composition chimique

La composition de la gelée royale est différente suivant qu'elle est destinée aux larves d'abeilles ouvrières ou aux larves de reines et dépend également de la race des abeilles la produisant.

Les relations quantitatives entre les différents composants de ce produit peuvent être variables et dépendent de nombreux facteurs, y compris l'origine, l'âge de l'ouvrière, la saison et le type de flore pollinifère, avec des variations affectant les lipides, les protéines, les acides aminés et des vitamines.

La composition moyenne générale de la gelée royale est décrite dans le tableau ci-dessous (**Tab 04**) :

Tableau 04 : Composition moyenne de la gelée royale [103].

Composition	Pourcentage Total	Type de composés	Principaux composants
Eau	57 à 70 % (Moyenne 70 %)		
Hydrates de carbone	14 %	Monosaccharides	Glucose et fructose
		Disaccharides	Saccharose, maltose...
		Polysaccharides	Mélibiose, erlose, ribose...
Protides	13 %	Acides aminés (dont les 8 essentiels)	Proline, lysine, leucine, arginine, valine, Phénylalanine...
		Peptides	Défensine (la royalisine), apisimine, Jelleines I, II, III, IV...
		Protéines	MRJP1, MRJP2, MRJP 3, MRJP4
Lipides	4,5 %	Acides gras	<i>Trans</i> -10-hydroxy-2-décénoïque...
		Stérols	Cholestérol et stigmastérol
		Cires	
		Phospholipides	
Substances diverses	2 à 8 %	Minéraux	K, Na, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, S, P, N, C...
		Vitamines	B1, B2, B3 ou PP, B5, B6, B8 ou H inositol, B9, (B12, C A, D, E, K)
		Enzymes	Glucose-oxydase, ...
		Acétylcholine 1mg/g	
		Hormones (Gelée fraîche)	(Estradiol, testostérone, progestérone)
		Acides nucléiques (Gelée fraîche)	(ADN et ARN)

5. Propriétés thérapeutiques de la gelée royale

La gelée royale possède de nombreuses propriétés thérapeutiques. L'ensemble des recherches effectuées à ce jour permet de montrer plusieurs propriétés biologiques de ce produit. Ces propriétés sont en rapport avec la composition chimique (l'eau, des protéines, des lipides, des hydrates de carbone, des acides aminés, des sels minéraux, des vitamines, des enzymes, des hormones, des oligo-éléments, et des antibiotiques).

5.1. Activité antioxydante

La GR possède une activité antioxydante [104], [105,106,107], dû à la présence des composés phénoliques comme les flavonoïdes [98] qui ont un énorme pouvoir antioxydant.

De plus. La GR protège l'ADN des dommages oxydatifs au niveau des tissus en réduisant les niveaux de 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (un marqueur du stress oxydant) au niveau de l'ADN [109].

Grâce à sa richesse en produits antioxydants, la gelée royale aiderait à retarder les effets du vieillissement cutané. Elle contient des oligoéléments et des vitamines qui, jouent un rôle protecteur vis-à-vis des radicaux libres. En plus de la vitamine C, la gelée royale contient de la vitamine E à l'état de trace qui possède des propriétés anti-radicalaires et anti-inflammatoires, expliquant son action protectrice contre les effets nocifs du soleil [110].

De nombreux travaux ont montré l'effet protecteur de la propolis contre la toxicité des médicaments anticancéreux [111].

De plus, la GR possède un effet hépato-protecteur contre la toxicité du paracétamol [112].

5.2. Action anti-inflammatoire

Les effets antioxydants, antibactériens, anti-inflammatoires et cicatrisants font de la GR un excellent composé des produits cosmétiques et les produits de soin de la peau.

Une étude *in vitro* a démontré que, la gelée royale semblerait inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1), par les macrophages activés avec le

lipopolisaccharides (LPS) et l'IFN γ , de façon dépendante de la dose, et sans effets cytotoxiques sur les macrophages.

Ce qui suggère que la GR contient des facteurs, parmi lesquels la protéine majeure 3 (MRJP3) qui inhibe la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires [124].

Une étude réalisée en 1990 a démontré que l'administration de gelée royale par voie orale favorise la cicatrisation chez des souris diabétiques en présentant un effet antiinflammatoire et en favorisant la formation du tissu de granulation [114].

5.3. Action immunostimulante

La gelée royale stimule les organes hématopoïétiques et donc la production de globules rouges et blancs, particulièrement utile dans les anémies fonctionnelles du sujet âgé.

Elle stimule l'appétit et la prise de poids grâce à son activité eupeptique et régulatrice des troubles digestifs fonctionnels.

Elle est également source de bien-être en stimulant, euphorisant, tonifiant l'organisme, ceci améliorant le rendement physique, intellectuel et sexuel notamment chez les sportifs ou encore les étudiants en période d'examens [107].

La gelée royale, grâce à son action immunostimulante, va aider à lutter contre les agressions, va retarder les effets du vieillissement sur les phanères et la peau (grâce à la richesse en vitamine B5) et possède des propriétés anti-tumorales [58].

5.4. Propriétés cicatrisantes

Grâce à sa forte teneur en acides aminés, notamment la proline et l'hydroxy proline connue comme étant des précurseurs de l'élastine et du collagène, la gelée royale est utile dans les phénomènes de réparation tissulaire [115].

En effet, l'élastine et le collagène sont des constituants majeurs de la peau qui lui confèrent sa résistance, sa fermeté et sa souplesse.

De plus, les protéines majeures de la gelée royale ou MRJP (major royal Jelly proteins) qui constituent un groupe de cinq protéines seraient capables, notamment la MRJP1, d'induire la prolifération des kératinocytes [116].

L'acide 10-hydroxy-2-décanoïque est un facteur qui favorise la production de collagène. Une étude *in vitro* a démontré qu'il pourrait agir de façon dose-dépendante en incitant les fibroblastes à produire le facteur de croissance TGF- β 1 dont le rôle est majeur dans la production de collagène.

Ainsi, la gelée royale et l'acide 10-hydroxy-2-décanoïque pourraient stimuler la production de collagène et améliorer son dépôt dans le derme [117].

Ces propriétés sont particulièrement importantes pour favoriser les processus de cicatrisation.

5.5. Action antitumorale

L'effet antitumoral de la GR a été bien étudiée sur des modèles expérimentaux. Cependant, il n'y a eu aucune étude comparable chez l'homme.

En effet, des recherches récentes ont mis en évidence l'action antitumorale de la GR, l'acide 10-hydroxy-2-décanoïque (**10HAD**) contenu dans la GR, exerce une action inhibitrice sur l'angiogenèse induite par le VEGF (vascular endothelial growth factor), bloquant ainsi la prolifération et la migration des cellules, qui mène à l'inhibition de la vascularisation de la tumeur [118].

La gelée royale contient aussi l'apalbumin-1 et l'apalbumin-2, deux protéines majeures stimulent la synthèse de TNF- α (Tumor Necrosis Factor) par les macrophages. [119].

De plus, une autre fraction protéique de la GR, appelée RJP30 joue également un rôle antitumoral. Elle exerce une action cytotoxique sur les cellules du carcinome utérin, diminuant 2.5 fois la densité initiale des cellules après 7 jours de traitement [120].

5.6. Effet antibiotique

Des études ont montré que la gelée royale possède une activité antibactérienne. En effet, elle inhibe certaines bactéries gram positif et gram négatif. Cette activité est due en majorité à la présence d'un acide gras, l'acide trans-10-hydroxy-2-décénoïque, qui est actif sur différentes bactéries : *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* [121].

Des protéines et des peptides jouent également un rôle important dans le pouvoir antibactérien de la gelée royale. Il s'agit des protéines majeures de la gelée royale ou MRJP, ainsi que de trois types de peptides : une défensine (la royalisine), les jelleines (jelleine I, II, III, IV), et l'apisimine.

Ce dernier peptide ne possède pas d'activité antimicrobienne mais forme un complexe avec l'apalbumine (MRJP1) et serait impliqué dans l'activation de mécanismes cellulaires [122].

La royalisine inhibe les bactéries à gram positif tel que *Bacillus subtilis*. Elle est aussi active sur *Escherichia coli*, comme l'apalbumine [121-122].

De plus, cette fraction peptidique Royalisine a un effet anti-fongique contre *Botrytis cinerea* [123].

En complément de cette action contre ces micro-organismes, la gelée royale participe à la régénération de la flore intestinale, comme le pollen et la propolis. Ceci est évidemment intéressant dans les traitements antibiotiques qui agressent cette flore. La gelée royale pourrait donc prendre le relais d'un tel traitement pour aider à la récupération, surtout chez le sujet âgé.

Elle présente également une activité antivirale, utile dans les traitements des hépatites ou dans le cas de gripes, en stimulant le système immunitaire.

En effet, son action directe sur les virus n'a pas été clairement démontrée [100].

La GR est aussi une substance aux propriétés.

- ✓ Antihypertensive [124,125].
- ✓ Hypoglycémiant [126,127].
- ✓ Antiallergique [128].
- ✓ Antivieillessement [109].
- ✓ Fortifiantes et toniques [129,130,131].
- ✓ Fertilisantes [132,133,134].

6. Effets indésirables

La gelée royale n'est soumise à aucune contre-indication précise (en dehors du cas particulier des patients cancéreux) et est reconnue d'une totale innocuité, mais sa richesse en protéines l'expose tout de même à un risque allergénique possible [135,136,138].

Partie Expérimentale
Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1. Matériel biologique et conditions d'élevage

Notre étude a été réalisée sur un groupe de 24 rats blanches femelles *Rattus rattus* de la souche Wistar, d'un poids vif moyen de 179.73 g.

Ces rats ont été soumises à une période d'adaptation d'un mois et demi environ, au niveau de l'animalerie de l'université Constantine 1, à une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ et une photopériode naturelle.

Les rats sont élevés dans des cages en plastique qui sont tapissées d'une litière constituée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérimentation. Elles ont accès libre à l'eau et à l'aliment standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia.

1.1. Traitement des rats

Les rats ont été répartis en 4 lots de 6 rats chacun :

Lot 1 (T) : rats témoins ont reçu une injection intra- péritonéale de l'eau physiologique chaque jour pendant 14 jours.

Lot 2 (FA) : rats traités par le formaldéhyde.

Les rats ont reçu une injection intra-péritonéale de formaldéhyde à raison de 10 mg/kg de poids corporel chaque jour pendant 10 jours.

Lot 3 (FA+GR 150mg/kg) : rats traités par le formaldéhyde et la gelée royale.

Le formaldéhyde est administré pendant 10 jours (même protocole que le 2^{ème} lot), la Gelée royale est administrée par gavage à raison de 150mg/kg de poids corporels chaque jour pendant 14 jours.

Lot 4 (FA+GR 200mg/kg) : rats traités par le formaldéhyde et la gelée royale.

Le formaldéhyde est administré pendant 10 jours (même protocole que le 2^{ème} et le 3^{ème} lot), la Gelée royale est administrée par gavage à raison de 200mg/kg de poids corporels chaque jour pendant 14 jours.

1.2. Prélèvement du sang et des organes

A la fin des traitements, les animaux sont anesthésiés, avec du chloroforme pendant 2 à 3 minutes, le sang est prélevé par ponction de l'aorte abdominale dans des tubes héparinés. Les échantillons sanguins sont centrifugés à 3000 tours/minute pendant 15 minutes, et le plasma est stocké au congélateur à -20°C et servira à la détermination des transaminases (ALAT).

Les organes (foie, poumon) sont soigneusement prélevés après dissection des animaux, rincés avec une solution fraîche de NaCl à 0.9% et débarrassés de leurs tissus adipeux puis pesés.

Un fragment de foie et de poumon sont fixés séparément dans du formol à 10%, afin de réaliser des coupes histologiques.

Le reste des organes sont conservés au congélateur à -20°C pour le dosage des paramètres du stress oxydant (GSH, CAT, MDA).

2. Méthodes

2.1. Mesure de l'activité des transaminases plasmatiques

➤ Alanine aminotransférase (ALAT/TGP)

Principe

L'alanine-aminotransférase (ALT ou GPT) catalyse le transfert du groupement amino 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 [139,,140].



La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon (sérum) [141].

Calcul de la concentration

La concentration d'alanine aminotransférase est calculée par la formule suivante

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

Le coefficient d'extinction moléculaire (ϵ) du NaDH à 340 nm est de 6300, le trajet optique (l) de 1cm, le volume réactionnel total (Vt) est 1,05 à 37°C et 1,1 à 30°C, le volume d'échantillon (Vs) de 0,05 à 37°C et 0,1 à 30°C, et 1 U/L équivalent à 0,0166 $\mu\text{kat/L}$.

2.2. Evaluation de certains paramètres du stress oxydant

2.2.1. Préparation de l'homogénat

0,5g de foie ou de poumon des différents groupes sont broyés à froid à l'aide d'un homogénéisateur ultrason en présence de 4 ml d'une solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150m M, pH 7.4), pour obtenir un homogénat. La suspension obtenu est centrifugée à (9000 tours/min, 4°C, 15 min), puis le surnageant obtenu est aliquoté dans des tubes eppendorfs et conservés à -20°C jusqu'au dosage.

2.2.2. Dosage du glutathion réduit

Le dosage du glutathion est réalisé selon la méthode de Weekbeker et Cory (1988) [142].

Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaptopurique qui résulte de la réduction de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion. Pour cela on réalise une déprotéinisation afin de garder uniquement les groupements (-SH) spécifique du glutathion.

La procédure expérimentale du dosage du glutathion est la suivante :

- ✓ Prélever 0.8 ml de l'homogénat.
- ✓ 0.2 ml de la solution d'acide salicylique (0.25%).

- ✓ Agiter et laisser pendant 15 minutes dans un bain de glace.
- ✓ Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- ✓ Prélever 0.5 ml du surnageant.
- ✓ Ajouter 1 ml du tampon Tris, pH 9.6.
- ✓ Mélanger et ajouter 0.025 ml de l'acide 5,5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) à 0.01 M.

Laisser pendant 5 min à une température ambiante et lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc réactif.

La concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$\text{GSH (nmol GSH/ mg protéine)} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13100 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg protéine}}$$

- ✓ D0 : Densité optique.
- ✓ 1 : Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation (0.8ml homogénat + 0.2 ml de l'acide salicylique).
- ✓ 1.525 : Volume total des solutions utilisées dans le dosage du GSH au niveau du surnageant (0.5 ml surnageant+1 ml Tris + 0.025 ml DTNB).
- ✓ 13100 : Coefficient d'absorbance du groupement -SH à 412 nm.
- ✓ 0.8 : Volume de l'homogénat.
- ✓ 0.5 : Volume du surnageant.

On note que la concentration du GSH est mesurée par rapport à 1 mg de protéines.

Pour cela ce dosage doit être accompagné par un dosage des protéines.

2.2.3. Dosage des protéines

La concentration de protéines est déterminée selon la méthode de Bradford (1976) qui utilise le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier réagit avec les groupements amines (-NH₂) 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).

- ✓ Pour cela, nous avons procédé aux étapes suivantes :
- ✓ Prélever 0.1 ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 5 ml du bleu de Coomassie.
- ✓ Agiter et laisser reposer 5 minutes.
- ✓ Lire à 595 nm les densités optiques contre le blanc

La concentration des protéines est déterminée par comparaison à une gamme étalon d'albumine sérique bovine (1mg/ml) préalablement réalisée dans les mêmes conditions.

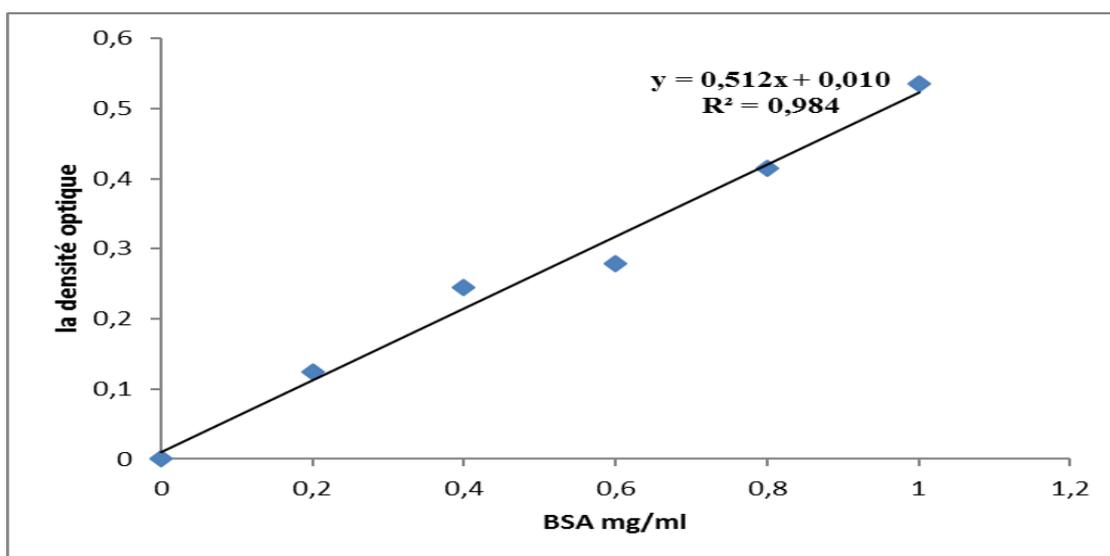


Figure 11 : La gamme d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

2.2.4. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT)

Principe :

La méthode utilisée est celle d'Aebi (1984). L'activité catalase a été mesurée à 240 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, par la variation de la densité optique consécutive à la diminution du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 25°C en présence d'une source enzymatique dans la fraction cytosolique.

Mode opératoire

On note que :

- ✓ La quantité des S9 doit être déterminée en fonction de la quantité de protéines qui est comprise entre 1 et 1,5 mg/ml.

- ✓ L'activité de la catalase décroît rapidement, il est important de respecter le même temps entre le pipetage et le moment où on place la cuve au spectrophotomètre.
- ✓ La lecture de l'absorption se fait après 15 secondes de délai et durant 60 secondes de mesure.

Calcul : l'activité de la catalase est calculée selon l'équation suivante :

$$\text{CAT} \cdot (\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{protéine}) = \frac{\Delta \text{DO}}{\varepsilon \times X \times L \times Fd}$$

ΔDO : Variation de la densité optique par minutes.

ε : Coefficient d'extinction du $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.04 \text{ Mm}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$

L : Longueur de la cuve = 1 Cm.

X : Quantité de protéine en mg/ml.

Fd : Facteur de dilution du H_2O_2 dans le tampon (0,02).

2.2.1. Dosage de malondialdéhyde (MDA)

Principe

Le MDA est un produit des réactions de peroxydation lipidique qui se forme lors de l'attaque des lipides polyinsaturés par des espèces réactives de l'oxygène générées par certains contaminants. Dans notre étude, les taux du MDA du foie et du poumon ont été évalués selon la méthode d'Ohkawa (1979). Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100 °C) entre le MDA et l'acide thiobarbiturique (TBA) d'un pigment coloré absorbant à 530 nm, extractible par les solvants organiques comme le butanol.

La procédure expérimentale du dosage, est la suivante

- ✓ Prélever 0.5ml de l'homogénat.
- ✓ Ajouter 0.5ml d'acide trichloracétique (TCA) 20%.
- ✓ Ajouter 1ml d'acide thiobarbiturique (TBA) 0.67%
- ✓ Mélanger et incuber au bain marie à une température de 100 C° durant 15 minutes.
- ✓ Refroidir et additionner 4ml de n-butanol.
- ✓ Centrifuger pendant 15 minutes à 3000 tours/min.

- ✓ Récupérer le surnageant, et lire la densité optique à 530 nm contre le blanc.

Calcul de la concentration du MDA

La quantité du MDA dans l'échantillon est exprimée en nmol/gramme de tissu (foie ou poumon). Elle est obtenue grâce à une courbe standard réalisée avec du 1,1',3,3'-tetraethoxypropane faite dans les mêmes conditions.

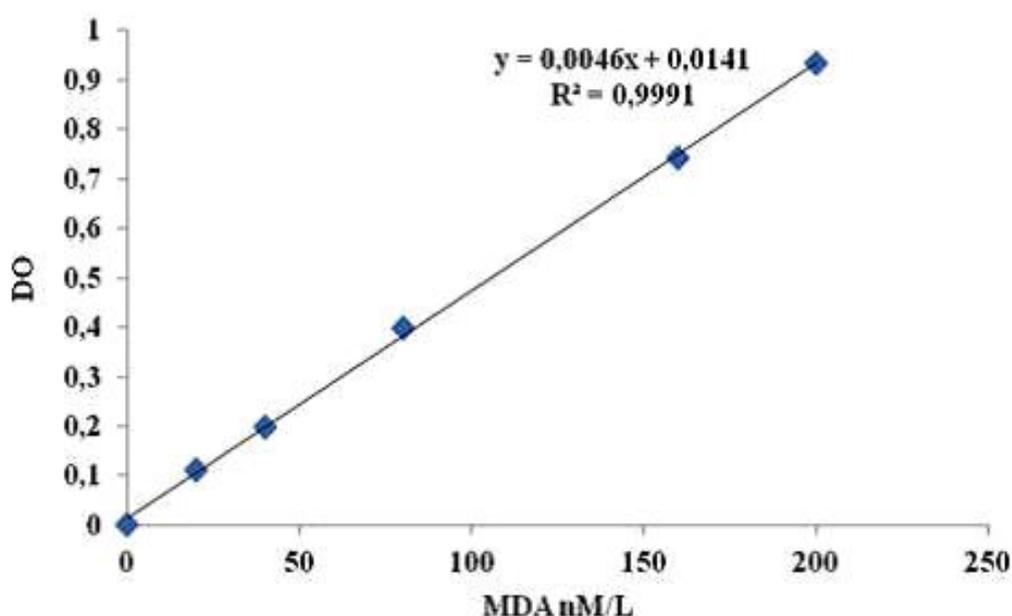


Figure12 : Coubre standard pour le calcul de MDA

2.3. Etude histologique

Les coupes histologiques ont été réalisées au laboratoire d'anatomie-pathologique à Annaba

La technique utilisée est celle décrite par Houlot (1984) [144], qui comporte les étapes suivantes.

2.3.1. Fixation

Elle a pour but d'immobiliser les structures cellulaires tout en conservant leurs morphologies. Le temps de la fixation est essentiel pour la réussite de la technique histologique. Elle doit être réalisée rapidement après la décapitation des rats et prélèvement des organes. Des fragments de foie (de surface 1 à 2 cm² et d'épaisseur 2

mm) ont été mis dans le fixateur (Bouin alcoolique), il permet de durcir l'échantillon sans l'abîmer. Après 48 heures de fixation les pièces d'organes sont retirées du Bouin puis rincées à l'eau distillée. Des coupes transversales faites par l'anatomopathologiste. Les échantillons sont placés dans des cassettes spéciales à parois trouées afin de permettre le passage des liquides au cours des manipulations qui suivent

2.3.2. Déshydratation

Comme la paraffine n'est pas miscible à l'eau, les échantillons doivent être alors complètement déshydratés avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation, on assiste donc à une substitution par le xylène. La déshydratation se fait grâce à un automate qui fait immerger les échantillons dans des bains d'éthanol à concentration croissante (70, 95 et 100 %), puis dans des bains de xylène qui constitue un agent éclaircissant donnant au tissu une certaine transparence. Ensuite, dans l'étuve le xylène s'évapore des pièces anatomiques. Cette étape est réalisée par un appareil appelé le circulateur.

2.3.3. Inclusion et réalisation des blocs

Elle ne peut être satisfaisante que si l'échantillon est complètement déshydraté et ne contient plus de solvant intermédiaire (alcool).

Les pièces sont plongées (2 heures) dans des bains de paraffine liquide fondue à 60° C. Les échantillons étant imbibés de paraffine sont placés dans des moules appelés les barres de Leuckart, puis sont remplis de paraffine. Cette opération fait appel à des appareils « dits à inclusion » refermant un réservoir de paraffine maintenue à l'état liquide par un système de chauffage, un petit robinet et une plaque métallique réfrigérée pour aboutir à la solidification rapide (10 à 15 min) du bloc de paraffine contenant le tissu.

2.3.4. Confection des coupes

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir des coupes au microtome de 4 à 5 µm. Les rubans de paraffine obtenus sont étalés sur des lames porte-objet, puis déplissés et fixés par une eau gélatineuse chauffée à 40 °C. Les lames sont marquées au nom des différents lots à l'aide d'un crayon d'argent, ensuite séchées dans une étuve à 100 °C pendant 1 heure.

2.3.5. Coloration et montage

Il existe plusieurs méthodes de coloration qui varient en fonction des tissus. La méthode de l'Hématéine-Eosine (HE) est la plus utilisée. La coloration suit les étapes suivantes

- ✓ Déposer les coupes dans un bain de xylène pendant 10 minutes afin de déparaffiner les échantillons et faire pénétrer les colorants.
- ✓ La réhydratation des coupes se fait par passage dans un bain d'éthanol pendant 10 minutes puis hydrater les lames par l'eau du robinet.
- ✓ Immerger les coupes dans un bain d'Hématéine (10 minutes) qui colore en bleu violacé les structures basophiles (noyaux cellulaires). Rincer à l'eau courante.
- ✓ Le deuxième colorant utilisé est l'éosine qui colore en rose les structures acidophiles (cytoplasmes cellulaires). Rincer à l'eau courante.
- ✓ Le montage consiste à fixer une lamelle en verre sur les coupes histologiques après coloration. Cette étape permet la :
 - ✓ Protection mécanique des coupes.
 - ✓ Protection chimique des colorants.
 - ✓ Sécher les lames puis observer au microscope optique équipé d'un appareil photographique.

2.4. Analyse statistique des résultats

Les résultats ont été représentés sous forme de moyenne plus ou moins (Moy \pm SD) l'écart type moyen, la comparaison entre les différents groupes est effectuée après une analyse de la variance (ANOVA), réalisée grâce au logiciel Graph Pad Prism 5. Les différences sont considérées comme

- ✓ Significatives lorsque (*P < 0,05).
- ✓ Hautement significative comparant au témoin (**P < 0,01).
- ✓ Très hautement significative comparant au témoin (**P < 0,001).
- ✓ Avec P : Seuil de signification.

Partie Expérimentale
Résultats et Discussions

Résultats et discussion

1. Effet du traitement sur la croissance corporelle

Nos résultats ne montrent aucun changement significatif, de la croissance physiologique des rats traités en comparaison avec les témoins.

On note également, une diminution non significative du gain de poids chez les lots traités par le FA, la combinaison (FA/GR150mg) et (FA/GR200mg) par rapport au lot témoin (figure 13, annexe02)

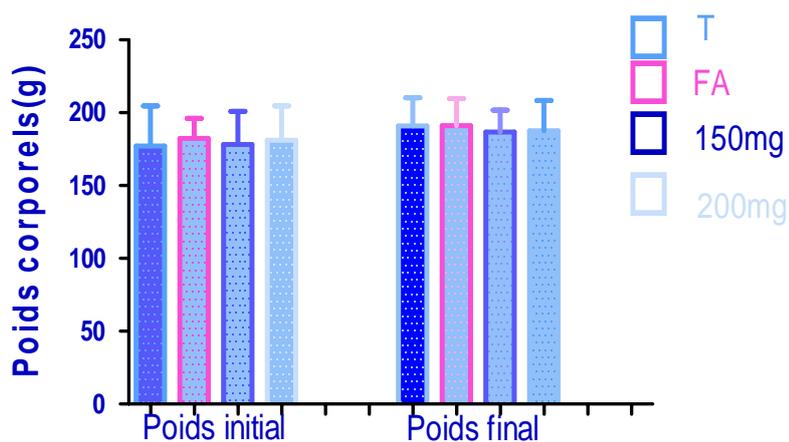


Figure 13 : Variation du poids corporel en (g) des rats traités et témoins après le traitement

2. Influence du traitement sur la variation des paramètres du stress oxydant

Les paramètres du stress oxydant (GSH, CAT et MDA) analysés dans le foie et les poumons des rats traités et témoins, sont présentés dans les figures (14-18).

2.1. Le dosage du foie

2.1.1. Glutathion réduit (GSH)

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative du taux de GSH chez

les lots traités par rapport au lot témoin.

Toutefois, l'injection intrapéritonéale du formaldéhyde à raison de 10 mg/kg pendant 10 jours, a entraîné une diminution non significative (-41,8%) du taux de GSH hépatique par rapport au lot témoin.

En revanche, le traitement des rats par la combinaison (FA/GR150mg) et (FA/GR200mg) pendant 14 jours a rétabli les taux du GSH à leurs niveaux normaux. On a noté également, une augmentation non significative (+68,42 % et +31,32%) de la teneur en GSH en comparaison avec le lot traité par FA. (Figure 14, annexe01)

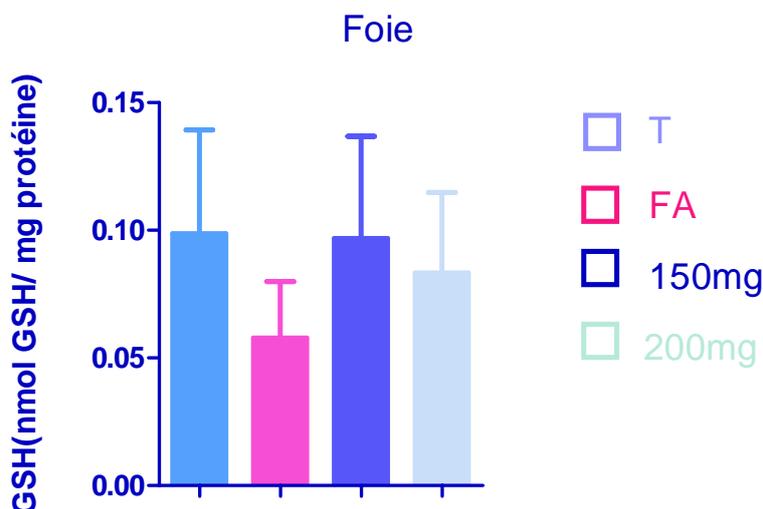


Figure14 : Variation de la teneur en glutathion (nmol/mg prot) dans le foie des rats témoins et traités.

2.1.2. Catalase (CAT)

Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative de l'activité de la catalase dans le foie des rats traités par rapport aux témoins.

Nos résultats ont révélé également, une diminution non significative de l'activité enzymatique de la catalase chez le lot traité par FA (-78%) en comparaison avec le lot témoin.

En revanche, chez les lots traités par la combinaison (FA/GR150mg) et (FA/GR200mg),

on a signalé une amélioration de l'activité de la catalase (+14,16%) et (-8,3%) respectivement par rapport au lot traité par le FA.

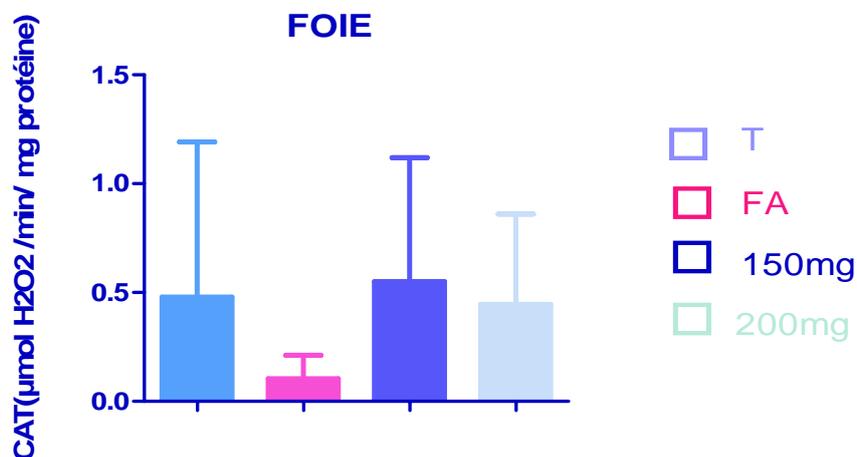


Figure15 : Variation de l'activité enzymatique du catalase ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) dans le foie des rats témoins et traités.

2.1.3 Malondialdéhyde (MDA)

Les résultats obtenus ne révèlent aucune différence significative du taux de MDA dans le foie des rats traités par rapport aux témoins.

Par contre, nous avons enregistré une augmentation non significative de MDA (+21,82%), chez le lot traité par le FA, une légère diminution chez le lot traité par (FA/GR150mg) (-9,98%), et une diminution non significative chez le lot traité par (FA/GR200mg) (-68,17%) par rapport au lot témoin.

Une diminution non significative chez les lots traités par la combinaison(FA/GR150mg) et (FA/GR200mg), par rapport au lot traité par FA (-26,13% et -73,87%) respectivement.

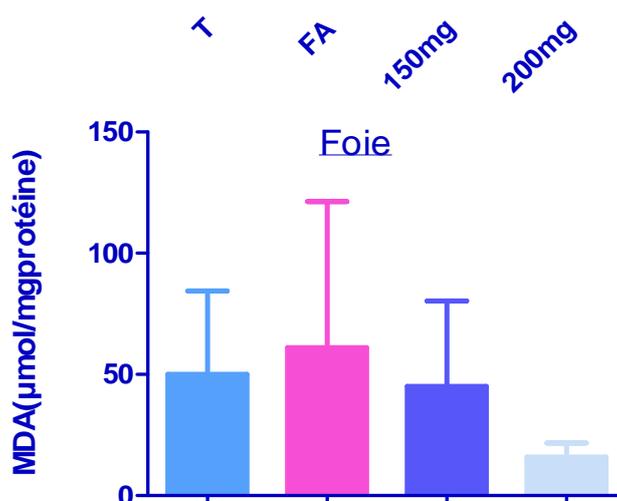


Figure 16 : Variation du taux de malondialdéhyde ($\mu\text{mol/mg prot}$) dans le foie des rats témoins et traités.

2.2. Le dosage du poumon

2.2.1. Catalase (CAT)

Aucune différence significative de l'activité enzymatique de la catalase est observée chez les lots traités par rapport au témoin

Les résultats montrent une légère diminution de l'activité enzymatique de la catalase chez le lot traité par FA (-26,23%), chez le lot traité par (150mg/kg + FA) (-19,55%) et une très légère augmentation (+2%) le chez lot traité par (200mg/kg + FA) par rapport au lot témoin. Mais par rapport au lot traité par FA les résultats montrent une augmentation (+9% et +38,36%) de l'activité enzymatique chez les deux lots respectivement.

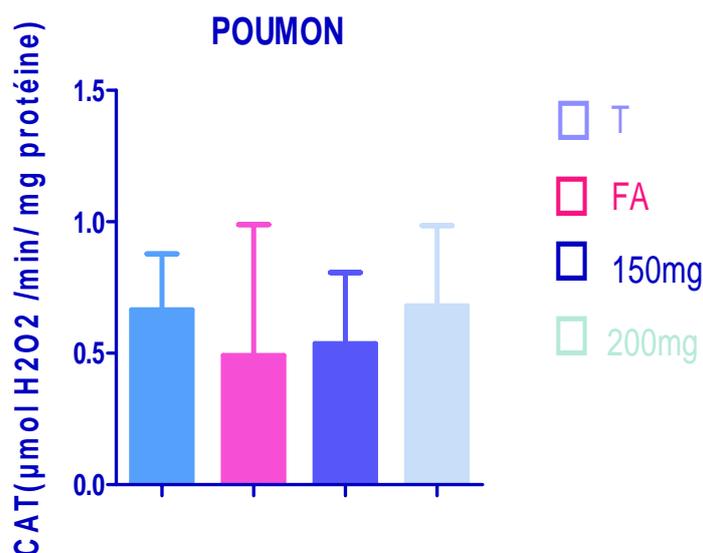


Figure 17 : Variation de l'activité enzymatique du catalase ($\mu\text{mol}/\text{mg prot}$) dans les poumons des rats témoins et traités.

2.2.2. Malondialdéhyde (MDA)

Aucune différence significative du taux de MDA n'a été enregistrée chez les lots traités par rapport au témoin.

Nos résultats ont révélé une diminution non significative du taux de MDA chez le lot traité par FA (-67,16%), par (150mg/kg+ FA) (-62,68%) et une légère diminution chez le lot traité par (200mg/kg + FA) (-27,71%) par rapport au lot témoin. Par contre une augmentation non significative chez les lots traités par la combinaison (FA/GR150mg) et (FA/GR200mg), en comparaison avec lot traité par FA (+13,63%) et (+120%) respectivement.

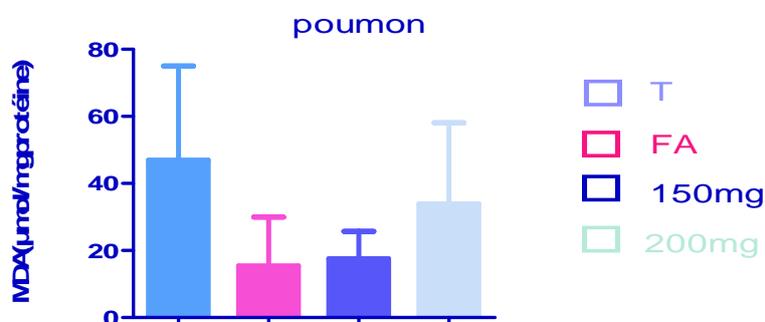


Figure 18 : Variation du taux malondialdéhyde (nmol/mg prot) dans les poumons des rats témoins et traités.

3. Influence du traitement sur l'activité des transaminases (TGP) ALAT

Les résultats obtenus ne révèlent aucune différence significative du taux de l'ALAT chez les rats traités par rapport aux témoins.

Par contre, nous avons enregistré également, une augmentation non significative (+192%) du taux de TGP chez les lots traités par FA en comparaison avec le lot témoin. Par contre on a signalé une diminution non significative (-56,75% et -35,11%) chez les lots traités par (150mg/kg+ FA) et par (200mg/kg+ FA) par rapport au lot traité par FA respectivement.

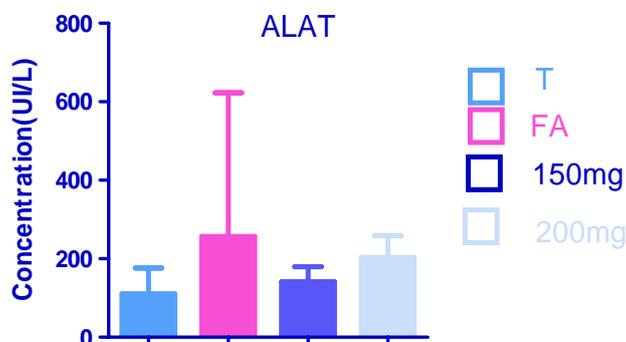


Figure 19 : Variation de l'activité enzymatique de la TGP (UI/l) chez les rats témoins et traités.

4. Effet de différents traitements sur la structure histologique du foie

L'histologie du foie d'un rat témoin montre des cellules hépatiques normales, avec une veine Centro lobulaire clairement visible (Figure 20).

Chez le lot traité par le formaldéhyde, l'observation microscopique révèle des modifications structurales bien visibles par rapport au lot témoin (Figure 21), se traduisant par une accumulation des cellules inflammatoires et une nécrose hépatique caractérisé par une clarification de la couleur du cytoplasme.

Ces formes des atteintes tissulaires sont moins importantes chez ceux traités par la combinaison qui présentent une structure similaire à celle du témoin (Figure 22,23).

- Foie

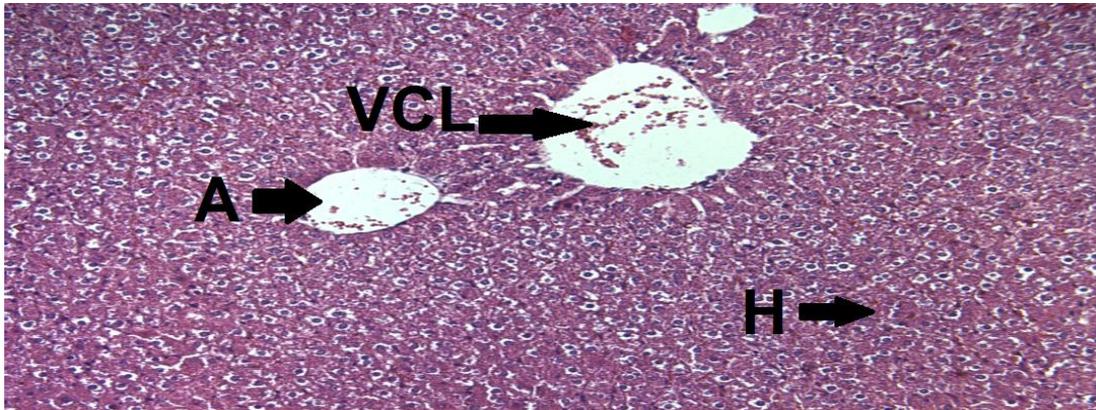


Figure 20 : Coupe histologique du foie d'un rat témoin (H&E X10). (VCL) : veine centro lobulaire hépatique ; H : hépatocyte, A : Artère

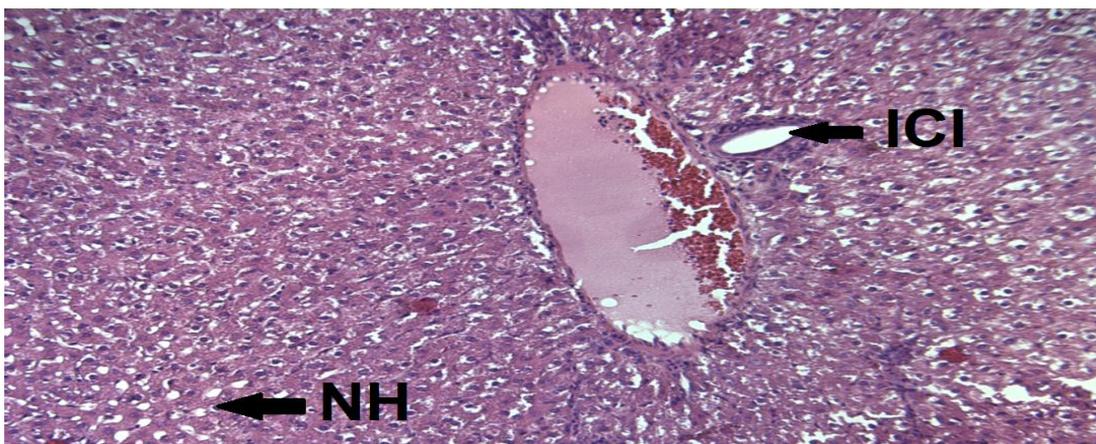


Figure 21 : Coupe histologique du foie d'un rat traité par le formaldéhyde pendant 10 jours. (H&E X10).(ICI) : Infiltration des cellules inflammatoires, NH : nécrose hépatique.

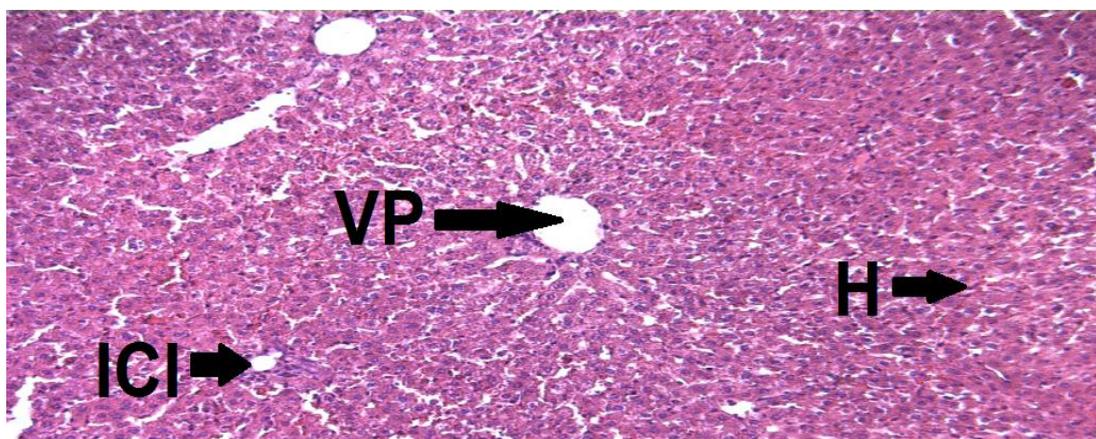


Figure 22 : Coupe histologique du foie d'un rat traité par la combinaison (GR150mg + FA) pendant 14 jours (H&E X10). (VP) : veine porte hépatique ; H : hépatocyte, ICI : Infiltration des cellules inflammatoires.

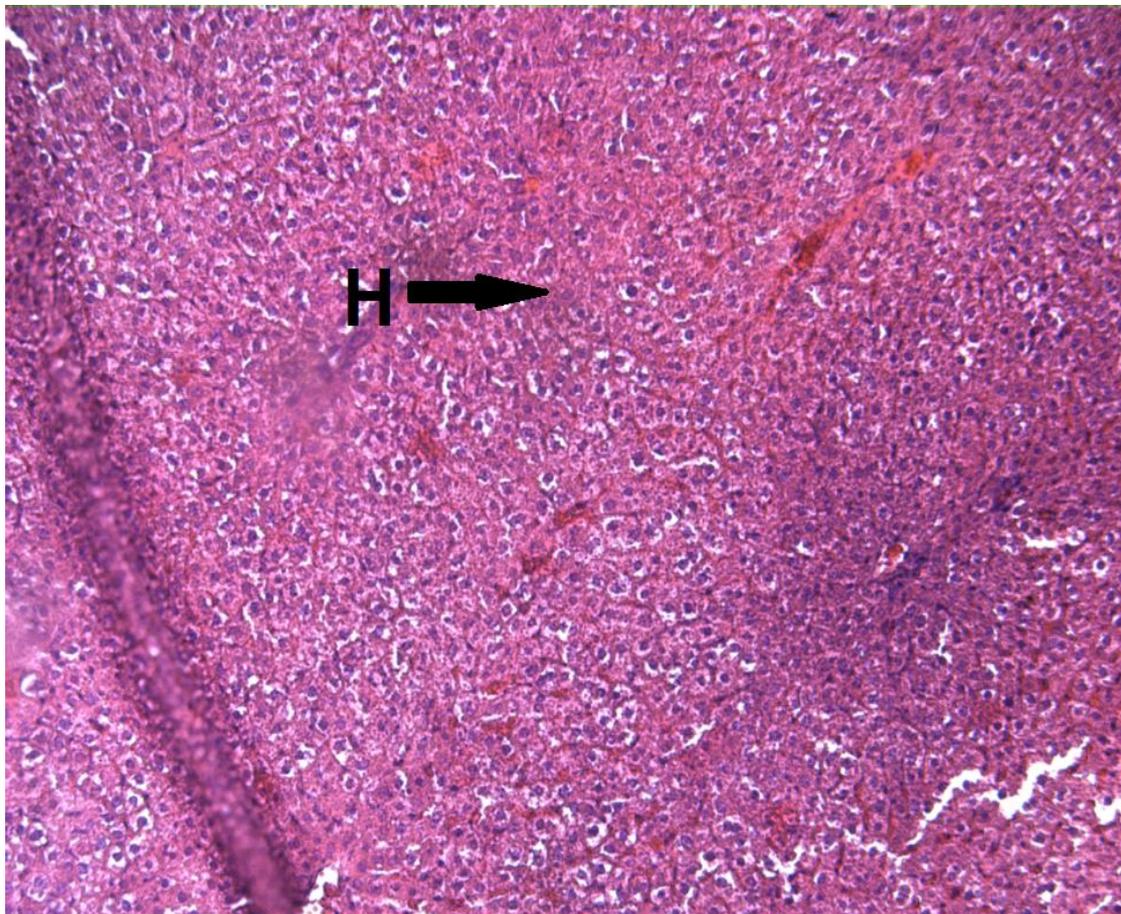


Figure 23 : Coupe histologique du foie d'un rat traité par la combinaison (GR200mg + FA) pendant 14 jours (H&E X10). H : hépatocyte

✚ Discussion

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact du formaldéhyde sur la variation de certains paramètres physiologiques ainsi que l'effet protecteur de la supplémentation en gelée royale chez des rats traités par ce polluant toxique.

La réduction de poids corporel est utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé générale du rat.

Les résultats obtenus ne montrent aucun changement significatif sur la croissance physiologique des rats traités en comparaison avec le groupe témoin.

Ces observations sont en accord avec d'autres recherches effectuées par, **Johannsen FR, et al ; Til HP, et al ; Takahashi M, et al [145,146 et 147]**.

L'organisme se protège en permanence contre la formation et l'agression des oxydants grâce à divers mécanismes de défense tant enzymatiques que non enzymatiques [148]. Parmi ces derniers, on retrouve principalement le glutathion réduit (GSH), il permet à l'organisme de se débarrasser des toxines et polluants indésirables, en formant avec eux un composé hydrosoluble susceptible d'être excrété dans l'urine ou la bile [149]. Il est donc intéressant d'étudier le niveau de GSH dans le foie, les poumons.

En effet, l'injection intrapéritonéale de 10 mg/kg de FA a induit un stress oxydatif marqué essentiellement par une diminution des niveaux de GSH hépatique en comparaison avec les témoins. Cette déplétion observée dans notre étude pourrait être due à sa forte réactivité avec les composants hautement réactifs comme le formaldéhyde [150,151].

Nos résultats sont corrélés avec des études réalisées par **Skrzydowska E, et al ; Farbiszewski R et al [152]**, qui ont constaté une diminution significative du glutathion au niveau du foie après intoxication par le méthanol. Ce dernier est oxydé par l'alcool déshydrogénase en formaldéhyde [153], le FA est rapidement oxydé par la GSH-FDH en acide formique.

De plus, une autre étude aussi réalisé par [154] **Sögüt et al., 2004**, sur des rats exposés au FA par inhalation pendant 4 semaines, a révélé une remarquable déplétion du GSH hépatique.

La supplémentation avec la gelée royale (**150mg/kg et 200mg/kg**) a réduit le stress oxydant en rétablissant les niveaux du GSH hépatique. Ces résultats sont similaires à ceux démontré par **Liu et al., [155]**, qui ont suggéré que la gelée royale exerce un effet

scavenger des radicaux libres. Ces effets protecteurs sont dû à la présence des composés phénoliques incluant les flavonoïdes [156]. En effet, les composés phénoliques de la gelée royale sont collectés par les abeilles à partir des plantes [157].

De plus, les propriétés antioxydantes des polyphénols résultent de leur réactivité élevée comme donneurs d'hydrogène ou d'électrons et de leur capacité à stabiliser l'électron non apparié, de leur aptitude à séquestrer des métaux de transition empêchant par la suite la réaction de Fenton et la production de $\text{OH}\cdot$ [158].

Les flavonoïdes sont aussi connus par leurs activités biologiques différentes, antiinflammatoires [159] et antioxydantes [160,161,162].

D'autre part, les composés phénoliques sont connus pour leurs capacités de recycler la vitamine E et de piéger les radicaux libres, ceci peut donc participer directement à une réduction de l'utilisation du GSH [163,164].

Différentes études ont aussi reporté que la gelée royale possède un effet potentiellement protecteur vis-à-vis la toxicité induite par la fumonisins (mycotoxine) [165].

Kamatura *et al.*, [166], ont également reporté que la supplémentation en gelée royale diminue l'expression des gènes du cytochrome P540, augmente la détoxification des enzymes catalysant la peroxydation des lipides, et augmente l'expression des gènes de la glutathion-S-transférase et la glutathion peroxydase.

De plus, la gelée royale exerce des effets hépatoprotecteurs [167,168].

Ainsi, il a été suggéré que la gelée royale contient des glycoprotéines stimulant le développement des hépatocytes et la régénération du foie (**Zimmermann, 2002**). Elle contient également, des oligoéléments et vitamines qui jouent un rôle protecteur vis-à-vis les radicaux libres. En plus, de la vitamine C, la gelée royale renferme de la vitamine E à l'état de trace et qui possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-radicalaires [168].

La peroxydation lipidique (LPO) est le processus de la dégradation oxydative des acides gras polyinsaturés et son occurrence dans les membranes biologiques cause des changements dans la structure et la fonction membranaires et mène à la diminution de la fluidité de la membrane et l'inactivation de plusieurs enzymes membranaires [169].

Le malondialdéhyde (MDA) est l'un des plus importants marqueurs du stress oxydatif.

Il a été mesuré dans le foie et les poumons pour refléter le degré de la peroxydation lipidique. Impliquant principalement les acides gras polyinsaturés, ce processus

endommage la structure et la fonction cellulaire responsable de la perte de l'intégrité membranaire, et la lyse cellulaire [170,171].

Dans la présente étude, l'exposition des rats au FA a eu comme conséquence une augmentation de la peroxydation lipidique, indiquée par l'augmentation du taux en MDA dans le foie. Ceci montre bien que le FA est capable de promouvoir la génération des ERO, qui se traduit par la peroxydation lipidique (LPO) dans les tissus hépatiques, et suggérant leurs effets délétères dans ces tissus. En effet, l'augmentation de la peroxydation cellulaire est dépendante de la concentration intracellulaire en radicaux libres. L'augmentation du taux des ERO à l'intérieur des cellules peut être due soit à une surproduction de ces substances réactives ou à une diminution de la capacité de les neutraliser [172,173].

Il a été prouvé que le FA perturbe la balance oxydant-antioxydant dans divers tissus, induit un stress oxydatif et des altérations tissulaires [174].

Sogut *et al* [154], ont également reporté des niveaux en MDA très élevés chez les groupes exposés au FA par inhalation comparés aux témoins. Selon, **Kum *et al.***, [175], cette augmentation en MDA est corrélée à l'augmentation de la production des enzymes impliquées dans la détoxification du formaldéhyde.

Il s'avère également que l'augmentation de la peroxydation lipidique est une conséquence de l'épuisement des réserves en glutathion réduit, qui sont capables de modérer la LPO [176].

Ces observations sont en accord avec plusieurs études sur l'exposition au FA dans différents organes et tissus (foie, rein, organes lymphoïdes, testicules, ...) chez les animaux d'expérience [177,178,179,180,181,182,183,184,185,186].

Par ailleurs, l'administration de la gelée royale aux groupes traités par le FA a diminué le taux du MDA dans le foie. En effet, la gelée royale est riche en acides aminés biologiquement actifs comme : acide aspartique, cystéine, cystine, tyrosine, glycine, lysine, leucine, valine, et isoleucine. De plus, la gelée royale a été prouvée d'avoir d'excellentes propriétés antioxydantes, en rétablissant les niveaux du GSH et en inhibant la production du MDA [187]. Cette activité est positivement associée au contenu en acides aminés [188,189].

La glycine a été prouvée d'avoir un effet antioxydant en protégeant les cellules vis-à-vis divers substances toxiques comme les métaux [190].

La lysine, un acide aminé nucléophile, a été reportée pour son rôle de faciliter l'échange des électrophiles dérivés de la peroxydation lipidique [191].

La cystine et cystéine sont impliquées dans la synthèse de la GSH, un puissant antioxydant intracellulaire. La GSH joue un rôle important dans l'élimination des ERO et la détoxification des cancérigènes soit directement, soit en synergie avec les enzymes antioxydantes [192].

La présente étude a également montré que l'augmentation du MDA est en synergie avec la diminution de l'activité des enzymes antioxydantes en particulier la catalase, chez les rats traités par le formaldéhyde en comparaison aux rats témoins.

Cette diminution pourrait probablement être due à l'inhibition de l'activité de cette enzyme par le FA.

La catalase est une enzyme ubiquitaire et fait partie de la première ligne de défense antioxydante importante [176]. Elle réduit l'H₂O₂ en H₂O et O₂ pour empêcher l'induction d'un état de stress oxydant, maintenir l'homéostasie des cellules et jouer un rôle important dans l'élimination des ERO [193].

Plusieurs études ont prouvé l'effet inhibiteur du FA sur l'activité enzymatique de la CAT dans différents organes et tissus chez les animaux d'expérience **Gulec et al.**, [194], ont montré également que l'activité de la catalase a été diminuée significativement dans le foie des rats traités par injection du FA pendant 10 jours d'intoxication.

On outre, l'oxydation du FA peut être réalisée par la catalase peroxisomale, mais, cette réaction représente probablement une voie mineure du métabolisme du FA, due à une production faible de peroxyde d'hydrogène [195].

Il s'avère que le peroxyde d'hydrogène produit a été complètement détoxifié dans le foie par le glutathion peroxydase. Outre que la catalase, le métabolisme de l'H₂O₂ dans l'organisme est réalisé par le glutathion peroxydase. Dans ce cas, l'activité de la catalase n'est pas nécessairement significative. En effet, la CAT et le GPx catalysent la réduction de l'H₂O₂ en oxygène et en eau [**Gulec et al.**, 2006].

Par ailleurs, le traitement par la gelée royale a amélioré l'activité de la catalase dans le foie chez les rats traités par le formaldéhyde. Cette amélioration en présence de la gelée royale est en accord avec les résultats obtenus par **Silici et al.**, [196] après traitement des rats avec cisplatine (un agent chimiothérapeutique).

Les poumons sont constamment exposés aux variétés de polluants atmosphériques comme, la fumée de cigarette, l'ozone, et le dioxyde nitrique, ils constituent la plus large

surface endothéliale parmi les autres organes, ce qui rends les poumons l'organe cible pour les oxydants et les xénobiotiques [205,206].

Il a été admis que le stress oxydant est une situation importante dans laquelle le FA exerce ses effets toxiques, en perturbant la balance oxydant-antioxydant dans les poumons, et en provoquant une infiltration des leucocytes inflammatoires [207,208].

Par ailleurs, divers nonenzymatiques antioxydants sont présents dans les poumons, le glutathion est le plus abondant, il joue un rôle primordial dans la protection des cellules à travers la conjugaison des électrophiles et la réduction des ROS [209].

Nous avons également évalué l'activité de la catalase et du MDA dans les poumons et nous avons constaté qu'aucune différence significative n'est observée chez les lots traités par rapport au lot témoin.

Le formaldéhyde est oxydé par le formaldéhyde déshydrogénase (FDH), et cette enzyme est dépendant du GSH. La GSH est le plus important antioxydant présent dans l'organisme, et constitue une source importante de la défense vis-à-vis les oxydants et les agents inflammatoires dans les poumons [210].

Par ailleurs, des recherches ont suggéré que la sévérité des altérations tissulaires est corrélée à la dose et la durée d'exposition au formaldéhyde.

De plus, des études sur le métabolisme rapide du FA et ses effets toxiques sur l'homme, ont suggéré que ces effets sont dus à l'acide formique, métabolite majeur du FA, l'acide formique est éliminé par deux voies, métabolisme dans le foie, et excrétion urinaire [211].

Les transaminases (ASAT, ALAT) et la phosphatase alcaline sont des biomarqueurs de la fonction hépatique [197,198].

En effet, l'augmentation des concentrations plasmatiques en ASAT et ALP ne reflète seulement l'atteinte hépatique, mais aussi les altérations au niveau de divers tissus et organes, il semble que les niveaux élevés de l'ALAT sont spécifiques des altérations hépatiques [199,200,201].

Dans la présente étude, nous avons constaté une augmentation de l'ALAT chez les rats traités par le FA en comparaison avec les rats témoins, ceci est lié à l'effet hépatotoxique

du FA. En effet, cette élévation provoque la lésion des cellules hépatiques qui déversent leurs contenus tels que les transaminases dans le sang [202].

Nous avons également constaté un rétablissement du taux plasmatique de l'ALAT après l'administration de la gelée royale aux rats traités par le FA. Cette interprétation est renforcée par des résultats obtenus par **Karadeniz et al.**, [203], qui ont démontrés que la gelée royale a inhibée les effets hépatotoxiques induits par la cisplatine. De même **Kanbur et al.** [204] ont reportés les mêmes résultats chez des rats traités par le paracétamol.

Globalement, les résultats obtenus dans le présent travail indiquent que le FA n'a pas d'organe cible à distance de l'exposition, nos résultats ont révélé que le foie est l'organe le plus touché par les effets toxiques du FA.

Différentes études ont démontré les effets hépatotoxiques du FA [213,214].

Dans notre étude, l'observation microscopique du tissu hépatique a révélé une infiltration des cellules inflammatoires autour de la veine porte et l'artère avec cytoplasme clair et une dégénérescence des hépatocytes.

Ces résultats sont similaires à ceux de **Shang et al ; Kanbur et al.**, [215].

L'administration de la gelée royale a réduit les lésions hépatiques et le nombre des cellules inflammatoires.

En effet, le foie est l'organe du métabolisme de différents composants toxiques et non toxiques incluant le formaldéhyde, dans cette étude, l'inflammation et les lésions hépatiques ont été observés dans les sections tissulaires du foie des rats traités par le FA.

5. Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de la gelée royale vis-à-vis le stress oxydatif induit par le formaldéhyde chez des rats femelles de la souche Wistar.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- *L'administration du formaldéhyde par voie intrapéritonéale chez les rats, a engendré :*

- ✓ Aucune variation du poids corporel durant la période du traitement ;
 - ✓ Une perturbation au niveau de certains biomarqueurs de l'activité hépatique traduisant une augmentation de l'activité enzymatique d'ALAT ;
 - ✓ Une peroxydation lipidique au niveau du foie engendrant des lésions au niveau des membranes cellulaires ;
 - ✓ Une perturbation des activités de quelques antioxydants telles que la CAT et la GSH ;
 - ✓ Le formaldéhyde n'a pas d'effet sur la peroxydation lipidique et l'activité de la catalase au niveau du poumon.
- ***La supplémentation en gelée royale chez les rats traités par le formaldéhyde a provoqué :***
- ✓ Une réduction de l'activité des biomarqueurs de la cytolysse hépatique (ALAT) ;
 - ✓ Une baisse de la peroxydation lipidique hépatique engendrant une protection contre les lésions des membranes cellulaires ;
 - ✓ Une amélioration du statut antioxydant telles que la CAT et la GSH au niveau hépatique ;
 - ✓ Au niveau pulmonaire, la gelée royale a amélioré l'activité de la catalase avec la dose 150mg/kg. Par contre, la dose 200mg/kg a augmenté le taux de MDA, il semble que la dose 200mg/kg exerce un effet peroxydant.
- ***L'étude histologique au niveau du foie a révélé que :***
- ✓ Le FA a provoqué une accumulation des cellules inflammatoires et une nécrose hépatique caractérisé par une clarification de la couleur du cytoplasme des hépatocytes.
 - ✓ L'administration de la gelée royale a réduit les lésions hépatiques et le nombre des cellules inflammatoires.

Il serait intéressant à l'avenir de :

- Tester l'effet curatif de la gelée royale après le traitement par le FA ;
- Prolonger la durée du traitement ;
- Tester la capacité antioxydante et antimicrobienne de la GR in vitro ;
- Evaluer l'effet de la gelée royale sur la capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis du radical DPPH

Références

Références bibliographiques :

- [1] **AFSSET. (2007).** Valeurs guides de qualité d'air intérieur, Le formaldéhyde.
- [2] **SAITO Y, NISHIO K, YOSHIDA Y. (2005).** Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. *Toxicology*; 210(2-3): 235-45
- [3] **TENG S, BEARD K, POURAHMAD J. (2001).** The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact*;130-132(1-3): 285-96.
- [4] **MA T, HARRIS M. (1988).** Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutat. Res*; 196(1): 37-59.
- [5] **KILBURN K. (1994).** Neurobehavioral impairment and seizures from formaldehyde. *Arch. Environ. Health*; 49(1): 37-44.
- [6] **GULEC M, GUREL A, ARMUTCU F. (2006).** Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol. Cell. Biochem* ; 290(1-2) : 61-7.
- [7] **Favier. (2003).** Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*; 108- 115.
- [8] **BOUKRAA L. (2008).** Addictive action of royal jelly and honey against *Staphylococcus aureus*. *J Med Food*.
- [9] **CAILLAS A. (1977.)** Si la gelée royale m'était contée, Editions de la pensée moderne, Orléans.
- [10] **Almasiova V, Holovska K, Tarabova L. (2012).** Structural and ultrastructural study of the rabbit testes exposed to carbamate insecticide. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*; 47 :1319-1328.
- [11] **Djellouli F. (2013).** Aspect qualitatif et quantitatif des lipoprotéines sériques chez les agriculteurs utilisant les pesticides. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en biologie.

- [12] **Tremellen K. (2008).** Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. *Hum Reprod Update* ; 14 : 243-258.
- [13] **Yzydorkzyk C. (2011).** Rôle du stress oxydant en période néonatale dans l'hypertension artérielle et la dysfonction vasculaire et métabolique de l'adulte.
- [14] **Gutteridge J. (1993).** Free radicals in disease processes: a complication of cause and consequence. *Free Radic. Res. Commun*; 19: 141-158.
- [15] **Baillie T, Davis A. (1993).** Mass spectrometry in the analysis of glutathione conjugates. *Biol Mass Spectrom*; 22:319–325.
- [16] **Sorg O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies* ; 327 : 649-662.
- [17] **Koechlin-Ramonatxo C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme* ; 20 : 165-177.
- [18] **Hink U, Li H, Mollnau H. (2001).** Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ.Res*;88: 14-22.
- [19] **Beckman b, Amesbn. (1998).** The radical theory of aging matures *physiol Rev*;78: 547-581.
- [20] **Bartosz G. (2003).** Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*; 9: 5-21.
- [21] **Kohen R, Nyska. (2002).** An oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic pathology*; 30: 620-650.
- [22] **Del Rio L, Corpus F, Sandalio L. (1996).** Peroxisoms as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. *Biochemical Society Transactions*; 24: 434-438.
- [23] **Cadenas E, Davies J. (2000).** Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging, *Free Radical Biology and Medicine*; 29 (3-4): 222-230.

- [24] **Delattre-Beaudeau J, Bonnefont-Roisselot. (2005).** Radicaux libres et stress oxydant : aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier édition TEC & DOC éditions médicales internationales Paris ; 1-405.
- [25] **Reeves A. (2002).** Métabolisme oxydatif du neutrophile, Nature ; 416 : 291-97.
- [26] **Gardès-Albert M, Abedinzadeh Z, Jore D. (2003).** Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique; 91-95.
- [27] **Crane B, Arvai A, Ghosh DK. (1998).** Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate, Science; 297: 2121-2126.
- [28] **Favier A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique; 108-115.
- [29] **Cai H, Harrison D. (2000).** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Re; 87(10): 840-844.
- [30] **Sutherland B, Harber L, Kochevar I. (1980).** Pyrimidin dimer formation and repair in human skin. Cancer Res; 40:3181-5.
- [31] **Hu Y, Block G, Norkus E (2006).** Relations of glycemic index and glycemic load with plasma oxidative stress markers. Am J Clin Nutr; 84: 70-76.
- [32] **Meral I, Kanter M. (2003).** Effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on selected mineral status and hematological values in CCl₄-treated rats. Biol Trace Elem Res; 96: 263-270.
- [33] **Shimizu T, Bowers A, Budzynski C (2004).** What does a pigeon (*Columba livia*) brain look like during homing? Selective examination of ZENK expression; 118: 845-851.
- [34] **Wang Y (2008).** DNA lesions induced by reactive oxygen species. Chem Res Toxicol; 21: 276-281.
- [35] **Stadtman E (1993).** Oxydation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and, by metal catalyzed reactions. Annu. Rev. Biochem. 62 :797-821.

- [36] Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 13: 341-390.
- [37] Levine R, Garland D, Oliver C (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 108: 652-659.
- [38] Buysea S, Paugam-Burtzb J, Stoccoc F (2007). Adaptation des thérapeutiques médicamenteuses en cas d'insuffisance hépatocellulaire. *Réanimation.* 16 :576- 586.
- [39] Bayr H (2005). Reactive oxygen species. *Critical care medicine.* 33(12) :498-501.
- [40] Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev;* 82: 47-95.
- [41] Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology;* 30: 620-650.
- [42] Tenhunen R, Marver H, Schmid R (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc.Natl.Acad. Acad Sci U.S.A.* 61: 748-755.
- [43] Sentman M, Granstrom M, Jakobson H (2006). Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc containing superoxide dismutase. *J Biol Chem;* 281: 6904-6909.
- [44] Bounous G (2000). Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.;* 20(6C): 4785-92.
- [45] Brigelius-Flohe R, Traber G (1999). Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J1.;* 3: 1145-1155.
- [46] Zelko N, Marian T, Folz R. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine.* 33: 337-349.
- [47] Whitman M, Ketsawatsakul U, Halliwell B (2002). A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann. NY Acad. Sci.* 962:242-259.

- [48] **Babar Ali M, Hahn E, Paek K (2007)**. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in Panax ginseng Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules* ; 12 : 607-621.
- [49] **Martin S, Andriantsitohaina R (2002)**. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.*; 51 :304-315.
- [50] **Koechlin-Ramonatxo C (2006)**. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme.* 20 : 165-177.
- [51] **Crane F, Bottger M (2001)**. Plasma membrane redox systems. *Protoplasma* ; 217 : 1-2.
- [52] **Beaumont S (2010)**. *Biologie Moléculaire –UE1*. Edition Dunod, Paris. 155
- [53] **Palot A, Kadouch C, Ercoli J (2008)**. Composés organiques volatils intérieurs : concentrations, sources, facteurs de variabilité, *Revue des Maladies Respiratoires* ; 25 : 725-730.
- [54] **OQAI (Observatoire de la Qualité de l'Air Intérieur) (2007)**. Campagne nationale de logements, état de la qualité de l'air dans les logements français, rapport final ;183.
- [55] **INRS (2006)**. Le point des connaissances sur le formaldéhyde. *Travail et Sécurité.* ;666.
- [56] **F. 140 Pons-Lebeau (2007)**. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 47. 2007 ;139–143.
- [57] **GASIC S (2007)**. Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro, *Immunopharmacol immunotoxicol.*
- [58] **Kirk-Othmer (1994)**. *Encyclopedia of chemical technology*. New York: John Wiley and sons.; 929-947.
- [59] **Formaldehyde – OECD – SIDS, Initial assessment report – UNEP publications, 2002** (www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecdsids/sidspub.html 1.)
- [60] **Budavari M, Co (2001)**. *The Merck Index*, 13e ed.; 4261.

[61] **Formaldéhyde – In : Base de données HSDB. NLM. (2003)**
(www.toxnet.nlm.nih.gov).

[62] **Morandini M, Maberti S (2001)**. Aldehydes and acetals. In: Patty's Toxicology, 5e éd. Eula Bingham, Cohrssen Barbara, and Powell Charles P. New York: John Wiley and Sons. 5: 979-989.

[63] **Formaldehyde. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. Vol 65. IARC ; 1995 : 217-243** (www.iarc.fr).

[64] **Bonnard N, Falcy M, Pasquier E. (2008)**. Aldéhyde formique et solutions aqueuses, Fiche toxicologique INRS.; 9.

[65] **Heck H, Casanova M (2004)**. The implausibility of leukaemia induction by formaldehyde: critical review of the biological evidence on distant-site toxicity, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 40 : 92-106.

[66] **AFSSET. (2008)**. Risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde dans les environnements intérieurs et extérieurs, Rapport d'expertise collective ; 79.

[67] **Lauwerys R (2000)**. Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles, Masson. 961.

[68] **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)**. Toxicological profile for formaldehyde. U.S. Department of Health Service. 1999.

[69] **Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR). (2006)**. Assessment of the Carcinogenicity of Formaldehyde.

[70] **Nordic Council of Ministers (NCM)(2003)**. The Nordic Experts Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals and the Dutch Expert Committee on Occupational Standards. Formaldéhyde. NR.

[71] **Pazdrak K, Gorski P, Krakowiak A (1993)**. Changes in nasal lavage fluid due to formaldehyde inhalation. *Int Arch Occup Environ Health*. 64: 515–9.

[72] **Lino dos Santos Franco A, Damazo A, Beraldo de Souza H (2006)**. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated

by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. *Toxicol Appl Pharmacol* .214:35–42.

[73] **Ito K, Sakamoto T, Hayashi Y (1996)**. Role of tachykinin and bradykinin receptors and mast cells in gaseous formaldehyde-induced airway microvascular leakage in rats. *Eur J Pharmacol* .307:291–8.

[74] **Fujimaki H, Kawagoe A, Bissonnette E (1992)**. Mast cell response to formaldehyde. 1. Modulation of mediator release. *Int Arch Allergy Immunol* .98:324–31.

[75] **Rusznak C, Sapsford R, Devalia J (1999)**. Cigarette smoke potentiates house dust mite allergen-induced increase in the permeability of human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 20:1238–50.

[76] **Morgan K, Patterson D, Gross E (1986)**. Responses of the nasal mucociliary apparatus of F-344 rats to formaldehyde gas. *Toxicol Appl Pharmacol*. 82:1–13.

[77] **Monteiro-Riviere N, Popp J (1986)**. Ultrastructural evaluation of acute nasal toxicity in the rat respiratory epithelium in response to formaldehyde gas. *Fundam Appl Toxicol*. 6:251–62.

[78] **Arts J, Rennen M, de Heer C (2006)**. Inhaled formaldehyde: evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 44: 144-160.

[79] **Agency for toxic Substances and Disease Registry (A.T.S.D.R) (1999)**. Toxicological profile for formaldehyde, rapport ATSDR; 468.

[80] **INERIS. (2005)**. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques : le formaldéhyde ; 53p.

[81] **Ameille J, Escatha A (2004)**. Asthmes professionnels, *La Presse Médicale* ; 33 : 882-890.

[82] **Données issues de l'Observatoire National des Asthmes Professionnels (O.N.A.P). 1996-1999.**

[83] **AFSSET (2008)**, Risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde dans les environnements intérieurs et extérieurs, Rapport d'expertise collective. 79.

[84] **Sul D, Kim H, Oh E (2007)**. Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde, *Archives of Toxicology*.81: 589-597.

[85] **Ushio H, Nohara K, Fujimaki H (1999)**. Effect of environmental pollutants on the production of pro-inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes. *Toxicol Lett*. 105 :17–24.

[86] **Kim W, Terada N, Nomura T *et al.*** Effect of formaldehyde on the expression of adhesion molecules in nasal.

[87] **Teng S, Beard K, Pourahmad J (2001)**. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* ;130 :285- 96.

[88] **Gulec M, Gurel A, Armutcu F (2006)**. Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol Cell Biochem* ; 290 :61–7.

[89] Produits de la ruche et apithérapie : la gelée royale (suite), *L'abeille de France* n°645, Decembre. 1980; 441-442.

[90] **Isidorova V, Czyzewskaa U, Isidorovab A (2009)**. Gas chromatographic and mass spectrometric characterization of the organic acids extracted from some preparations containing lyophilized royal jelly. *Journal of Chromatography*. 877 : 3776–3780.

[91] **ALPHANDERY R (2002)**. La route du miel – Le Grand Livre des Abeilles et de L'Apiculture, Paris, Nathan. 288.

[92] **CHERBULIEZ T. et DOMEREGO R. (2003)**. L'apithérapie : médecine des abeilles, Amyris.; 254.

[93] **CLEMENT H (2006)**. Le Traité Rustica de l'Apiculture, 2° Edition, Paris, Editions Rustica, 528.

[94] **ROSSANT A, DESMOULIERE A (2011)**. Le miel, un composé complexe aux propriétés surprenantes Thèse de doctorat : Pharmacie. Limoges : Université de Limoges. 132

[95] **CORBARA B (2002)** . La cité des abeilles, Editions Gallimard. 112.

[96] **Lercker G (2003)**. La gelatina reale : Composizione, autenticita` ed adulterazione. In Atti del Convegno “Strategie per la valorizzazione dei prodotti dell’alveare”. Università degli Studi del Molise; Campobasso. 67–81.

[97] **SWEETMAN S (2002)**. Royal jelly, Martindale. The complete drug reference, 33° Edition, Pharmaceutical Press, Londres.

[98] **Li J, Wang T, Zhang Z (2007)**. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 55 :8411–8422.

[99] **MATEESCU C (2006)**. Les produits de sécrétion et leurs rôles dans la colonie d’abeilles [en ligne]. Disponible sur : < <http://www.beekeeping.com/anercea/secretions.pdf> >
MARTINI M.-C. Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie. 2e édition. Paris ; Londres ; New York : Editions Tec & Doc ; Cachan : Editions Médicales internationales. 411

[100] **Jamnik P, Goranovič D, Raspor, D (2007)**. Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell, Experimental Gerontology. 42(7) : 594-600.

[98] **CORBARA B (2002)**. La cité des abeilles, Editions Gallimard, 112 p.

[99] **TOURNERET ERIC**. Le peuple des abeilles [en ligne].

[100] **Lercker, G. (2003)**. La gelatina reale : Composizione, autenticita` ed adulterazione. In Atti del Convegno “Strategie per la valorizzazione dei prodotti dell’alveare”. Università degli Studi del Molise; Campobasso; pp. 67–81.

[101] **SWEETMAN S.-C. Royal jelly, Martindale (2002)**. The complete drug reference, 33° Edition, Pharmaceutical Press, Londres,

[102] **Li, J., Wang, T., Zhang, Z., & Pan, Y. (2007)**. Proteomic analysis of royal jelly from three strains of western honeybees (*Apis mellifera*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55,8411–8422.

- [104] **Jamnik, P., Goranovič, D., Raspor, D. (2007).** Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell, *Experimental Gerontology*, 42(7), 594-600
- [105] **El-Nekeety, A. A., El-Kholy, W., Abbas, N. F., Ebaid, A., Amra, H. A., Abdel Wahhab, M. A. (2007).** Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats, *Toxicon*, 50(2), 256-269.
- [106] **Silici, S., Ekmekcioglu, O., Eraslan, G., Demirtas, A. (2009),** Antioxidative effect of royal jelly in cisplatininduced testes damage, *Urology*, 74(3), 545-551.
- [107] **ASSOCIATION EUROPEENNE D'APITHERAPIE,** La médecine par les abeilles - Traité d'apithérapie, CD-ROM d'Apithérapie v1.0.
- [108] **Nagai, T., et Inoue, R. (2004).** Préparation et les propriétés fonctionnelles de l'extrait de l'eau et de l'extrait alcalin de la gelée royale. *Chimie alimentaire*, 84, 181-186.
- [109] **Inoue, S., Koya-Miyata, S., Ushio, S., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M. (2003).** Royal jelly prolongs the life span of C3H/HeJ mice; correlation with reduced DNA damage, *Exp. Gerontol.*, 38(9), 965-969
- [110] **MARTINI M.-C., SEILLER M (2006).** Actifs et additifs en cosmétologie. 3e édition. Paris : Editions Tec & Doc ; Cachan : Éditions Médicales internationales. XXVIII-1051 p.
- [111] **Elham Fathy Mahmoud, Mahmoud Fathy Mahmoud and Mohamed Abd Al Haleem (2012).** Royal Jelly Ameliorates Oxidative Stress and Tissue Injury in Submandibular Salivary Gland of Methotrexate Treated Rabbits: Immunohistochemical Study. *Journal of American Science*;8(11)
- [112] **Murat Kanbura, Go' khan Eraslana, _, LatifeBeyazb, SibelSilicic, BilalCemLimana, S- ule AltÖnordulua, AyhanAtaseverb (2009).** The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61 123–132.
- [113] **Kohno, K., Okamoto, I., Sano, O., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M. (2004).** Royal jelly inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by activated macrophages, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(1), 138-45

- [114] FUJII A., KOBAYASHI S., KUBOYAMA N. (1990). Augmentation of wound healing by royal jelly in streptozotocin-diabetic rats. Japanese journal of pharmacology, vol. 53, n° 3, p. 331-337.
- [115] BLANC M., CHULIA A. (2010). Propriétés et usage médical des produits de la ruche. Thèse de doctorat : Pharmacie. Limoges : Université de Limoges.
- [116] MAJTAN J., KUMAR P., MAJTAN T. (2010). Effect of honey and its major royal jelly protein 1 on cytokine and MMP-9 mRNA transcripts in human keratinocytes. Experimental Dermatology, vol. 19, n° 8, p. e73-e79.
- [117] KOYA-MIYATA S., OKAMOTO I., USHIO S (2004). Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism. Biosci. Biotechnol. Biochem., vol. 68, n° 4, p. 767-773.
- [118] Izuta, H., Chikaraishi, Y., Shimazawa, M., Mishima, S., Hara, H. (2009). 10-Hydroxy-2- decenoic Acid, a Major Fatty Acid from Royal Jelly, Inhibits VEGF-induced Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Evid. Based Complement. Alternat. Med., 6(4), 489-94
- [119] Šimúth, J., Bíliková, K., Kováčová, E., Kuzmová, Z., Schroder, W. (2004). Immunochemical Approach to Detection of Adulteration in Honey: Physiologically Active Royal Jelly Protein Stimulating TNF- α Release Is a Regular Component of Honey, J. Agric. Food Chem., 52 (8), 2154–2158.
- [120] Salazar-Olivo, L.A., Paz-González, V. (2005), Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, Toxicol. In Vitro, 19(5), 645-51
- [121] BARNUTIU L.I., MARGHITAS L. AL., DEZMIREAN D.S. (2011). Antimicrobial compounds of royal jelly. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies, vol. 68, n° 1-2, p. 85-90.
- [122] FONTANA R., MENDES M. A., MONSON De SOUZA B. (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). Peptides, vol. 25, n° 6, p. 919-928.

- [123] Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K., (2004). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin, *Peptides*, 25, 919-928.
- [124] Librowski, T., Czarnecki, R. (2000). Comparative analysis of Apistmul Crataegi Forte and royal jelly in the experimental heart action disturbance, *Herba Pol.*, 46(3), 145-150.
- [125]. Tokunaga, K. H., Yoshida, C., Suzuki, K. M., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y., Mishima, S. (2004). Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats, *Biol. Pharm. Bull.*, 27(2), 189-192
- [126] Batchelder, T. (2002). A novel mechanism of liver enhancement from a traditional bee product. *Townsend Letter for Doctors and Patients*, 233, 46-48.
- [127] Zamami, Y., Takatori, S., Goda, M., Koyama, T., Iwatani, Y., Jin, X., Takai-Doi, S., Kawasaki, H. (2008). Royal jelly ameliorates insulin resistance in fructose-drinking rats, *J. Biol. Pharm. Bull.*, 31(11), 2103-3107
- [128] Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., & Ikeda, M. (2003). Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sciences*, 73, 2029–2045.
- [129]. Wittenberg, J. S. (1996). *The Rebellious Body*, Insight Books, New York.
- [130] Fossati, C, (1972). Therapeutic possibilities of royal jelly, *Clin. Ter.*, 62, 377-387.
- [131]. Balch, P. A., Balch, J. F., (2000). *Prescription for Nutritional Healing*, third ed., Avery, New York,
- [132] Lewis, R. (2005). *The Infertility Cure: The Ancient Chinese Wellness Program for Getting Pregnant and Having Healthy Babies*, ed. Little, Brown and Company.
- [133]. Mishima, S., Suzuki, K. M., Isohama, Y., Kuratsu, N., Araki, Y., Inoue, M., Miyata, T. (2005). Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo, *J. Ethnopharmacol.*, 3, 101(1-3), 215-20

- [134]. **Abdelhafiz, A. T., Muhamad, J. A. (2008)**. Midcycle pericoital intravaginal bee honey and royal jelly for male factor infertility, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 101(2), 146-149.
- [135] **CAILLAS A (1977)**. Si la gelée royale m'était contée, Editions de la pensée moderne, Orléans.
- [136] **DONADIEU Y (1981)**. La gelée royale thérapeutique naturelle, 5^o Edition, Paris, Maloine edit., 79p.
- [137] **GASIC S. (2007)**. Evaluation of the immunomodulatory activities of royal jelly components in vitro, *Immunopharmacol immunotoxicol*.
- [138] **SWEETMAN S.-C. Royal jelly, Martindale (2002)**. The complete drug reference, 33^o Edition, Pharmaceutical Press, Londres.
- [139] **IFCC (2002)**. primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*; 40:725- 733.
- [140] **Gella FJ, Olivella T, Cruz Pastor M, Arenas J, Moreno R, Durban R and Gómez JA (1985)**. A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. *Clin Chim Acta* 153: 241-247.
- [141] **Murray RL (1984)**. Alanine aminotransferase. (1088-1090). In: *Clinical Chemistry; Theory, Analysis and Correlation*. Kaplan LA., Pesce AJ. (Ed.) C.V. Mosby Company St. Louis, Toronto Princeton.
- [142] **Weckbeker, G., Cory, J.G. (1988)**. Ribonucleotide reductase activity and growth of Glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer letters*. 40,257-264.
- [143] **Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979)**. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann. Biochem*. 95 : 351-358.
- [144] **Houlot R. (1984)**. Techniques d'histologie et de cytologie. Paris : Edition Maloine,
- [145] **Johannsen FR, Levinskas GJ, Tegeris AS. (1986)**. Effects of formaldehyde in the rat and dog following oral exposure. *Toxicol Lett* 30:1-6.

- [146] **Til HP, Woutersen RA, Feron VJ. (1988).** Evaluation of the oral toxicity of acetaldehyde and formaldehyde in a 4-week drinking-water study in rats. *Food Chem Toxicol* 26:447-452.
- [147] **Takahashi M, Hasegawa R, Furukawa F (1986).** Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on gastric carcinogenesis in rats after initiation with n-methyl-n nitro-n-nitrosoguanidine. *Jpn J Cancer Res* 77:118-124.
- [148] **Halliwell B (1994).** Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr. Rev.* 52: 253-265
- [149] **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007).** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 44-84.
- [150] **Shrzylewska E, Farbisewski R (1996).** Diminished antioxidant defense potential of liver, erythrocyte and serum from rats with subacute methanol intoxication. *Vet. Hum. Toxicol.*, 38: 429- 433.
- [151] **Parthasarathy JN, Ramasundaram SK, Sundaramahalingam M, Pathinasamy SD (2006).** Methanol induced oxidative stress in rat lymphoid organs. *J. Occup. Health*, 48: 20-27.
- [152] **Skrzydłowska E, Farbiszewski R (1997).** Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication. *Arch Toxicol*;71(12):741-5
- [153] **Porter WH, Moyer TP (1996).** Clinical toxicology. In: Tietz fundamentals of clinical chemistry Burtis, CA, Ash wood, ER. [eds] W.B. Saunders Company, Pennsylvania pp:427-56
- [154] **SadÖk Sö÷üt1, Ahmet Songur2, O÷uz Aslan Özen2, Hüseyin Özyurt3, Mustafa SarsÖlmaz4 (2004).** DOES THE SUBACUTE (4-WEEK) EXPOSURE TO FORMALDEHYDE INHALATION LEAD TO OXIDANT/ANTIOXIDANT IMBALANCE IN RAT LIVER? *Eur J Gen Med*; 1(3): 26-32.

- [155] **Liu J-R., Y.-C. Yang, L.-S. Shi, and C.-C. Peng (2008)**. “Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 23, pp. 11447–11452.
- [156] **Gomez-Caravaca A. M., M. Gomez-Romero, D. Arraez-Roman, A. Segura Carretero, and A. Fernandez-Gutierrez (2006)**. “Advances in the analysis of phenolic compounds REFERENCES in products derived from bees,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41, no. 4, pp. 1220–1234.
- [157] **Fiorani M, Accorsi A, Blasa M, Diamantini G, Piatti E (2006)**. Flavonoids from Italian multiflora honeys reduce the extracellular ferricyanide in human red blood cells. *J Agric Food Chem.*54(21):8328–34.
- [158] **Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997)**. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 2: 152-159.
- [160] **Kohno K, Okamoto I, Sano O, Arai N, Iwaki K, Ikeda M (2004)**. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68:138–45.
- [161] **Kerem Z, Chetrit D, Shoseyov O, Regev-Shoshani G (2006)**. Protection of lipids from oxidation by epicatechin, trans-resveratrol, and gallic and caffeic acids in intestinal model systems. *J Agric Food Chem.*54(26):10288–93.
- [162] **Almaraz-Abarca N, da Graça Campos M, Ávila-Reyes JA, Naranjo- Jiménez N, Herrera Corral J, González-Valdez LS (2007)**. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J Food Compost Anal.*20(2) :119–24.
- [163] **Wu Y, Zhou C, Li X, Song L, Wu X, Lin W (2006)**. Evaluation of antiinflammatory activity of the total flavonoids of *Laggera pterodonta* on acute and chronic inflammation models. *Phytother Res.*20(7):585–90.
- [164] **Babu PVA, Sabitha KS, Shyamaladevi CS. (2006)**. Therapeutic effect of green tea extract on oxidatif stress in aorta and heart of streptozotocin diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions.*162, 114-120.

- [165] **Bouderbala S, Prost J, Lacaille-Dubois A et Bouchenak M. (2010).** Iridous extract from *Ajuva iva*. *Phytomedical*. 15, 453-61.
- [166] **El-Nekeety AA, El-Kholy W, Abbas NF, Ebaid A, Amra HA, Abdel- Wahhab MA (2007).** Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon*.;50(2):256–69.
- [167] **Kamakura M, Maebuchi M, Ozasa S, Komori M, Ogawa T, Sakaki T (2005).** Influence of royal jelly on mouse hepatic gene expression and safety assessment with a DNA microarray. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*.;51(3):148–55.
- [168] **Zimmermann A (2002).** Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Monit*; 8:53–63.
- [169] **Uzbekova D, Chugunova L, Makarova V, Ryabkov A, Mirgorodskaya L (2006).** Efficacy of royal jelly and lactulose on thyroxin-induced liver damage in rats. *Hepatology*; 28:157.
- [170] **Gutteridge J.M., Halliwell B. (2000).** Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Ann. NY Acad.* 899: 136-147.
- [171] **Romero FJ, Bosch Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, Roma J (1998).** Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health Perspect.*106 (5): 1229-1234.
- [172] **Stark G (2005).** Functional consequences of oxidative membrane damage. *J. Membrane Biol.*; 205: 1-16.
- [173] **Sun W. (2001).** Reactive oxygen species and breast cancer carcinogenesis. *Breast Cancer*. 77: 222.
- [174] **Kirschvink N., Moffarts B., Lekeux P. (2008).** The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veter. J.* 177: 178-191.
- [175] **Pekmez H, Camci NC, Zararsiz I, Kus I, Ogeturk M, Yilmaz HR and Sarsilmaz M (2008).** The Effect of Melatonin Hormone on Formaldehyde-Induced Liver Injury: A Light Microscopic and Biochemical Study. *Firat Tip Dergisi*. 13(2): 92-97.

- [176] **Kum C, Kiral F, Sekkin S, Seyrek K and Boyacioglu M (2007)**. Effects of Xylene and Formaldehyde Inhalation on Oxidative Stress in Adult and Developing Rats Livers. *Exp Anim*; 56(1): 35-42.
- [177] **Garg D.P., Kiran R., Bansal A.N., Malhotra A. and Dhawan D.K. (2008)**. Role of vitamin E in mitigating methomyl acute toxicity in blood of male Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*. 31: 487-499.
- [178] **Zeyuan D, Bingyin T, Xiaolin L, Jinming H, Yifeng C (1998)**. Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the blood triglycerides and antioxidation in aged rats. *J. Agric. Food Chem.*, 46(10): 3875- 3878.
- [179] **Parthasarathy JN, Ramasundaram SK, Sundaramahalingam M, Pathinasamy SD (2006)**. Methanol induced oxidative stress in rat lymphoid organs. *J. Occup. Health*, 48: 20-27.
- [180] **Zararsiz I, Sarsilmaz M, Tas U, Kus I, Meydan S, Ozan E (2007)**. Protective effect of melatonin against formaldehyde- induced kidney damage in rats. *Toxicol. Ind. Health*, 23(10): 573-579.
- [181] **Mourad M.I (2011)**. Effect of aspartame on some oxidative stress parameters in liver and kidney of rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 5(6), pp. 678- 682, June 2011
- [182] **Ozen O. A, M. A. Kus, I. Kus, O. A. Alkoc, and A. Songu (2008)**. “Protective effects of melatonin against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis in rat testes: An Immunohistochemical and biochemical study,” *Syst. Biol. Reprod. Med.*, vol. 54, no. 4-5, pp. 169-176.formalin+catalase+testis.
- [183] **Kamal AA, Gomaa A, el Khafif M, Hammad AS (1990)**. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dusts. *Environ Res*: 49: 173-180.
- [184] **Zhou D., S. Qiu, J. Zhang, H. Tian, and H. Wang (2006)**. “The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats,” *Asian J. Androl.*, vol. 8, no. 5, pp. 584-588.

- [185] **Tang M, Xie Y, Yi Y, Wang W (2003)**. Effects of formaldehyde on germ cells of male mice. *Wei Sheng Yan Jiu*: 32: 544-548.
- [186] **Skrzydłowska E, Farbiszewski R. (1998)**. Lipid peroxidation and antioxidant status in the liver, erythrocytes, and serum of rats after methanol intoxication. *J Toxicol Environ Health A*: 53: 637-649.
- [187] **O Strubelt, M Younes, R Pentz, and W Kühnel (1989)**. Mechanistic study n formaldehyde induces hepatotoxicity. *J Toxicol Environ Health*. 27(3),351-66.
- [188] **CavúR-lu, K.; Yapar, K. and Yalçin, E. (2009)**: Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice. *J Med Food*, 12(6):1286-92.
- [189] **Tamura S., T. Kono, C. Harada, K. Yamaguchi, and T. Moriyama (2009)**. “Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis merifera*,” *Food Chemistry*, vol. 114, no. 4, pp. 1491–1497.
- [190] **Nakajima, Y.; Tsuruma, K.; Shimazawa, M.; Mishima, S. and Hara, H. (2009)**: Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement Altern Med.*, 9:4.
- [191] **Paniagua-Castro N, Escalona-Cardoso G, Chamorro-Cevallos G (2006)**. Glycine reduces cadmium-induced teratogenic damage in mice. *Reprod Toxicol*; 23:92–7.
- [192] **Jamall IS, MignanoJE, LynchVD, Bidans et JH, Lau-CamC, Greening M (1979)**. Protective effects of zinc sulfate and L-lysine on acute ethanol toxicity in mice. *Environ Res*;191: 112–20.
- [193] **Parodi PW (2007)**. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Curr Pharm Des*; 13:813–28.
- [194] **Manawadi S.I., Kaliwal B.B. (2010)**. Methomyl-induced alteration in mice hepatic oxidative status. *Inter. J. Biotech. App.* 2(2): 11-19.
- [195] **Gulec M, Gurel A, Armutcu F (2006)**. Vitamin E protects against oxidative damage caused by a formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol. Cell Biochem.*, 290(1-2): 61-67.

- [196] **Waydhas, C., Weigl, K., and Sies, H. (1978).** The disposition of formaldehyde and formate arising from drug N-demethylations dependent on cytochrome P-450 in hepatocytes and in perfused rat liver. *Eur. J. Biochem.*, 89, 143-150
- [197] **Silici, S., Ekmekcioglu, O., Eraslan, G., & Demirtas, A. (2009).** Antioxidative effect of royal jelly in cisplatin-induced testes damage. *Urology*, 74, 545–551.
- [198] **Klaassen, C.D., Watkin, J.B. (1984).** Mechanism of formation, hepatic uptake and biliary excretion. *Pharmacol. Rev.* 36, 1–67.
- [199] **Ronald, L., Koretz, M.D. (1992).** Chronic hepatitis: science and superstition. In: Gitnick, G. *Current Hematology*. 12. Mosby-Year, Chicago. 53–75.
- [200] **Meyer DJ, Harvey JW (1994).** Hematologic changes associated with serum and hepatic iron alterations in dogs with congenital portosystemic vascular anomalies. *J Vet Intern Med*;8: 55–6.
- [201] **Hajimehdipoor H, SadeghiZ, ElmiS, ElmiA, Ghazi-Khansari M, AmanzadehY (2006).** Protective effects of *Swertia longifolia* Boiss. and its active compound, swerchirin, on paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. *JP harm Pharmacol*;58:277–80.
- [202] **Turgut K. Klinik enzimoloji (2000).** Veteriner Klinik laboratuvarları-his kitabı. Konya; p.179–201.
- [203] **Sallie R., J. M. Tredger, and R. Williams (1991).** “Drugs and the liver,” *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, vol. 12, no. 4, pp. 251–259.
- [204] **Ali Karadeniz,1 Nejdet Simsek,2 Emre Karakus,3 Serap Yildirim,4 Adem Kara,2 Ismail Can,2 Fikrullah Kisa,3 Habib Emre,5 and Mehmet Turkeli6. (2011).** Royal Jelly Modulates Oxidative Stress and Apoptosis in Liver and Kidneys of Rats Treated with Cisplatin. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- [205] **Murat Kanbura, Go" khan Eraslan, _, Latife Beyazb, Sibel Silicic, Bilal Cem Limana, S- ule Alt"nordulua, Ayhan Atasever. (2009).** The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 61 123–132

- [206] Blair, S. L., P. Heerdt, S. Sachar, A. Abolhoda, S. Hoch Wald, H. Cheng, and M. Burt (1997). Glutathione metabolism in patients with non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 57: 152–155.
- [207] Cook, J. A., H. I. Pass, S. N. Iype, N. Friedman, W. DeGraff, A. Russo, and J. B. Mitchell (1991). Cellular glutathione and thiol measurements from surgically resected human lung tumor and normal lung tissue. *Cancer Res.* 51: 4287–4294.
- [208] Lino-Dos-Santos-Franco. A, M. Correa-Costa, A. C. C. DosSantos Dur~ao *et al.*, “Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue,” *Toxicology Letters*, vol. 207, no. 3, pp. 278–285, 2011.
- [209] Lino-Dos-Santos-Franco. A, H. V. Domingos, A. P. L.D. Oliveira *et al.*, (2010). “Differential effects of formaldehyde exposure on the cell influx and vascular permeability in a rat model of allergic lung inflammation,” *Toxicology Letters*, vol. 197, no. 3, pp. 211–218.
- [210] Meister. A (1974). Glutathione, metabolism and function via the gammaglutamyl cycle. *Life Sci*; 15:177–190.
- [211] Doreswamy. K, B. Shrilatha, T. Rajesh Kumar, and Muralidhara (2004). “Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects,” *Journal of Andrology*, vol. 25, no. 6, pp. 996–1003.
- [212] Richard C, Dart. *Medical Toxicology*. illustrated, revised ed.
- [213] Khamgaonkar MB, Fulare MB (1994). Pulmonary effects of formaldehyde exposure: an environmental-epidemiological study. *Indian J Chest Dis Allied Sci*: 33: 9-13.
- [214] Kilburn KH (1994). Neurobehavioral impairment and seizures from formaldehyde. *Arch of Environ Health*: 49: 37- 44.

WEBOGRAPHE:

- [59i] Formaldehyde – OECD – SIDS, Initial assessment report – UNEP publications, 2002 (www.chem.unep.ch/irptc/sids/oecdsids/sidspub.html 1.)
- [99] (www.thehoneygatherers.com).TOURNERET ERIC. Le peuple des abeilles [en ligne]. 61i Formaldéhyde – In : Base de données HSDB. NLM. 2003 (www.toxnet.nlm.nih.gov).

Annexe

Annexe 01 : Variation du taux de glutathion (nmol/mg protéine), de l'activité de la catalase ($\mu\text{mol/mg}$ protéine), du taux de MDA ($\mu\text{mol/mg}$ protéine), et de l'activité enzymatique de l'ALAT (UI/l) chez les rats témoins et traités par : FA, combinaison (FA+ GR150mg) et (FA+GR200mg).

Paramètres	Les organes	Lots expérimentaux			
		T	FA	150mg	200mg
GSH (nmol/mg)	Foie	0,098±0,040	0,096±0,022	0,057±0,022	0,083±0,031
	%		-2%	-41,83%	-15%
CAT ($\mu\text{mol/mg/protéine}$)	Foie	12±17,7	2,62±2,67	13,7±14,1	11,1±10,3
	%		-78	14,16%	-8,3
	Poumon	6,29±1,97	4,64±4,69	5,06±2,52	6,42±2,86
	%		-26,23%	-19,55%	+2%
MDA ($\mu\text{mol/mg/protéine}$)	Foie	50,1±34,3	61,0±60,2	45,1±35,1	15,9±5,69
	%		21,75%	-9,98%	-68%
	Poumon	46,9±28	15,4±14,5	17,5±8,12	33,9±24,1
	%		-67,16	-62,68	-27,71%
TGP		87,95±46,29	256,9±366	111,1±49,86	166,7±64,14
		-	+192%	+26,23%	+89,54%
			-	-56,75%	-35,11%

Annexe 02 : Variation de poids corporel PC (g) chez les rats témoins et traités par FA, combinaison (FA+ GR150mg) et (FA+GR200mg).

Paramètres	Lots expérimentaux			
	Témoin	Formaldéhyde	150mg GR	200mg GR
Poids initial(g)	177.1±27.48	182.3±13.88	178.2±22.74	181.1±23.56
Poids final(g)	190.9±19.18	191.2±18.49	186.8±15.04	187.6±20.80
%		0.15%	-2.14%	-1.72%
Gain de poids(g)	13.8	8.9	8.6	6.5

Annexe 03 : Préparation de solution

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

🚫 Solution BSA (1mg/ml) :

Dissoudre 5 mg BSA dans 5 ml d'eau distillée.

🚫 Réactif de Bradford :

Dissoudre 100 mg de bleu de Coomassie (G 250) dans 50ml d'éthanol (95%).

Agiter par l'agitateur pendant 2 heures, Puis ajouter 100 ml d'acide ortho phosphorique (85%) et 850 ml d'eau distillée (pour obtenir 1L de solution).

Ce réactif doit être filtré puis conserver pendant 1mois au maximum à une température de 4°C et à l'abri de la lumière.

Dosage de MDA

🚫 Solution TCA (20 %) :

Dissoudre 20 g de TCA dans 100 ml d'eau distillée

🚫 Solution Tris :

Dissoudre 0,15 g de tris dans 50 ml d'eau distillée

✚ Solution TBA (0,67 %) :

Dissoudre 0,33 g de TBA dans 50 ml de la solution tris

Dosage du GSH

✓ Solution DTNB (0,01 M) :

Dissoudre 200 mg DTNB dans 50 ml de méthanol absolu.

✓ Solution d'acide salicylique (0,25%) :

Dissoudre 250 mg d'acide salicylique dans 100ml d'eau distillée.

✓ Solution Tris-TBA (Tris 26 mM, TBA 120mM) : Dissoudre 3,149g Tris dans 1L d'eau distillée, puis poser 17,299g TBA et compléter le volume à 1L par la solution Tris (26 mM).

Dosage de CAT

✚ **Solution H₂O₂(500mM)**

✓ **H₂O₂.....17ml**

✓ **Eau distillé.....qsp 1000 ml**

Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de la gelée royale vis-à-vis le stress oxydatif induit par le formaldéhyde chez des rats femelles de la souche Wistar.

Pour cela, 24 rats femelles Albinos Wistar, ont été répartis en 4 lots, le premier servant de témoin, a reçu une injection intrapéritonéale de l'eau physiologique, le deuxième a reçu 10 mg/kg de FA par injection intrapéritonéale pendant 10 jours, le troisième et le quatrième lot ont reçu un traitement combiné par (FA+ 150mg/kg) et (FA+200mg/kg) de gelée royale pendant 14 jours. Les résultats obtenus ont montré que le FA a un effet prooxydant, ceci est révélé par, la peroxydation lipidique au niveau du foie avec augmentation du taux de MDA, une réduction de l'activité de la CAT, une déplétion de la GSH, et une augmentation de l'activité enzymatique d'ALAT. De plus, le formaldéhyde n'a pas d'effet sur la peroxydation lipidique et l'activité de la catalase au niveau du poumon. L'étude histologique du foie a révélé, l'implication du FA dans l'inflammation et le stress oxydant par une altération du parenchyme hépatique, se traduisant par une accumulation des cellules inflammatoires et une nécrose hépatique. Cependant, la supplémentation en gelée royale aux rats traités par le FA, a atténuée certains effets nocifs du FA. Ceci met en évidence les rôles protecteurs, antioxydants et anti-inflammatoires de la GR vis-à-vis le stress oxydant et l'inflammation générés par le FA

Mots clés : stress oxydant, formaldéhyde, gelée royale, inflammation, rats Wistar

Abstract

The aim of this investigation is to study the antioxidant and anti-inflammatory effects of Royal Jelly towards oxidative stress induced by formaldehyde in female *Wistar* rats.

For that, 24 female rats albino Wistar, were randomly divided into 4 groups, the first one was served as a control, and received 0,9% saline, the second received intraperitoneally 10 mg/kg FA for 10 days, the third and the fourth group were treated by the combination (FA+ 150mg/kg) and (FA+200mg/kg) of royal jelly for 14 days.

The obtained results show, that FA has a prooxydant effect, which was revealed by lipid peroxydation in liver and increasing in MDA levels, a decrease in catalase activity, a depletion in GSH, and an increase in enzymatic activity of ALAT. In addition, the FA has no effects on lipid peroxydation and catalase activity in lung.

The histological study of liver was revealed the implication of FA in the inflammation and oxidatif stress thought deterioration of the hepatic parenchyma's, as manifested by accumulation of inflammatory cells and hepatic necrosis.

However, the supplementation of royal jelly to the FA treated rats, attenuated some adversed effects of FA. This means the protective roles, antioxidant and anti-inflammatory of royal jelly towards oxidatif stress and inflammation generated by FA.

Key words : oxidatif stress, formaldehyde, royal jelly, inflammation, Wistar rats.

الملخص

يهدف هذا العمل الي دراسة فعل تأثير مضاد الاكسدة ومضاد الالتهابات لغذاء ملكات النحل على الاجهاد التأكسدي الناتج عن طريق الفورمل ألدهيد لإناث الفئران من سلالة ألبنوس ويستار. Albinos Wistar

تم تقسيم 24 فارة مهقيه من سلالة ويستار الي 4 مجموعات مجموعة الأولى استخدمت كشاهد تمت معالجتها عن طريق حقن داخل الصفاق بالماء الفيزيولوجي. المجموعة الثانية تمت معالجتها ب 10 مع/كغ من الفورمول ألدهيد لمدة عشرة ايام. المجموعة الثالثة والرابعة تمت معالجتهمما بحقن بالفورمول دهيد +150 مغ /كغ وبالفورمول ألدهيد +200مغ/كغ من غذاء ملكات النحل على التوالي لمدة 14 يوم.

النتائج المتحصل عليها اظهرت ان الفورمول ألدهيد له تأثير موالى للأكسدة تم الكشف عنه من خلال عملية البيروكسيد الدهني داخل الكبد مع زيادة معدل MDA مع ارجاع نشاط CAT واستنزاف GSH وزيادة في النشاط الأنزيمي لل ALAT. كما اظهرت النتائج ان الفورمول ألدهيد ليس له تأثير على عملية البروكسيد الليبيدية ونشاط CAT في الرئة. الدراسة الهيستولوجية للكبد اظهرت تدخل الفورمول ألدهيد في الالتهاب و الإجهاد التأكسدي عن طريق اعتلال البرنشيم الكبدي مما يؤدي الي تراكم الخلايا الالتهابية ونخر الكبد.

في المقابل زيادة غذاء ملكات النحل للمجموعة المعالجة بالفورمول ألدهيد +150و200 مع/كغ من غذاء ملكات النحل قلل من بعض الاثار الضارة لهذا الاخير وهذا يوضح دور غذاء ملكات النحل في الوقاية و ضد الإجهاد التأكسدي والالتهابات المحفزة عن طريق الفورمول ألدهيد.

الكلمات المفتاحية: الاكسدة الفورمالدهيد غذاء ملكات النحل الالتهاب فئران ويستار

ETUDE DE L'EFFET PROTECTEUR D'UN PRODUIT DE LA RUCHE, LA GELÉE ROYALE SUR LE STRESS OXYDATIF ET L'INFLAMMATION INDUIT PAR LE FORMALDÉHYDE CHEZ LE RAT

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Immunologie moléculaire et cellulaire : Oncologie

Résumé :

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de la gelée royale vis-à-vis le stress oxydatif induit par le formaldéhyde chez des rats femelles de la souche Wistar.

Pour cela, 24 rats femelles Albinos Wistar, ont été répartis en 4 lots, le premier servant de témoin, a reçu une injection intrapéritonéale de l'eau physiologique, le deuxième a reçu 10 mg/kg de FA par injection intrapéritonéale pendant 10 jours, le troisième et le quatrième lot ont reçu un traitement combiné par (FA+ 150mg/kg) et (FA+200mg/kg) de gelée royale pendant 14 jours. Les résultats obtenus ont montré que le FA a un effet prooxydant, ceci est révélé par, la peroxydation lipidique au niveau du foie avec augmentation du taux de MDA, une réduction de l'activité de la CAT, une déplétion de la GSH, et une augmentation de l'activité enzymatique d'ALAT. De plus, le formaldéhyde n'a pas d'effet sur la peroxydation lipidique et l'activité de la catalase au niveau du poumon. L'étude histologique du foie a révélé, l'implication du FA dans l'inflammation et le stress oxydant par une altération du parenchyme hépatique, se traduisant par une accumulation des cellules inflammatoires et une nécrose hépatique. Cependant, la supplémentation en gelée royale aux rats traités par le FA, a atténué certains effets nocifs du FA. Ceci met en évidence les rôles protecteurs, antioxydants et anti-inflammatoires de la GR vis-à-vis le stress oxydant et l'inflammation générés par le FA

Mots clés : stress oxydant, formaldéhyde, gelée royale, inflammation, rats Wistar

Laboratoire de recherche : d'immunologie, de biochimie, d'enzymologie, d'animalerie et de cytogénétique de l'université des Frères Mentouri Constantine

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : EL OUAR. I (MCA - UFM Constantine),
Rapporteur : RAHMOUNE .H (MAA - UFM Constantine),
Examineur : MESSAOUDI. S (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 29/06/2016